

ANA PAULA LOPES DIAS

**Variações na capacidade de oxi-redução em
plantas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ expostas
em ambiente contaminado por ozônio**

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

SÃO PAULO

2010

ANA PAULA LOPES DIAS

Variações na capacidade de oxi-redução em plantas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ expostas em ambiente contaminado por ozônio

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

ORIENTADORA: DR.^a MARISA DOMINGOS

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Dias, Ana Paula Lopes

D541v Variações na capacidade de oxi-redução em plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio / Ana Paula Lopes Dias -- São Paulo, 2010.

73 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010

Bibliografia.

1. Solanaceae. 2. Ozônio. 3. Biomonitoramento. I. Título

CDU: 582.951.4

“Este trabalho é dedicado ao meu marido,
meus pais, e ao grande Pai que é a razão de
tudo existir.”

“Temos estado ocupados demais para prever as conseqüências a longo prazo de nossas ações, sofreremos perdas terríveis se não pararmos de nos iludir e começarmos logo a procurar uma solução. Foram a ciência e a tecnologia que nos colocaram neste gargalo; agora a ciência e a tecnologia devem nos ajudar a encontrar uma saída.”
(Edward Wilson)

AGRADECIMENTOS

Às Instituições FAPESP e CAPES,

pelo apoio financeiro ao “Projeto Bioindicadores” e pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Instituto de Botânica do Estado de São Paulo,

pelo espaço e a infra-estrutura para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas-USP,

pelo empenho em nos fornecer os dados climáticos durante todo o ano de 2008.

Aos Pesquisadores,

Dr.^a Marisa Domingos, pelas horas de orientação cheias de interesse, paciência e carinho;

Ms. Mirian C.S. Rinaldi, pela orientação e amizade dentro e fora do laboratório;

Dr.^a Regina M. Moraes, pelo auxílio, a atenção e o carinho nas diversas dúvidas e receios;

Dr.^a Patrícia Bulbovas, Dr.^a Edenise Segala Alves, Dr. Sergio Tadeu Meireles e a Dr.^a Silvia Ribeiro de Souza, pelos mais diversos auxílios para a realização deste trabalho.

As funcionárias da Seção de Ecologia,

Amariles, Dora, Marli e Valdenice pela ajuda diária e pela atenção a todo momento.

Aos amigos,

Marcelle, pelas muitas horas de esforço e estudo acompanhadas do “Raven” ou nas disciplinas do mestrado, por toda a paciência que dividiu comigo ao desvendarmos o “mundo do HPLC”, mas principalmente pela sincera amizade, carinho e compreensão a qualquer tempo.

Andréa, Daiane e Kelly pelo esforço conjunto nas tarefas do “grupo tabaco”, pelo agradável convívio quase diário em nossas coletas, mas em especial pela bela amizade que daí surgiu;

Jéssica e Ricardo, pela imensa ajuda nas exaustivas tarefas de laboratório, e pela amizade que construímos em meio a todo esse esforço;

Clarice, Fernanda, Juliana, Patrícia e Sandra pelas várias contribuições a este trabalho; e a todos demais colegas que participaram do Projeto Bioindicadores.

À minha família,

Meus pais Geni e Laércio, por todo o amor e os belos valores e princípios que me ensinaram; e em especial ao meu amor Eduardo, pelo apoio de hora em hora, pelo auxílio nas planilhas e gráficos, enfim por tudo que contribuiu para fazer deste último ano o melhor da minha vida.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	
1.1 - Poluição atmosférica e ozônio	3
1.2 - Interação ozônio-planta.....	7
1.3 - Tabaco como bioindicador de ozônio	11
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 – Local de exposição das Plantas	15
3.2 - Cultivo e exposição das Plantas	16
3.3 - Condições ambientais durante o período experimental	18
3.4 - Antioxidantes	19
3.5 - Injúrias foliares visíveis	21
3.6 - Análises estatísticas e apresentação dos resultados	21
4. RESULTADOS	
4.1 - Condições ambientais durante o período experimental	24
4.2 - Injúrias foliares visíveis	28
4.3 – Antioxidantes	30
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÕES.....	56
7. RESUMO	58
8. ABSTRACT	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
10. ANEXOS	
Anexo 1 - Representação molecular dos antioxidantes ácido ascórbico e glutathiona.....	67
Anexo 2 – Catálogo fotográfico <i>N. tabacum</i> ‘Bel W3’	68

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AA – Ácido ascórbico
ACP – Análise de componentes principais
AOTzero – Valor horário acumulado acima de zero ppb de ozônio
AOT20 – Valor horário acumulado acima de 20 ppb de ozônio
AOT40 – Valor horário acumulado acima de 40 ppb de ozônio
APX – Ascorbato peroxidase
CAT – Catalases
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
COVs – Compostos orgânicos voláteis
DHA – Deidroascorbato (AA oxidado)
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FSII – Fotossistema dois
GR – Glutathione redutase
GSH – Glutathione reduzida
GSSG – Glutathione oxidada
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HR-like – Resposta semelhante à hipersensibilidade
LOOH – Hidroperóxido lipídico
MDHA – Monodeidroascorbato
MDHAR – Monodeidroascorbato redutase
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NO – Monóxido de nitrogênio
NO₂ – Dióxido de nitrogênio
NO_x – Óxidos de nitrogênio
O[•] – Oxigênio atômico
O₂ – Gás oxigênio
O₃ – Ozônio troposférico
O₂^{•-} – Radical superóxido
OH⁻ – Hidroxila
PAN – Nitrato de peroxiacetila
R – radicais
RO₂ – Peroxi-radicais
SOD – Superóxido dismutase
VRPP – Valor de Referência para Proteção da Produtividade Agrícola

1. INTRODUÇÃO GERAL

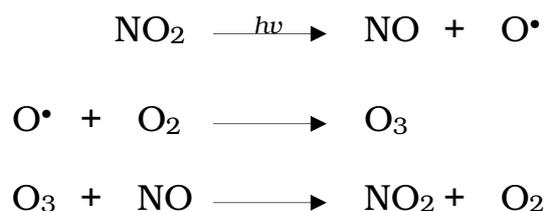
1.1 - Poluição atmosférica e ozônio

A poluição atmosférica pode ser definida como a presença de substâncias estranhas na atmosfera, resultantes de processos naturais ou de atividade humana, em concentrações suficientes para interferir direta ou indiretamente na saúde, segurança e bem estar dos seres vivos. Entretanto, é importante salientar que as fontes naturais, como por exemplo, emissões vulcânicas ou queimadas, são na maioria das vezes pontuais e esporádicas ao contrário das fontes antropogênicas, como por exemplo, veículos automotores, que liberam poluentes aéreos continuamente e assim contribuem de forma significativa para o aumento da poluição atmosférica (Elson 1992).

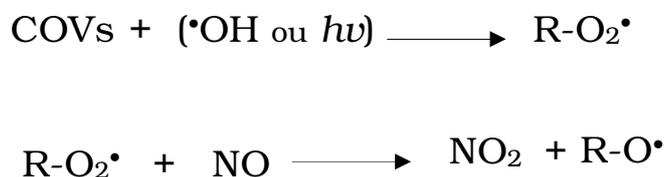
Esse aumento da poluição atmosférica vem causando inúmeros problemas ambientais, em escala global, entre os quais danos em florestas e em culturas vegetais, relatados em diversos países, especialmente naqueles situados nas regiões de clima temperado. A eliminação de espécies sensíveis e conseqüente diminuição da biodiversidade estão entre os efeitos de poluentes aéreos mais evidentes observados nas florestas. Daí a necessidade de se encontrar indicadores adequados de riscos impostos por poluentes às florestas, quer em regiões adjacentes às fontes poluidoras, como os centros urbanos, quer em regiões afastadas das mesmas, visto que os poluentes podem ser transportados para essas áreas remotas (Agrawal & Agrawal 2000, Emberson *et al.* 2003).

Um dos principais poluentes atmosféricos com ação fitotóxica é, sem dúvida, o ozônio (O_3), existindo diversos relatos de intenso declínio de florestas e perdas agrícolas em países da América do Norte e da Europa causados por esse poluente (Emberson *et al.* 2003). A formação de O_3 é um fenômeno predominantemente urbano, em decorrência de uma cadeia complexa de reações entre compostos orgânicos voláteis (COVs), como por exemplo os ácidos carboxílicos, e óxidos de nitrogênio (NO_x), oriundos das emissões veiculares. Esta cadeia de reações é iniciada pela ação da luz solar e ocorre sob determinadas condições meteorológicas, produzindo não somente o O_3 , mas também nitrato de peroxiacetila (PAN), aldeídos, cetonas, peróxidos, entre outros compostos que pertencem a um grupo chamado de poluentes do smog fotoquímico (Sawyer *et al.* 2000).

A formação do O_3 na troposfera se inicia pela fotólise do dióxido de nitrogênio (NO_2) em óxido de nitrogênio (NO) e oxigênio molecular (O^*), este último reagem com gás oxigênio (O_2) formando o O_3 . Logo após, o O_3 formado reage como o NO e forma novamente NO_2 e O_2 (CETESB 2000). Estas reações foram representadas a seguir:



Assim, o poluente O₃ é continuamente formado e degradado através da interação entre NO_x e O₂. Porém, na presença de COVs a quantidade de NO é drasticamente diminuída através de sua conversão a NO₂ via formação de radicais. As reações a seguir representam esta situação, onde a fotólise dos COVs ou a interação com radicais hidroxila ([•]OH) geram peroxi radicais (R-O₂[•]), que reagem com NO formando NO₂ e outros radicais de oxigênio (R-O[•]). Uma vez que o NO é o responsável pela degradação do O₃, a presença dos COVs gera, portanto, o acúmulo do poluente O₃ (CETESB 2000).



Baseando-se na constante emissão de precursores, estima-se que ocorrerá um aumento gradativo nas concentrações mundiais de O₃ nos próximos anos. Na América do Sul, por exemplo, é previsto que, em regiões que apresentavam em 1990 entre 40 a 50 ppb, serão afetadas por concentrações entre 60 a 70 ppb em 2030 (Emberson *et al.* 2003). No estudo de Ashmore *et al.* (2006), considerando como cenário a adoção de medidas eficazes de controle dos precursores do poluente O₃ e o desenvolvimento econômico individual dos países, foram estimadas as diferenças entre concentrações anuais mundiais de O₃ do ano de 1990 a 2020. Os autores apontam que somente após 30 anos seriam percebidas diminuições das concentrações anuais de O₃ em maior escala no hemisfério sul (decréscimo aproximado - 3 ppb/ano) e em menor escala na maioria do hemisfério norte (decréscimo aproximado - 1ppb/ano). Por outro

lado, foi previsto um quadro de piora em algumas regiões asiáticas próximas a Índia (acréscimo aproximado - 5ppb/ano) (Fig. 1.1) (Ashmore *et al.* 2006).

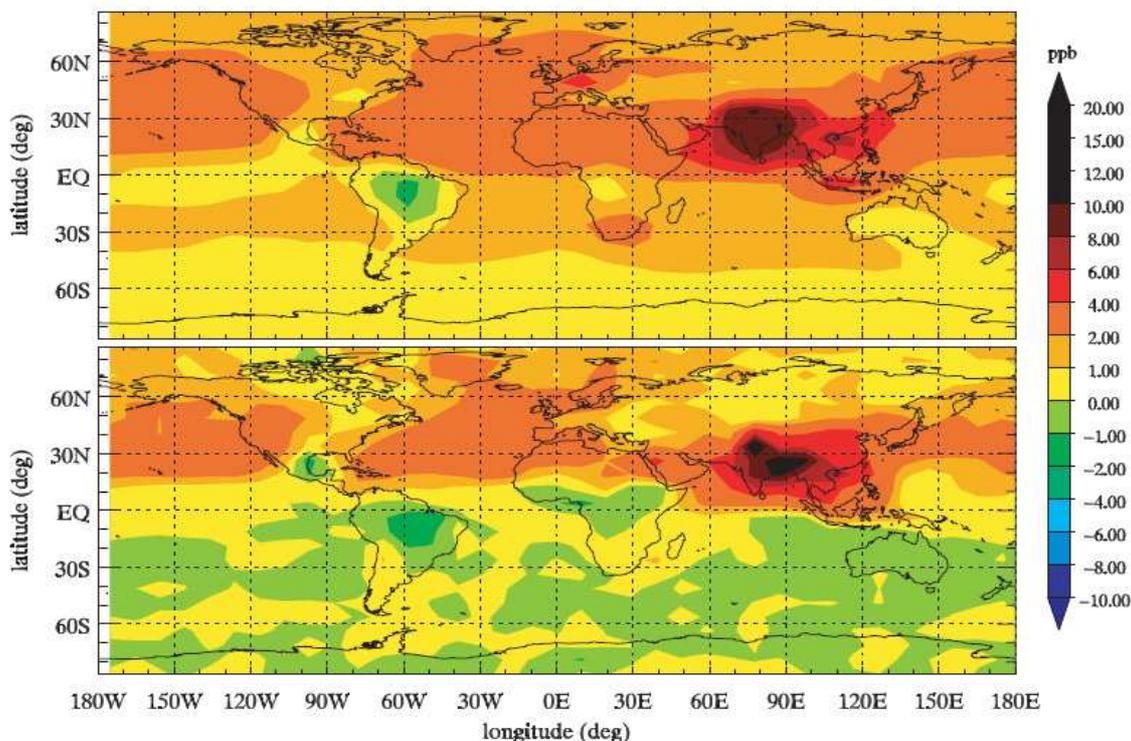


Figura 1.1 – Previsão de acréscimo ou decréscimo nas concentrações anuais mundiais de ozônio entre os anos 1990 e 2020. Fonte: Ashmore et al. 2006.

Atualmente, na cidade de São Paulo, o O₃ é o poluente aéreo com maior número de ultrapassagens dos padrões legais de qualidade do ar (160 µg/m³ ou aproximadamente 80 ppb em uma hora estabelecido pela Resolução CONAMA n.º 03 de 28/06/90). Isto se deve, principalmente, às emissões de sua grande frota automotiva e às condições climáticas da região que apresenta alta intensidade da radiação solar e temperaturas elevadas, que são favoráveis à formação de ozônio, durante quase o ano inteiro (CETESB 2000). O quadro atual do O₃ no estado de São Paulo, representado no relatório anual de qualidade do ar de 2008 elaborado pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Básico (CETESB), é preocupante em relação a este poluente. A Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), que compreende a capital e mais 34 municípios ao seu redor, apresenta saturação severa por O₃ (Fig. 1.2). Ao redor da RMSP, os graus de saturação apresentam-se mais amenos em direção às cidades do interior paulista, resultando em áreas desde saturação séria e moderada, até áreas em vias de saturação (Fig. 1.2) (CETESB 2009).

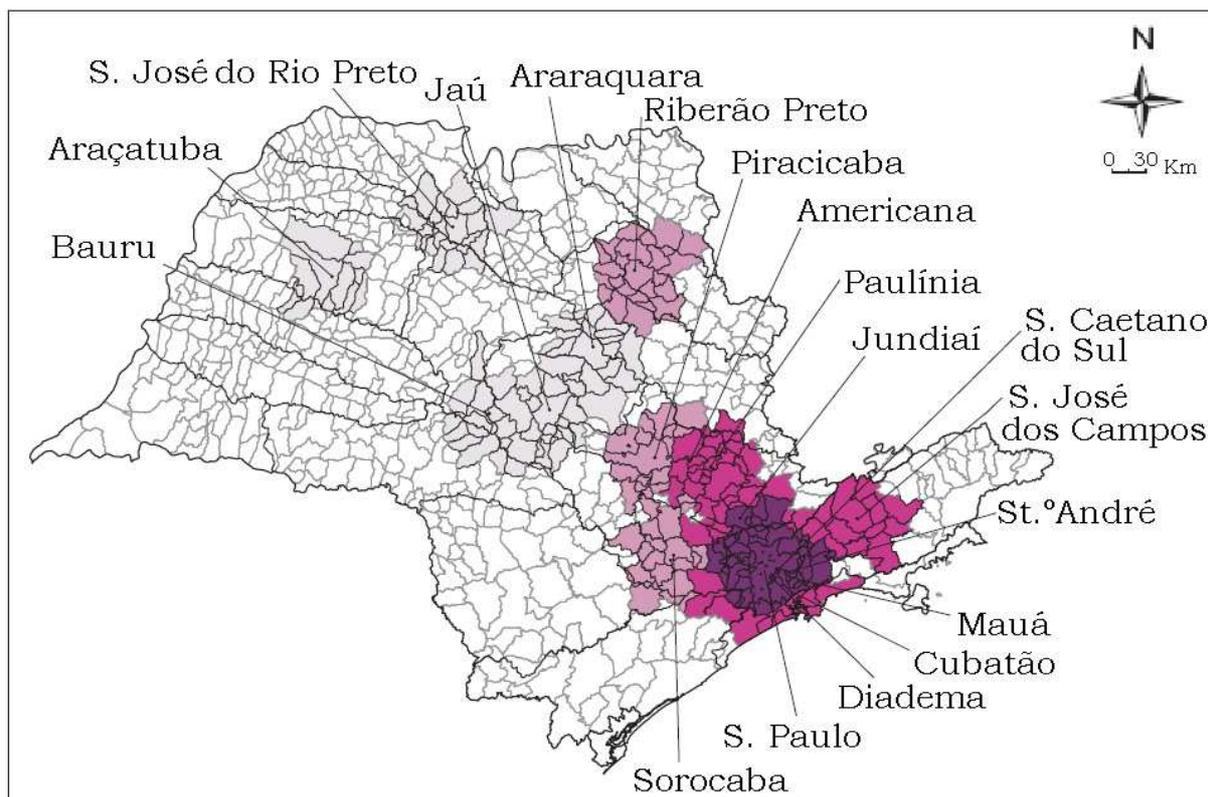


Figura 1.2 – Condições de saturação por ozônio no estado de São Paulo, segundo decreto estadual n.º 52469/07 (região saturada: apresenta mais de uma ultrapassagem do PQar (padrão de qualidade do ar) para determinado poluente, classificada em moderada, séria e severa de acordo com as concentrações máximas destas ultrapassagens; e região em vias de saturação: não apresenta ultrapassagem do PQar porém apresenta concentrações máximas maiores que 90% deste padrão. Fonte: CETESB, 2009 com modificações.

■ – saturação severa (maior que 120ppb) ■ – saturação séria (entre 100 e 120ppb) ■ – saturação moderada (entre 80 e 100ppb) ■ – em vias de saturação (entre 72 e 80ppb).

Sendo o interior do estado de São Paulo um setor de agricultura amplamente desenvolvido e diante do quadro atual do poluente O_3 em todo o estado, a CETESB buscou estabelecer um valor de referência que seria potencialmente tóxico às plantas agrícolas para este poluente, denominado Valor de Referência para Proteção da Produtividade Agrícola (VRPP). Este foi baseado na AOT40 (“Accumulated Ozone Threshold above 40 ppb h”), um índice proposto na Europa para proteção da vegetação, que se refere à exposição acumulada acima de 40 ppb. Tal índice é calculado a partir da somatória dos valores horários que excedem 40 ppb ($80 \mu\text{g}/\text{m}^3$); por exemplo, o valor de $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (= 50 ppb) observado em uma hora significa AOT40 igual a 10 ppb. Sendo assim, o VRPP estabelece que a AOT40 não pode ultrapassar 3.000ppb acumulados em 3 meses ou 200ppb acumulados em 5 dias (CETESB 2000).

1.2. Interação ozônio-planta

A alta toxicidade do O_3 às plantas e também aos demais organismos vivos deve-se ao seu alto poder oxidativo, gerando um quadro de estresse a partir do momento em que o poluente reage com água no espaço extracelular, onde gera a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}). Porém, cabe lembrar que a formação de EROs é um fenômeno natural, resultante do metabolismo do oxigênio, durante os processos de fotossíntese e respiração. A ocorrência de vida no ambiente aéreo só foi possível devido à evolução de um sistema de defesas antioxidativas, que envolve reações de oxi-redução. Assim, na ausência de fatores de estresse oxidativo, há um delicado balanço nas células vegetais entre a produção de EROs e o sistema antioxidante, formado por diversos compostos, entre os quais o ácido ascórbico (forma reduzida = AA, forma oxidada = DHA), a glutatona (forma reduzida = GSH, forma oxidada = GSSG) (Anexo 1) e as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR). Estes, em conjunto, neutralizam essas substâncias oxidativas e impedem danos celulares (Bray *et al.* 2000, Burkey *et al.* 2006, Luwe 1996, Muggli 1993).

No caso das plantas, a absorção do O_3 ocorre preponderantemente via estômatos, durante as trocas gasosas. Segundo modelo proposto por Baier *et al.* (2005), a presença do O_3 é sinalizada para a célula através de diferentes maneiras, conforme ilustrado na Fig. 1.3: (1) alterações na condutância iônica através da ativação de canais de cálcio, gerando o aumento do fluxo de Ca^{2+} para o citossol; (2) receptores de membrana específicos ainda desconhecidos, sensíveis ao O_3 , seriam estimulados ainda no apoplasto e traduziriam o sinal para o citossol; (3) peroxidação lipídica, radicais hidroxilas (OH^{\bullet}) que reagem com ácidos poli-insaturados da membrana gerando hidroperóxido lipídico (LOOH) que funcionam como sinalizadores ativando a biosíntese de ácido jasmônico; (4) H_2O_2 gerado no apoplasto se difunde para o interior da célula; (5) no apoplasto, o ácido ascórbico é oxidado (DHA) e vai para o interior da célula através de transportadores específicos; (6) alteração no conteúdo de glutatona devido a regeneração do DHA à AA; (7) e finalmente o O_3 que não reagiu no apoplasto pode atravessar a membrana por difusão, gerando as EROs diretamente no citossol. Todas essas possibilidades sinalizam o início de um processo chamado de “oxidative burst” ou “explosão oxidativa”, seqüência de outras reações oxidativas, gerando mais EROs através de processos endógenos. No interior da célula, entre outros efeitos, as EROs causam danos a membranas das organelas e a enzimas, alterando suas funções ao reagirem com grupos sulfidrilas com conseqüente formação de H_2O_2 . Destaca-se aqui a enzima ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (rubisco) que apresenta alta sensibilidade ao aumento de O_3 . As EROs

também são responsáveis por danos no DNA, uma vez que estas geram alterações em sua enzima reparadora (Heath 2002; Iriti & Faoro, 2007; Krupa & Manning, 1988; Sharma & Davis, 1997).

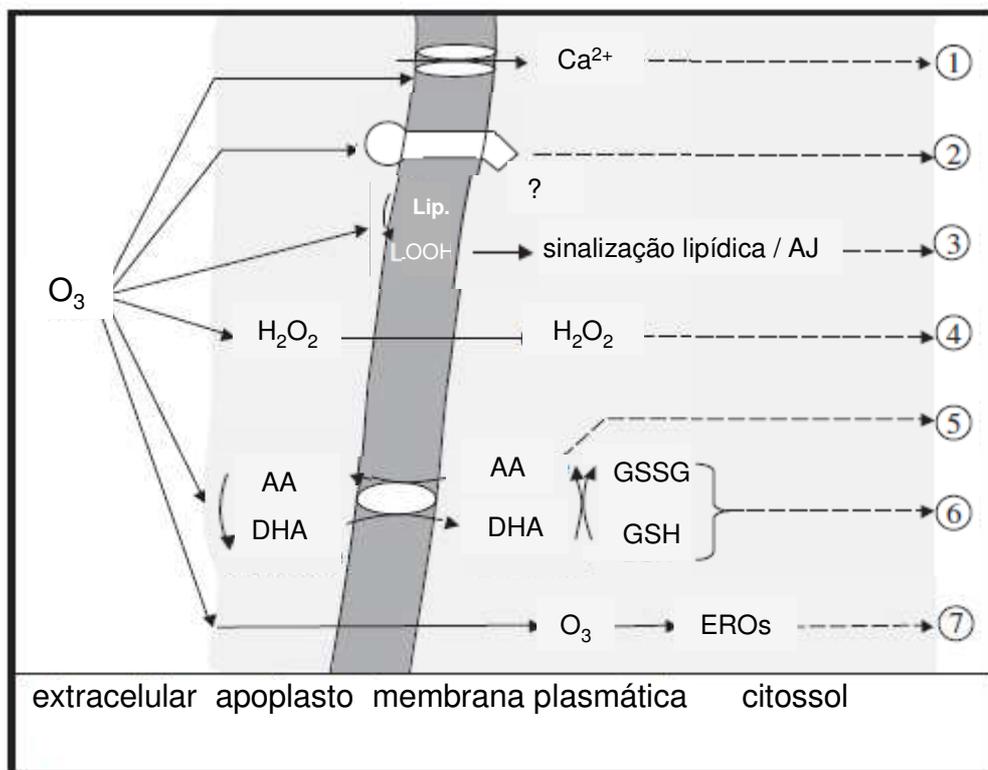


Figura 1.3. Modelo de possíveis sinalizadores de ozônio (O_3). H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; AA – ácido ascórbico; DHA – deidroascorbato; GSH – glutatona reduzida; GSSG – glutatona oxidada; EROs – espécies reativas de oxigênio; Lip. – lipídio (ác. poliinsaturado); LOOH – hidroperóxido lipídico; AJ – ác. jasmônico; Ca^{2+} – íons cálcio. (esquema modificado de Baier *et al.* 2005).

As injúrias foliares atribuídas ao poluente O_3 em plantas sensíveis parecem estar associadas a hormônios responsáveis pela resposta de hipersensibilidade a patógenos (HR), que culmina na morte celular programada. Sendo uma resposta semelhante, as injúrias induzidas por ozônio podem ser caracterizadas por uma resposta de hipersensibilidade semelhante ao ataque por patógenos (HR-like). Entre os hormônios mais estudados relacionados a resposta de hipersensibilidade, encontra-se a interação entre o ácido salicílico (AS), o ácido jasmônico (AJ) e o etileno. O AS aumenta o ataque oxidativo e o AJ o atenua; na presença do

O₃ ocorre a queda do AJ e o aumento do AS, que induz a morte celular e contribui para a síntese de etileno, hormônio que acelera a senescência foliar. Estudos com plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' demonstram aumento nos conteúdos de AS em plantas tratadas com ozônio (Iriti & Faoro 2007; Mancini *et al.* (2006). Baier *et al.* (2005) completam que o ácido abscísico (ABA) também pode ser alterado pela exposição ao O₃, não somente em plantas sensíveis, o que reforça a idéia de que o O₃ pode induzir o fechamento estomático em algumas plantas. Além da regulação hormonal, Mittler (2002) salienta que a sinalização através do acúmulo de peróxido está relacionada de forma intrínseca com a atividade das enzimas APX e catalase (CAT), sendo que a APX, devido a sua alta afinidade ao H₂O₂ reage a alterações muito pequenas nas concentrações deste, portanto é a responsável pela regulação fina do sinal. Assim, qualquer concentração de H₂O₂ acima de um limiar normal poderá gerar HR-like e conseqüente morte celular, enquanto que a CAT é responsável pela desintoxicação celular, e sua atividade é induzida em concentrações mais altas de H₂O₂.

Dentre as diversas conseqüências fisiológicas e ecológicas da exposição ao O₃, podemos destacar a diminuição da fotossíntese com alterações nas membranas e nos tilacóides do cloroplasto, mudanças na fluorescência, e principalmente a queda na concentração e inativação da enzima rubisco; alterações na eficiência hídrica com a diminuição da entrada de água e sais pelas raízes; aumento de infecções por patógenos ao alterar a palatibilidade; efeitos deletérios na floração e na formação do tubo polínico gerando perda na produtividade; e por fim alterações na produção de etileno, gerando a aceleração da senescência foliar. Cabe lembrar que todas estas alterações são mais expressivas em plantas sensíveis ao O₃, assim pode também ocorrer, em longo prazo, a seleção de espécies resistentes (Dizengremel *et al.* 2008, Domingos *et al.* 2002, Heath 2002, Iriti & Faoro 2007, Klumpp *et al.* 2006, Krupa & Manning 1988, Sharma & Davis 1997).

O organismo vegetal exposto ao O₃, por estar submetido a um quadro de estresse oxidativo, geralmente apresenta mudanças no Ciclo Ascorbato-Glutationa, também conhecido como Ciclo Foyer-Halliwell-Asada, que pode resultar na remoção e no controle de EROs e conseqüente diminuição de danos oxidativos. Este ciclo é composto por uma seqüência de reações, conforme esquema proposto por Sharma & Davis (1997) apresentado na figura 1.3. Inicialmente, a enzima SOD realiza a dismutação do O₂⁻ em H₂O₂, molécula ainda reativa que é na seqüência reduzida a água pela ação da APX, utilizando AA como substrato. Assim o AA é oxidado, passando para a forma de monodeidroascorbato (MDHA), que pode ser novamente reduzido a AA pela ação da enzima monodeidroascorbato redutase (MDHAR). Porém, o MDHA é uma molécula instável e, na grande maioria das vezes, é dismutado espontaneamente a deidroascorbato (DHA), que a volta a sua forma reduzida pela enzima

dehidroascorbato redutase (DHAR). Nessa reação, GSH é utilizada como substrato. A GSH, quando oxidada, passa para a forma de GSSG, que então é regenerada através da ação da enzima GR, por meio do consumo de NADPH. (Dizengremel *et al.* 2008, Halliwell & Gutteridge 2007, Mittler 2002, Sharma & Davis 1997).

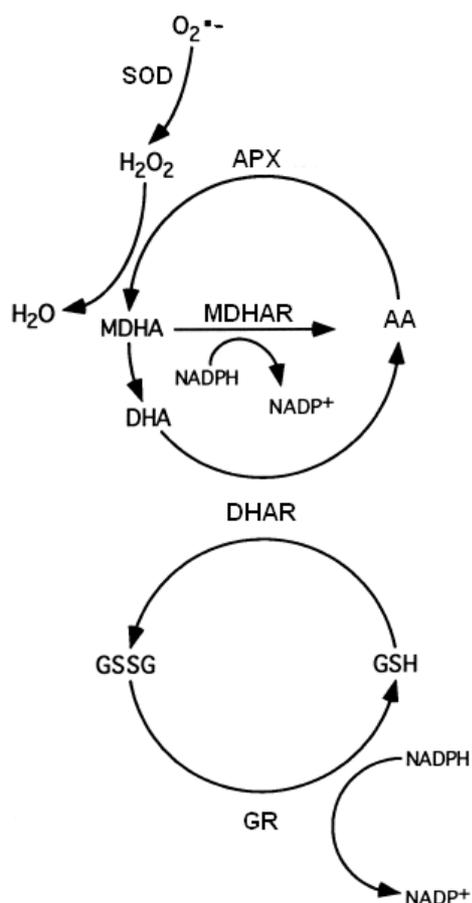


Figura 1.4. Ciclo Ascorbato-Glutationa. (esquema modificado de Sharma & Davis 1997). Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); enzima superóxido dismutase (SOD); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); enzima ascorbato peroxidase (APX) ácido ascórbico (AA - forma reduzida); monodeidroascorbato (MDHA - forma intermediária); deidroascorbato (DHA - forma oxidada); enzima deidroascorbato redutase (DHAR); glutatona (forma reduzida – GSH e forma oxidada – GSSG); enzima glutatona redutase (GR).

Plantas que possuem conteúdos altos e/ou alta capacidade de oxi-redução são mais tolerantes à poluição aérea (Gadallah 2000, Iqbal *et al.* 1996). Em espécies vegetais sensíveis ao O_3 e a outros poluentes oxidativos, por outro lado, os efeitos oxidativos em nível celular rapidamente se propagam nos tecidos vegetais, gerando sintomas foliares visíveis típicos.

Estes são indicadores efetivos do potencial de toxicidade do poluente no ar e, por isso, são muito utilizados em programas de biomonitoramento de qualidade do ar, enquanto métodos químicos de quantificação de O₃ limitam-se a determinar de forma numérica as concentrações deste poluente. Desse modo, plantas bioindicadoras sensíveis fornecem respostas biológicas integradas às mudanças ambientais com significados ecofisiológicos (Arndt & Schweiser 1991, Krupa & Manning 1988, Manning & Feder 1980, VDI 1999 e 2003).

1.3. *Nicotiana tabacum* ‘Bel –W3’, uma cultivar bioindicadora de ozônio

Em campos de produção de Tabaco, em Connecticut no início dos anos 50, foram observados danos foliares que inicialmente foram atribuídos ao clima, uma vez que apareciam somente quando havia alta incidência luminosa. Assim, estes danos vieram a ser chamados de “*weather flecks*” ou “manchas do clima”. Em 1955, foi relatado o pior episódio desse problema, quando 25% de uma plantação de tabaco foi destruída, resultando na perda estimada de 5 milhões de dólares. Em 1959, os pesquisadores Heggstad e Middleton, após a realização de estudos experimentais, atribuíram esse tipo de dano às elevadas concentrações de O₃ na região; após tal descoberta, as perdas foram reduzidas com o cultivo de novas cultivares tolerantes a este poluente. Nos anos seguintes o Centro de Pesquisa de Beltsville, utilizando as espécies de tabaco observadas em Connecticut, selecionou 3 cultivares que apresentavam diferentes graus de sensibilidade, são elas: Bel W3 - muito sensível, a Bel C - sensível e a Bel B - tolerante. As siglas Bel são referentes ao Centro de Pesquisa de Beltsville e cultivar W3 recebeu este nome por ter sido selecionada de uma plantação da Cigar Company W3 (Heggstad 1991).

Os danos visíveis induzidos pelo O₃ em *N. tabacum* ‘Bel W3’ se iniciam como pontos brilhantes nos espaços intervenais da superfície adaxial das folhas, progredindo rapidamente para pontos necróticos acinzentados ou amarronzados (Domingos *et al.* 2002, VDI 2003) (figura 1.5). Estas injúrias aparecem inicialmente nas folhas mais velhas, progredindo para as mais jovens com a exposição ao O₃ e podem levar ao amarelecimento total da folha, acelerando a senescência e a abscisão foliar (Sanz *et al.* 2002).

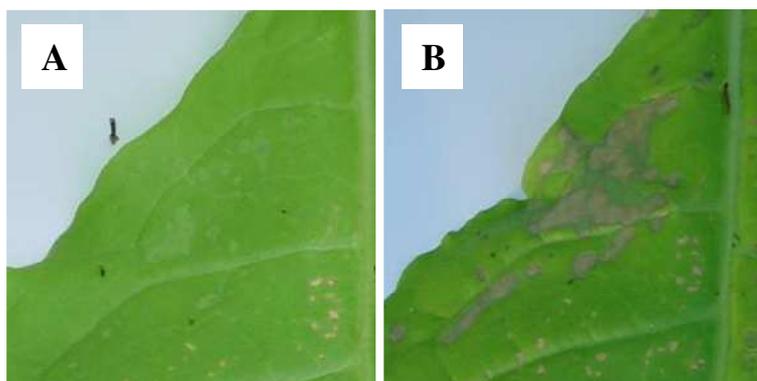


Figura 1.5 – Evolução de danos característicos após a exposição ao ozônio em Folha de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’. A – folha com estágio inicial de danos (leve depressão, em tom de verde mais claro, de partes da superfície adaxial) B – mesma folha já manifestando necroses, observadas 30 horas após o registro fotográfico anterior. Fotos de Marisa Domingos.

Nicotiana tabacum ‘Bel W3’ tornou-se uma planta bioindicadora sensível padronizada e vem sendo empregada para a qualificação dos níveis tóxicos de O₃ há várias décadas na Europa, com base na porcentagem de área foliar afetada pelas necroses acima descritas (Heggestad 1991, Klumpp *et al.* 2001, Vergé *et al.* 2002, VDI 2003).

Sabe-se que, sob condições de exposição de plantas bioindicadoras sensíveis nos locais de monitoramento, o surgimento de necroses nas folhas pode ser retardado, restringido ou intensificado pela ação conjunta de múltiplos fatores ambientais, entre os quais a natureza e concentração dos poluentes e fatores meteorológicos como temperatura, umidade relativa, velocidade do vento, irradiância e fotoperíodo (Kruppa & Manning 1988). Sendo assim, a função matemática linear entre porcentagem de área foliar afetada por sintomas e doses de exposição ao poluente, ideal para o estabelecimento de programas padronizados de biomonitoramento de qualidade do ar, não é alcançada com facilidade.

Autores como Peñuelas *et al.* (1999) já demonstraram que as variações meteorológicas podem interferir na eficiência da resposta bioindicadora de *N. tabacum* ‘Bel W3’, sob condições de clima temperado. Klumpp *et al.* (2006), em um estudo realizado por diversos países da Europa, observaram relação linear entre danos e concentrações de O₃ somente em duas cidades que apresentaram condições ambientais bem homogêneas. Explicam, ainda, em seu estudo que a fraca relação linear ocorre em resposta a diferentes condições ambientais e ao tempo de desenvolvimento da injúria que pode demorar de 1 a 2 dias para evoluir.

No Brasil, a cultivar Bel W3 de tabaco também foi utilizada em biomonitoramento qualitativo. Em estudos na região de Cubatão, no estado de São Paulo (Klumpp *et al.* 1994, Domingos *et al.* 1998), os autores verificaram que quanto mais distantes das fontes de poluição, maiores eram as porcentagens de danos foliares, uma vez que áreas bem próximas as fontes de poluição apresentam alta concentração de NO, o que acaba restringindo o acúmulo de ozônio às regiões mais afastadas, que possuem em seu entorno grandes vias de circulação de automóveis. Outro recente estudo avaliou o potencial de uso de *N. tabacum* Bel W3 como bioindicadora de ozônio na cidade de São Paulo, utilizando para isso o parâmetro de dano foliar relacionado à concentração de ozônio atmosférico (Sant'Anna 2007). Esse estudo confirmou que, nas nossas condições atmosféricas, a cultivar pode distinguir as áreas e as épocas do ano mais e menos contaminadas por ozônio, ou seja, para biomonitoramento qualitativo. Porém, a variação da porcentagem de danos foliares foi pouco explicada por variação na concentração de ozônio, fato que deveria ocorrer para que se pudesse utilizá-la de forma padronizada para biomonitoramento quantitativo (Sant'Anna *et al.* 2008).

Certamente os fatores meteorológicos afetam as trocas gasosas, regulando, também, o fluxo de ozônio para o interior das plantas e, assim, a intensidade de necroses foliares, conforme foi mencionado pelos citados autores. Mas, é possível supor, também, que as variações na concentração de O₃ e/ou nas condições meteorológicas podem alterar as respostas antioxidativas e a capacidade de oxi-redução das plantas, ao longo de sua permanência no ambiente em monitoramento e, por conseguinte, a manifestação de danos foliares em *N. tabacum* Bel W3. Esposito *et al.* (2009) demonstraram que o aumento da área foliar afetada por necroses em plantas dessa cultivar, ao longo do tempo de exposição, foi explicada pela redução dos níveis de ascórbico total, determinados por método espectrofotométrico, dois dias antes da análise da injúria e por maiores concentrações de O₃ cinco dias antes, verificando-se, assim, que essa hipótese é plausível e deveria ser testada de forma mais precisa.

Além disso, permanece, ainda, desconhecido se ocorrem variações na capacidade de oxi-redução de plantas dessa cultivar, quando expostas a variações nas condições ambientais de uma região contaminada por ozônio, e se estas podem modular sua eficiência para biomonitoramento em regiões urbanas brasileiras.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Com base nos aspectos anteriormente colocados, a seguinte hipótese foi testada na presente dissertação de mestrado: Variações na capacidade de oxi-redução de plantas de *N. tabacum* 'Bel W3', expostas em um local contaminado por O₃, ocorrem devido a uma resposta às oscilações nas condições ambientais e interferem no surgimento de injúrias foliares características da exposição a esse poluente. Uma vez comprovada tal hipótese, podem-se esperar mudanças na relação linear entre danos e concentrações de O₃ e diminuição da eficiência desta espécie para programas de biomonitoramento em regiões urbanas brasileiras.

Para testar essa hipótese, o presente estudo de mestrado objetivou:

1. Verificar se há variações na capacidade de oxi-redução em plantas de *N. tabacum* Bel-W3, expostas em ambiente contaminado por ozônio, em resposta a um conjunto de condições ambientais, tanto no que diz respeito à contaminação atmosférica propriamente dita quanto às condições meteorológicas;
2. Identificar quais fatores ambientais determinam preponderantemente as variações nos parâmetros indicadores da capacidade de oxi-redução mensurados nessas plantas;
3. Verificar como as variações na capacidade de oxi-redução interferem no surgimento e na intensidade de necroses foliares nas plantas expostas no ambiente contaminado e, assim, na eficiência da cultivar para biomonitoramento de ozônio em áreas urbanas brasileiras.

Este estudo de mestrado esteve inserido em um projeto maior financiado pela FAPESP (Proc. 05/51169-9): Respostas fisiológicas, antioxidativas e estruturais aos fatores ambientais em plantas bioindicadoras sensíveis a compostos do smog fotoquímico. Tal projeto visou identificar, entre as espécies *N. tabacum* 'Bel-W3', *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' e *Psidium guajava* 'Paluma' aquela cuja resposta bioindicadora de ozônio visível foi menos influenciada por reações fisiológicas, metabólicas e estruturais provocadas por fatores do ambiente durante o período de estudo, ao longo das quatro estações do ano de 2008.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Local de Exposição das Plantas

As exposições das plantas ocorreram em uma área pertencente ao Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado do Instituto de Botânica, situada no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga - PEFI (zona sul da cidade de São Paulo) (Fig. 3.1). Sua escolha fundamenta-se nos seguintes aspectos:

Os estudos com plantas bioindicadoras já demonstraram que esse local é intensamente afetado pelo *smog* fotoquímico e menos afetado por poluentes primários emitidos por veículos (Klumpp *et al.* 1994, Domingos *et al.* 2002, Sant'Anna 2007, Sant'Anna *et al.* 2008, Esposito *et al.* 2009);

1. Haveria espaço aberto suficiente para instalação dos sistemas de exposição das plantas;
2. As amostragens intensivas das plantas seriam viáveis, em virtude da pequena distância entre o sítio de exposição e os laboratórios onde seriam realizadas as análises.



Figura 3.1 – Foto de satélite da Região metropolitana de São Paulo, detalhe Parque estadual das fontes do Ipiranga PEFI. À direita foto aérea de parte do Instituto de Botânica, circunferência marca o local escolhido para exposição das plantas, pode-se visualizar a casa de vegetação. Fonte: Google maps.

A área do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) está situada na região metropolitana de São Paulo e abriga o terceiro maior fragmento de floresta nativa no município de São Paulo. (Barros *et al.* 2002). Segundo esses autores, o fragmento florestal do PEFI representa uma parte da Floresta Atlântica, refletindo uma condição pretérita de continuidade entre a floresta da costa e as do noroeste do estado.

3.2 - Cultivo e Exposição das Plantas

As plantas foram cultivadas a partir de sementes doadas pelo Dr. Andreas Klumpp, professor da Universidade de Hohenheim/Alemanha, as quais foram colocadas para germinar em caixas acrílicas do tipo gerbox. As plântulas originadas foram transplantadas para vasos plásticos de 1,5L contendo substrato comercial Plantimax (Eucatex) e vermiculita fina, misturados na proporção de 3:1, respectivamente. Estas estavam prontas para exposição, seguindo a recomendação do VDI (2003) (Anexo 2), quando tinham pelo menos sete folhas, em média, 2 meses após a semeadura. Durante o cultivo, as plantas permaneciam em casa de vegetação sob ar filtrado e sob condições climáticas favoráveis ao seu crescimento e recebiam, semanalmente, 100 ml da solução nutritiva recomendada por Epstein (1975) (Fig. 3.2 e 3.3).



Figura 3.2 – Casa de Vegetação vista externa (esquerda) e interna (direita).



Figura 3.3 – Cultivo de Plantas de *N. tabacum* ‘Bel W3’. À esquerda plântulas germinadas em caixa acrílica ‘Gerbox’, ao centro plântula transferida para vaso, à direita vista geral das plantas dentro da casa de vegetação.

Cada exposição em campo durava 14 dias e consistia na manutenção de plantas no ambiente natural do local de estudo, sob sombreamento de 50%, em suportes construídos segundo o modelo proposto por Arndt & Schweizer (1991) e por VDI (2003). Realizaram-se em todo o ano de 2008, 2 exposições no verão, 4 no outono, 6 no inverno e 5 na primavera. Ao longo do período experimental, ocorreram problemas no cultivo das plantas, que impediram a realização de seis exposições por estação como previamente programado, principalmente durante o verão devido ao calor excessivo. (Tab. 3.1).

Tabela 3.1 – Períodos das exposições de plantas de *N. tabacum* ‘Bel W3’ ao longo das estações climáticas durante o ano de 2008.

Estação	Exposição	Período
Verão	1	10 a 24 de janeiro
	2	24 de janeiro a 07 de fevereiro
Outono	1	07 a 21 de abril
	2	05 a 19 de maio
	3	19 de maio a 02 de junho
	4	16 a 30 de junho
Inverno	1	14 a 28 de julho
	2	28 de julho a 11 de agosto
	3	11 a 25 de agosto
	4	25 de agosto a 08 de setembro
	5	08 a 22 de setembro
	6	22 de setembro a 06 de outubro
Primavera	1	13 a 27 de outubro
	2	27 de outubro a 10 de novembro
	3	10 a 24 de novembro
	4	24 de novembro a 08 de dezembro
	5	08 a 22 de dezembro

Durante o cultivo e a exposição, as plantas foram irrigadas continuamente por meio de barbantes de náilon, sendo uma de suas extremidades mergulhada em água e a outra mantida em contato com o substrato, na altura das raízes (Fig. 3.4).

Cada exposição foi sempre iniciada com 18 plantas previamente numeradas e com a quarta folha marcada (considerando a folha número 1 como a mais velha), mantidas 2 estantes com 9 indivíduos em cada. Ao longo dos 14 dias, em três dias sorteados, eram retiradas seis plantas igualmente sorteadas para análise das respostas antioxidativas e da capacidade de oxi-

redução. Ao final de cada exposição um novo lote de 18 plantas era recolocado nas mesmas estantes (Fig. 3.4).



Figura 3.4 – À esquerda, vasos com barbantes de náilon inseridos da base, usados para a irrigação por capilaridade. Ao centro suporte com 9 plantas de *N. tabacum* ‘Bel W3’. À direita vista geral dos suportes na área de exposição.

3.3 - Condições ambientais durante o período experimental

Dados climáticos (temperatura, umidade relativa do ar, precipitação e radiação solar global) foram obtidas junto à estação meteorológica sediada no PEFI e gerenciada pelo Instituto Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo (IAG-USP).

Ao longo das exposições, as concentrações atmosféricas de O_3 e de NO_x , que são precursores desse poluente, foram monitoradas continuamente, com analisadores HORIBA, por integrantes da equipe do projeto (Jéssica B. Nobre & Silvia R. Souza) financiado pela FAPESP ao qual o presente plano de mestrado está vinculado.

As concentrações horárias de NO e NO_2 foram monitoradas somente até dia 31 de agosto devido a problemas técnicos com o analisador, data referente ao 7.º dia da 4.ª exposição de inverno.

3.4 - Antioxidantes

Todas as variáveis relacionadas ao sistema de defesas antioxidativas foram analisadas nas 6^a e 7^a folhas mais velhas das plantas sorteadas em cada dia de amostragem por exposição. As amostras foram sempre mantidas imersas em gelo picado em todas as etapas para garantir a integridade de seus componentes. As concentrações de ácido ascórbico, em suas formas reduzida (AA) e oxidada (DHA - ácido dehidroascórbico), eram realizadas em alíquotas de folhas frescas no mesmo dia de amostragem. Nesse dia, também eram extraídas amostras foliares para preparo de extratos para análise da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR), os quais eram congelados sob -80°C até o momento da finalização dos procedimentos analíticos. Ainda no dia de amostragem era congelado 1 g de folhas para posterior análise das concentrações de glutathione, em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Problemas de ordem analítica inviabilizaram algumas determinações de AA, de SOD e de GR. Os procedimentos analíticos são detalhados a seguir.

As concentrações de ácido ascórbico na forma reduzida (AA) e ácido ascórbico total (AA + DHA - ácido dehidroascórbico) foram obtidas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV, a 245 nm. A separação desses compostos foi realizada em coluna C18, com uma vazão de 1,00mL/min, utilizando-se como fase móvel solução aquosa acidificada (pH 2,3) com ácido ortofosfórico (H_3PO_4). A extração desses compostos do material vegetal foi feita através da homogeneização de folhas frescas com 6 ml de ácido metafosfórico (HPO_3) 6% contendo 0,5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os extratos vegetais obtidos foram centrifugados a 10.000 g sob temperatura de 2°C por 10 minutos e filtrados em papel filtro. Para a determinação do AA, 1 mL do extrato foi diluído com 4 mL de água, a solução resultante foi filtrada em membrana com poro de 0,45 μm e 20 μL dessa solução foi injetada no sistema cromatográfico. Para análise do ácido ascórbico total (AA + DHA), adicionaram-se à mesma quantidade de extrato (1mL) 0,4 mL de dithiothreitol (DTT) 0,2% misturado a tampão de fosfato de sódio com pH 7,0 e 0,2 mL fosfato de potássio monobásico (K_2HPO_4) 45%, para ocorrer a redução total do DHA para AA. Estes extratos foram mantidos no escuro por 15 minutos e, após esse período, a reação foi interrompida com 0,4 mL de 2M H_3PO_4 , adicionando-se 3 mL de água. Esse extrato foi também filtrado com membrana com poro de 0,45 μm e então 20 μL deste foi injetado. O conteúdo de DHA foi calculado pela subtração entre AA total e AA reduzido determinado inicialmente. Essa metodologia foi baseada na descrita por López et al. (2005). Com as concentrações em mãos, foram calculadas as razões AA/AA+DHA, seguindo proposta de

Burkey et al. (2006), com a finalidade de determinar a capacidade de oxi-redução do ácido ascórbico.

Os conteúdos de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona total (GSH + GSSG – glutathiona oxidada) foram obtidos em extratos preparados a partir de 1,0g folhas previamente congeladas sob -80°C , homogeneizadas em 3 ml de ácido sulfosalicílico 0,1%, que foram centrifugados a 12.000 g sob temperatura de 2°C por 20 minutos. Com o sobrenadante, foram realizadas duas reações e subsequentes duas leituras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 412nm. Para a primeira reação, visando à obtenção da GSH, 250 μL de extrato foram adicionados a uma mistura de 1,75mL de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,0 com 0,5mM de EDTA e 100 μL de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 3mM, e após 5 minutos foi realizada a primeira leitura. Na segunda reação, para a obtenção de GSH total, nesta mesma mistura foram adicionados 4 μL de enzima glutathiona redutase comercial e 100 μL nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) 0,4mM e após 20 minutos foi realizada a segunda leitura (Israr *et al.* 2006). O conteúdo de GSSG foi calculado pela subtração entre GSH total e GSH reduzida. Com as concentrações em mãos, foram calculadas as razões GSH/GSH+GSSG, com a finalidade de determinar a capacidade de oxi-redução da glutathiona.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada através do método proposto por Ramachandra Reddy et al. (2004) com modificações. O material vegetal foi homogeneizado em 5 ml solução extração contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, Triton 0,05%, polivinilpolipirrolidona (PVPP) 10% e 1 mM ácido ascórbico. O extrato resultante foi centrifugado a seguir por 10 min, a 10.000 g. O sobrenadante obtido foi dividido em duas alíquotas, pois este foi também utilizado para avaliar a atividade da enzima ascorbato peroxidase, que foram congeladas a -80°C . A atividade da enzima SOD foi medida em uma mistura de reação contendo nitro blue tetrazolium (NBT), metionina, EDTA, tampão fosfato 100mM pH 7,0, riboflavina e o extrato vegetal. Após 15 minutos de exposição à luz fluorescente (80W), mediu-se a absorbância da mistura, a 560 nm. Os controles de cada amostra eram protegidos da luz. A atividade da enzima foi determinada pela inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido.

A enzima ascorbato peroxidase (APX) foi obtida pela mesma extração da enzima SOD, descrita acima. Para determinação da atividade da APX, foi utilizada a metodologia proposta por Asada (1984), com modificações. Em uma mistura de reação a 30°C contendo 2,4ml tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 com 1 mM de EDTA foram adicionados 300 μL de ácido ascórbico 5mM e 300 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2 mM. A reação foi iniciada com a adição de 300 μL de extrato vegetal à mistura. A atividade da APX foi medida em um

espectrofotômetro UV/VIS a 290 nm, por 2 minutos, observando-se no decorrer desse tempo o consumo de AA utilizado pela enzima para decompor o H₂O₂ em água.

Para a extração da enzima glutationa redutase (GR), o material vegetal foi homogeneizado com PVPP (10%) em 3 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 com 5 mM de ácido ascórbico, 5mM de EDTA e DDT 5mM. O extrato obtido foi logo após centrifugado por 10 min, a 10.000 g e congelado à -80°C. A atividade da enzima foi medida em uma mistura de reação a 30 °C contendo 970µL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5, e 500µL de DTNB 1mM, onde foram adicionados 100 µL de NADPH 0,1mM e 100 µL de glutationa oxidada comercial 1mM. A reação era iniciada a partir da adição de 30 µL de extrato contendo a enzima GR, que realizava a redução da GSSG à GSH na presença de NADPH, e a atividade da enzima foi medida em espectrofotômetro a 412 nm, pela formação de composto formado pelo DTNB na presença de GSH (RAMACHANDRA REDDY et al. 2004).

3.5 - Injúrias foliares visíveis

Nas mesmas folhas das plantas analisadas para os antioxidantes e nas mesmas datas, foram estimadas as porcentagens de área foliar afetada por necroses tipicamente induzidas por ozônio, também seguindo o protocolo sugerido por VDI (2003). Essas análises foram realizadas por outros integrantes do mencionado projeto FAPESP (Daiane T. Silva & Regina M. Moraes).

A porcentagem de área foliar afetada por injúrias visíveis foi estimada visualmente, seguindo as recomendações de VDI (2003) e conforme adotado em vários estudos similares realizados nos continentes europeu e americano (HEGGESTAD, 1991; KLUMPP et al., 2001; VERGÉ et al., 2002). Os resultados foram expressos em classes de 5 em 5% de área foliar danificada (média de danos nas folhas analisadas por planta).

3.6 - Análises estatísticas e apresentação dos resultados

Realizaram-se análises de variância não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), seguidas de testes de comparações múltiplas (Teste de Student-Newman-Keuls ou de Dunn), quando pertinentes, para localizar diferenças nas respostas antioxidativas e na capacidade de oxi-redução das plantas entre exposições em uma mesma estação do ano e entre as estações do ano.

Optou-se pela apresentação desses resultados em gráficos do tipo *box-plot*. Nesse tipo de gráfico, a linha que divide os retângulos (*boxes*) indica a mediana dos dados; os retângulos delimitam os 25% dos dados acima e abaixo da mediana (percentis de 25 e 75); as barras de

erro mostram os valores menores situados entre os percentis de 10 e 25 ou maiores entre os de 75 e 90; os símbolos (●) apontam os valores extremos (abaixo do percentil de 10 ou acima do de 90).

As relações entre variações nos antioxidantes das plantas de *N. tabacum* 'Bel-W3', mantidas por 14 dias no local de estudo, nas diferentes exposições das quatro estações do ano, e variações nas condições ambientais foram testadas por meio de análises exploratórias de correlação de Pearson e multivariadas.

Inicialmente, realizaram-se análises de correlação de Pearson entre cada indicador do sistema antioxidante e fatores ambientais com o objetivo de verificar quais fatores, entre os meteorológicos (radiação solar global, umidade relativa do ar, temperatura e precipitação) ou os de poluição (O_3 , NO, NO_2) provavelmente influenciaram as respostas antioxidativas. No caso de O_3 , tais análises foram realizadas com concentrações máximas em cada dia e com doses acumuladas (AOTzero, AOT20 e AOT40). Além disso, procurou-se verificar se haveria uma defasagem de tempo entre uma mudança nas condições ambientais e seu reflexo sobre o sistema antioxidante. Assim, realizaram-se as análises de correlação entre valores médios de antioxidantes por planta amostrada em cada dia de amostragem, incluindo dados de todas as exposições, e valores médios dos mencionados fatores ambientais entre 2 e 6 dias anteriores a cada dia de análise dos antioxidantes, adotando esquema previamente proposto por Esposito et al. (2009).

Em seguida, foram realizadas análises de regressão multivariada com todo o conjunto de dados para determinar o quanto da variação nos níveis dos antioxidantes e na capacidade de oxi-redução de ácido ascórbico e de glutatona (variáveis dependentes) poderia ser explicado por fatores abióticos (variáveis independentes) e quais destes contribuiriam significativamente para explicar, agora de forma combinada, as oscilações nas respostas antioxidativas. Em tais análises, foram igualmente utilizados os valores médios dos mencionados fatores ambientais entre 2 e 6 dias anteriores a cada dia de determinação dos antioxidantes. No caso de O_3 , apenas uma das formas de expressá-lo foi incluída em cada modelo. NO e NO_2 foram desconsiderados nestas análises, devido à inexistência de dados para toda a primavera. As análises multivariadas foram realizadas pelo método *stepwise* (passo a passo). Quando necessário, os dados das variáveis dependentes foram transformados para alcançar a normalidade e igualdade de variância. O procedimento de ajuste de cada regressão iniciou com um modelo saturado, ou seja, com todas as variáveis presentes, removendo aquela de menor participação para explicar as variações nos antioxidantes. Novos ajustes foram feitos sequencialmente, seguindo o mesmo procedimento. Ao final, permaneceram no modelo somente as variáveis que contribuíram significativamente para

explicar as variações em cada indicador do sistema antioxidante. Com o conjunto de modelos explicativos e significativos em mãos, escolheu-se, para cada indicador, aquele com maior explicabilidade, ou seja, aquele que gerou o maior coeficiente de regressão (r^2).

Finalmente, realizou-se uma análise de componentes principais (ACP), incluindo resultados obtidos em cada estação do ano para a atividade das enzimas e concentrações de ácido ascórbico e de glutathiona, em suas formas reduzida e oxidada e porcentagem de área afetada por necroses tipicamente induzidas por O_3 , com a finalidade de resumir a variabilidade total dos dados e avaliar qualitativamente a relação entre níveis dos antioxidantes e intensidade de injúrias foliares. Para esta análise, foram usados os valores médios por planta obtidos em cada dia de amostragem, que foram transformados por ordenação.

4. RESULTADOS

4.1 - Condições ambientais durante o período experimental

As temperaturas mínimas e máximas registradas durante as estações climáticas do ano de 2008 ocorreram, respectivamente, na última exposição de outono (6,8°C) e na 1.^a exposição de primavera (34,3°C). Esta última também apresentou o maior valor médio por exposição (21,7°C). Os menores e maiores valores acumulados de radiação solar global ocorreram, respectivamente, durante a última exposição de outono (144,9 MJ/m²) e a 1.^a exposição de primavera (261,5 MJ/m²). A umidade relativa média por exposição ficou em torno de 80% em todo o ano, registrando-se o menor (24%) e o maior valor (100%) durante a 1.^a exposição de primavera. Observou-se a maior precipitação acumulada na última exposição de inverno (86,3 mm) e menor acúmulo na 1.^a exposição de inverno (0,2 mm) (Tab. 4.1).

Tabela 4.1 - Condições climáticas por período de exposição durante o ano de 2008. Médias, máximas e mínimas de temperatura (°C) e umidade relativa do Ar (%). Valores acumulados totais de precipitação (mm) radiação solar global (MJ/m²). Fonte: IAG/USP.

	Expo	Temperatura			Umidade			Precipitação	Radiação solar global
		médias	máx	mín	médias	máx	mín		
Verão	1	20,8	30,2	15,3	84,7	97,0	43,0	69,1	206,9
	2	20,1	29,2	13,5	83,6	97,0	46,0	56,5	213,2
Outono	1	20,8	30,4	14,2	84,1	98,0	42,0	37,8	187,5
	2	16,1	27,3	7,9	79,7	98,0	32,0	1,3	186,4
	3	17,6	27,9	9,6	76,7	97,0	31,0	18,8	183,9
	4	14,9	26,2	6,8	83,1	98,0	39,0	8,1	144,9
Inverno	1	16,3	28,5	7,2	70,5	97,0	25,0	0,2	231,7
	2	17,2	28,3	11,2	80,3	98,0	26,0	80,7	165,4
	3	18,7	30,0	9,9	74,2	98,0	22,0	6,3	223,0
	4	18,0	32,8	9,8	73,7	97,0	18,0	6,5	253,6
	5	16,5	33,4	8,9	80,6	97,0	25,0	32,4	208,5
	6	17,0	29,8	10,1	82,4	97,0	34,0	86,3	246,8
Primavera	1	21,7	34,3	15,4	77,5	100,0	24,0	67,1	261,5
	2	20,2	29,6	14,1	82,3	97,0	37,0	47,0	244,4
	3	19,0	31,8	11,3	82,6	99,0	28,0	74,2	257,6
	4	19,8	31,5	10,8	77,5	97,0	31,0	35,3	333,0
	5	20,2	32,9	13,9	81,5	97,0	24,0	156,6	268,5

Um perfil diário que caracteriza a presença do fenômeno “smog fotoquímico” no ambiente de estudo foi obtido através do perfil de concentrações de O₃, NO e NO₂ no decorrer de 1 dia. Este perfil se resume a três etapas: 1.^a) aumento das concentrações de NO, seguido de um aumento das concentrações de NO₂ durante as primeiras horas do dia; 2.^a) aproximadamente às 7h da manhã ocorre o início da formação de O₃, devido a radiação solar, e conseqüente consumo de NO, demonstrado pela queda em suas concentrações neste mesmo período; e 3.^a) ao final da tarde as concentrações de O₃ começam a cair e as de NO e NO₂ tornam-se novamente mais altas. Esta situação pode ser exemplificada, no período de estudo, pelo perfil diário destes poluentes do dia 16 de julho de 2008 (Fig. 4.1).

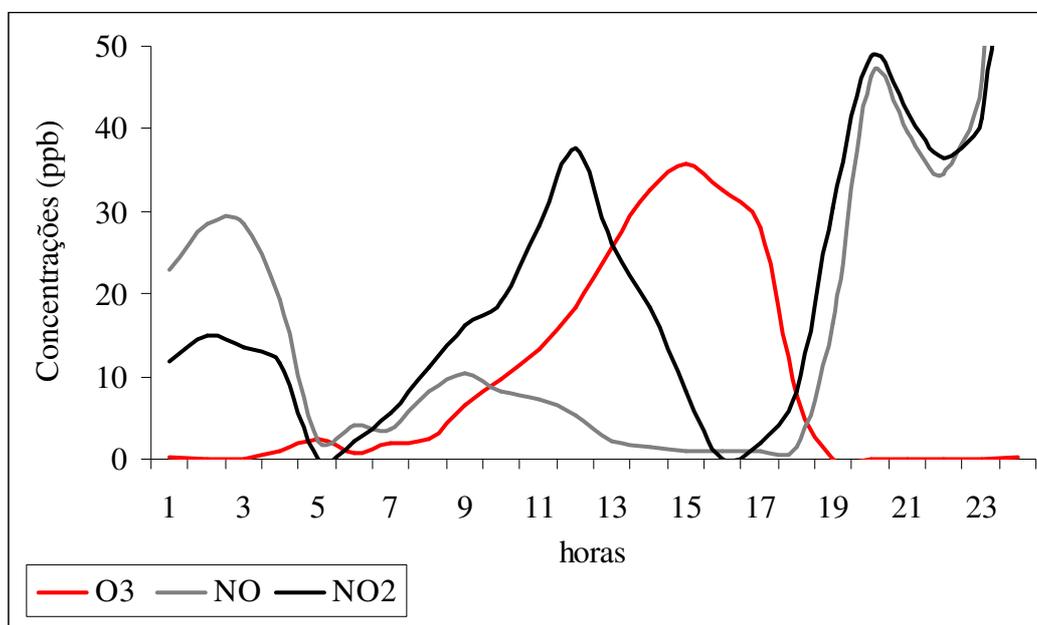


Figura 4.1 - Perfil diário das concentrações de ozônio e óxidos de nitrogênio. Dados referentes ao dia 16 de julho de 2008 durante a 1.^a exposição de inverno.

As concentrações horárias de NO e NO₂ foram monitoradas somente até dia 31 de agosto, considerando o período monitorado, na 4.^a exposição de inverno, registraram-se os maiores valores médios de NO (112,9 ppb) e de NO₂ (74,6 ppb), enquanto que nas 1.^a e a 2.^a exposições de verão, obtiveram-se os menores valores médios de NO (3,8 ppb) e de NO₂ (14,3 ppb) respectivamente. Os valores máximos encontrados durante o período monitorado ocorreram ambos na estação outono, durante a 3.^a exposição para NO (339,7 ppb) e durante a 4.^a exposição para NO₂ (261,9 ppb) (dados obtidos por Jéssica B. Nobre & Silvia R. Souza) (Fig. 4.2).

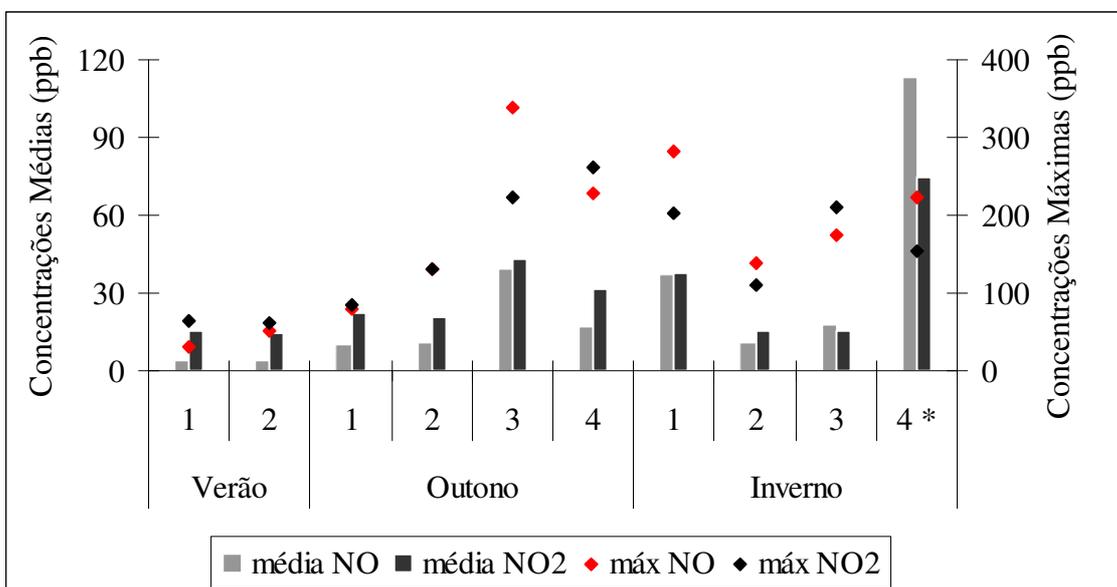


Figura 4.2 - Concentrações médias (eixo à esquerda) e máximas (eixo à direita) de NO e NO₂, referentes a cada período de exposição. * dados somente até o 7.º dia desta 4.º exposição de inverno.

A partir das concentrações horárias de ozônio durante o ano de 2008, obtidas por Jéssica B. Nobre & Silvia R. Souza, foram calculadas médias por exposição, com base nos valores horários registrados no período de luz dos períodos em que as plantas de *N. tabacum* foram expostas e foi identificada a concentração máxima horária ocorrida em cada exposição. As médias de O₃ se mantiveram em torno de 20ppb na maioria das exposições do ano, obtendo o menor valor (7,1 ppb) na 3.º exposição de outono e o maior valor (26,9 ppb) na 3.º exposição de inverno. O máximo valor horário de O₃ registrado durante as exposições de *N. tabacum* em 2008 (138,3 ppb) ocorreu no dia 11 de abril referente a 1.º exposição do outono, as exposições de verão também apresentaram valores máximos altos (102,3 e 129,3ppb) quando comparadas as demais exposições que apresentaram valores máximos geralmente em torno de 50 a 60ppb, com exceção da 3.º exposição de ozônio (29,7ppb) (Fig. 4.3).

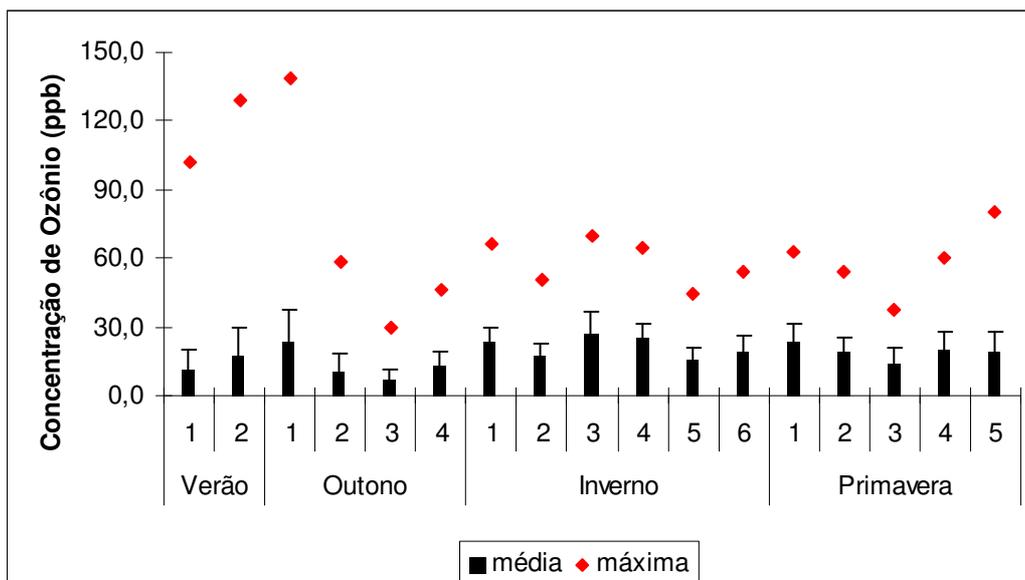


Figura 4.3 - Concentrações médias e máximas de ozônio referentes a cada período de exposição de plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as estações do ano de 2008.

Considerando a alta sensibilidade da espécie *N. tabacum* 'Bel W3' a poluente O_3 , além da AOT40 (somatória dos valores horários em ppb, após subtração de 40 ppb) usualmente utilizada para avaliação de riscos deste poluente à vegetação, também foi calculada a AOT20 (somatória dos valores horários em ppb, após subtração de 20 ppb), assim como a AOTzero (somatória de todos valores horários em ppb). Os maiores valores de AOT40 foram observados na 1.^a exposição de outono (597,2 ppb) e na 3.^a exposição de inverno (417,3 ppb), a qual apresentou a maior média de O_3 dentre todas as exposições, como citado anteriormente. A AOT40 foi zero, ou seja, não houve valores maiores que 40ppb/hora, durante as seguintes exposições: 2.^a do verão; 2.^a, 3.^a e 4.^a do outono; 5.^a do inverno; e 3.^a da primavera. Porém em todas as exposições foram registrados valores de AOT20, sendo o menor valor registrado na 3.^a exposição do outono (24,8 ppb), a qual também apresentou a menor média de O_3 entre todas exposições, como anteriormente citado. Os maiores valores de AOT20 ocorreram na 3.^a exposição do inverno (1594,8 ppb) e na 1.^a exposição da primavera (1388,6 ppb). A AOTzero das exposições de inverno e primavera foram em sua grande maioria superiores a 4.000ppb, alcançando o maior acúmulo registrado durante as exposições de *N. tabacum* (5.546,0ppb) no período referente a 4.^a exposição de inverno. A 2.^a e 3.^a exposições de outono apresentaram os menores valores de AOTzero (1363,9 e 1919,1ppb respectivamente) (Tab. 4.2).

Tabela 4.2 – Valores acumulados de ozônio totais (AOTzero), acima de 20ppb (AOT20) e acima de 40ppb (AOT40) referentes a cada período de exposição de plantas de *N. tabacum* ‘Bel W3’ durante as estações do ano de 2008.

Estação	Exposição	AOT20	AOT40	AOTzero
Verão	1	331,4	62,6	2566,1
	2	536,4	182,0	3336,5
Outono	1	1258,0	597,2	4138,9
	2	65,0	0,0	1363,9
	3	24,8	0,0	1919,1
	4	345,8	18,6	3521,1
Inverno	1	1398,8	195,8	4543,7
	2	623,8	90,9	3819,8
	3	1594,8	417,3	5506,1
	4	1227,9	211,5	5546,0
	5	338,5	7,5	4022,2
	6	521,3	55,0	4287,5
Primavera	1	1388,6	135,0	5506,5
	2	643,3	44,5	4684,0
	3	294,5	0,0	3515,5
	4	915,2	114,6	4707,5
	5	1057,4	242,4	4560,6

4.2 - Injúrias foliares visíveis

Os danos visíveis observados em *N. tabacum* ‘Bel W3’ se iniciavam como pontos brilhantes nos espaços intervenais da superfície adaxial das folhas, progredindo para manchas necróticas acinzentadas ou amarronzadas. Estas injúrias apareciam inicialmente nas folhas mais velhas, progredindo para as mais jovens com a exposição ao O₃ (Fig. 4.4). Este padrão de injúrias foliares foi observado em todas as estações do ano, porém foram mais frequentes durante o inverno e a primavera, ocorrendo em todas as exposições (dados obtidos por Daiane T. Silva & Regina M. Moraes).

Considerando a porcentagem de área foliar afetada, foram estimados valores medianos, médios, máximo e mínimo, entre as plantas analisadas em cada exposição. A porcentagem de área foliar mínima encontrada foi igual a zero em todas as exposições, o que significa que pelo menos uma planta de cada exposição não apresentou injúrias foliares visíveis. O maior valor médio encontrado (19,9%), assim como a máxima porcentagem de área foliar danificada (87,5 %) foram encontrados na 5.^a exposição de inverno. O valor mediano foi igual a zero em todas as exposições de verão, outono e inverno, este evento representa que o número de plantas afetadas não alcançou a metade das plantas analisadas durante estas estações. Porém, durante a 2.^a e 5.^a exposições da primavera, a mediana

apresentou valor igual á 3% e 1,5% respectivamente, portanto nestas exposições mais da metade das plantas apresentou danos foliares (Tab. 4.3).

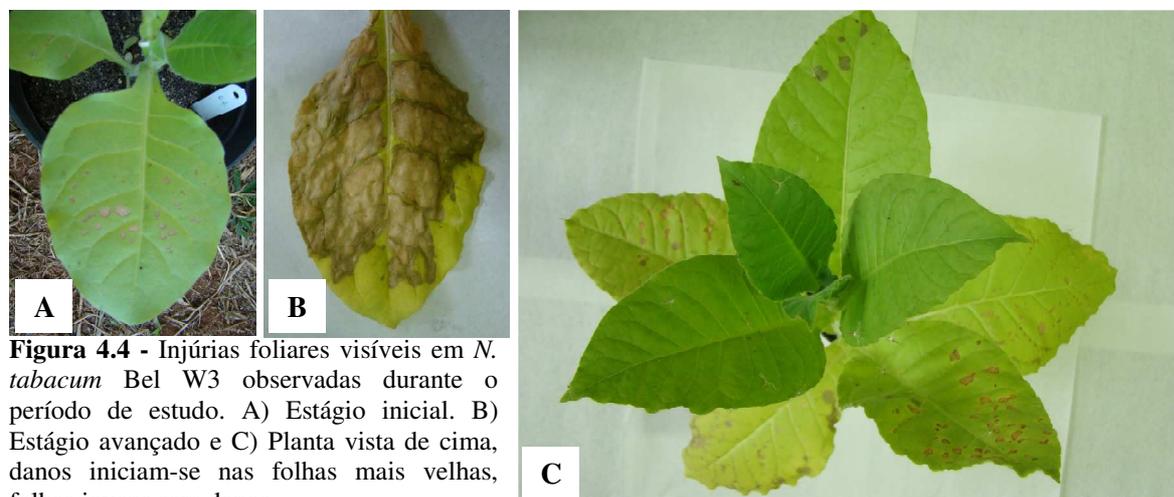


Figura 4.4 - Injúrias foliares visíveis em *N. tabacum* Bel W3 observadas durante o período de estudo. A) Estágio inicial. B) Estágio avançado e C) Planta vista de cima, danos iniciam-se nas folhas mais velhas, folhas jovens sem danos.

Tabela 4.3 - Análise descritiva da porcentagem de área foliar coberta por necroses de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3', por período de exposição durante o ano de 2008. Valores médios, medianas, mínimos e máximos.

	Expo	% média	% mediana	% mínima	% máxima
Verão	1	0,3	0,0	0,0	3,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0
Outono	1	6,8	0,0	0,0	67,5
	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	1,0	0,0	0,0	3,0
	4	0,5	0,0	0,0	3,0
Inverno	1	0,5	0,0	0,0	3,0
	2	0,1	0,0	0,0	3,0
	3	1,9	0,0	0,0	37,5
	4	5,6	0,0	0,0	57,5
	5	19,9	0,0	0,0	87,5
	6	0,3	0,0	0,0	3,0
Primavera	1	1,5	0,0	0,0	7,5
	2	5,3	3,0	0,0	37,5
	3	1,4	0,0	0,0	17,5
	4	0,3	0,0	0,0	3,0
	5	6,0	1,5	0,0	77,5

4.3 - Antioxidantes

Em geral, não houve diferenças significativas entre as folhas 6 e 7 para os antioxidantes avaliados (enzimáticos e não enzimáticos) das plantas amostradas ao longo do período experimental. Desse modo, os resultados apresentados a seguir foram originados de médias por planta, sendo cada uma considerada uma unidade amostral.

Além disso, as respostas antioxidativas das plantas variaram entre os dias de amostragem de cada exposição, porém parecendo ser mais em função de oscilações nas condições ambientais do que em função da idade ou mesmo das plantas analisadas. Visto que não foi verificada uma linha de tendência evidente que indicasse acréscimo ou decréscimo na atividade ou concentração dos compostos analisados ao longo do tempo de exposição (dados não mostrados). Sendo assim, optou-se por mostrar as variações entre exposições em cada estação do ano e variações sazonais (Figs. 4.5 a 4.15). Cabe ressaltar, no entanto, que todos os dados obtidos por planta e por dia de amostragem contribuíram para a construção dos *box-plots* e para a análise das relações entre os indicadores antioxidantes e os fatores ambientais.

Foram observadas diferenças nas atividades enzimáticas de plantas de *N. tabacum* entre exposições de cada estação do ano, conforme mostram as Figs. 4.5 a 4.7.

Durante o verão, a atividade das enzimas APX e SOD foram significativamente mais baixas na 1.^a exposição em relação a 2.^a exposição (Figs. 4.5 – verão e 4.6 – verão), enquanto que a atividade da enzima GR foi similar nas duas exposições desta estação (Fig. 4.7 – verão).

Durante o outono, a atividade da APX foi menor durante a 4.^a exposição, em comparação com as exposições 2 e 3 (Fig. 4.5 – outono) e a atividade da GR também foi mais baixa nessa 4.^a exposição, porém somente em relação aos resultados encontrados no 3.^o período de exposição (Fig. 4.7 – outono). Por outro lado, a SOD apresentou menores atividades durante a 1.^a exposição, quando comparada às duas últimas (Fig. 4.6 – outono).

Durante o inverno, a atividade da APX foi maior na primeira exposição ao compará-la com a medida nas plantas da 3.^a, 5.^a e 6.^a exposições. Além disso, a atividade dessa enzima foi mais alta nas plantas das exposições 2 e 4 em relação à atividade medida na última (Fig. 4.5 – inverno). A SOD apresentou maiores atividades nas plantas expostas durante as 1.^a e 2.^a exposições somente quando comparadas a 5.^a exposição (Fig. 4.6 – inverno), enquanto a enzima GR apresentou maiores atividades durante a 6.^a exposição somente quando comparado a exposição 3 desta estação (Fig. 4.7 – inverno).

Durante a primavera, a menor atividade da APX foi obtida nas plantas da 2.^a exposição e a maior na 5.^a exposição (Fig. 4.5 – primavera). Para SOD, observou-se resultado oposto (maior atividade 2.^a e menor na 5.^a exposição) (Fig. 4.6 – primavera), enquanto que a

atividade da GR não variou significativamente entre todas as exposições da primavera (Fig. 4.7 – primavera).

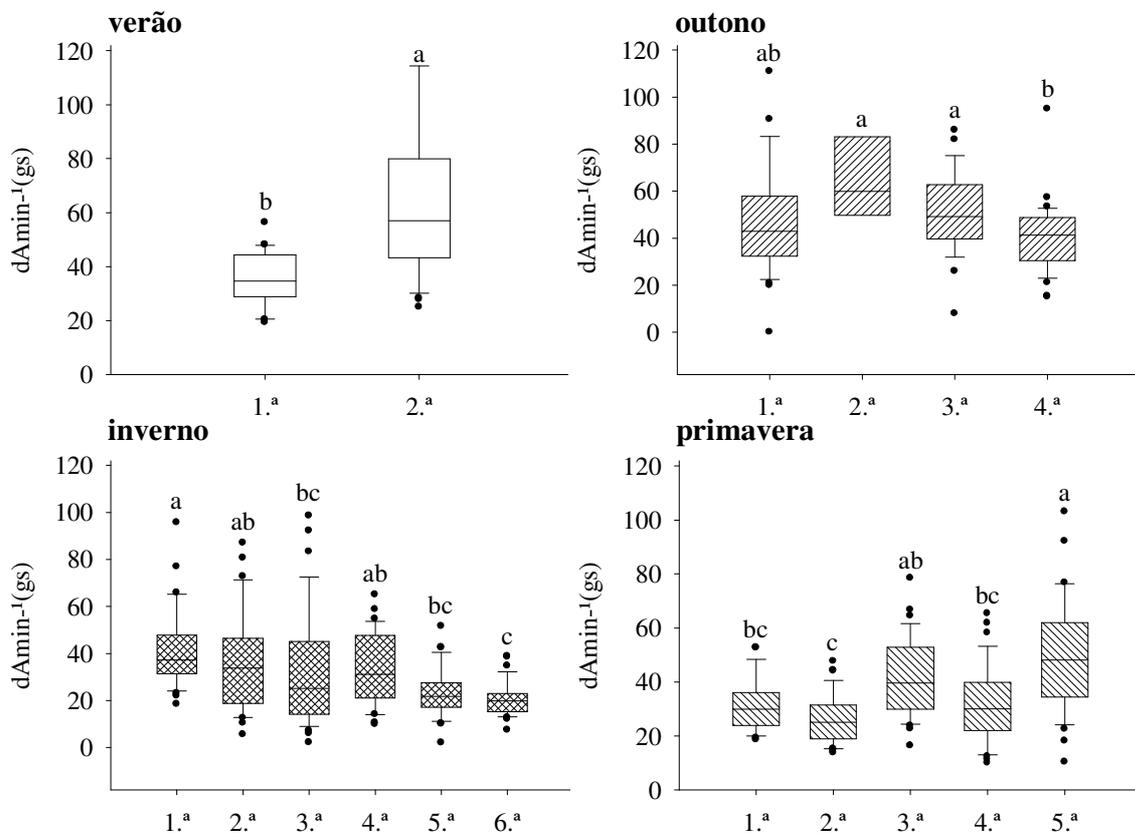


Figura 4.5 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as diferentes exposições de todas as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação (P = <0,001).

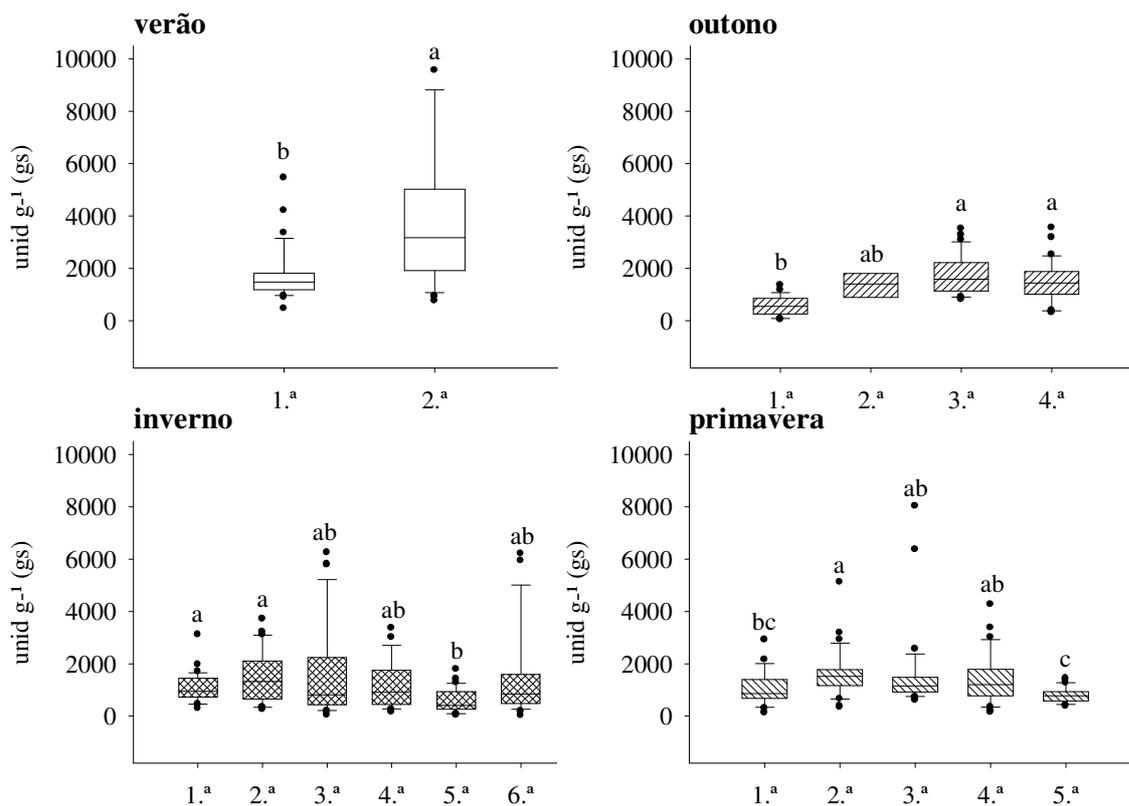


Figura 4.6 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as diferentes exposições de todas as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação ($P = <0,001$).

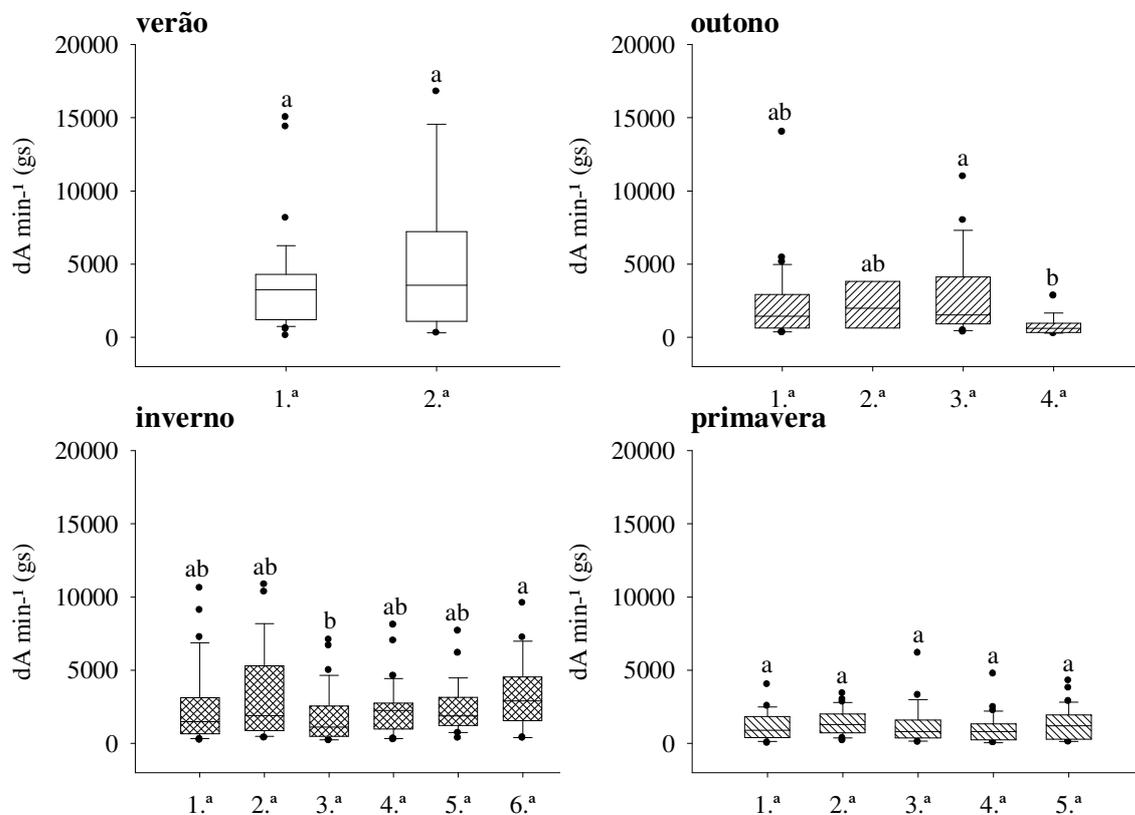


Figura 4.7 - Atividade da enzima glutationa redutase (GR) em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as diferentes exposições de todas as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação ($P = <0,001$).

Quando as estações do ano são avaliadas em um conjunto, observa-se, de uma maneira geral, que todas as enzimas analisadas em plantas de *N. tabacum* tiveram suas maiores atividades durante as exposições do verão, quando comparadas às exposições do inverno e primavera (Fig. 4.8 – APX, SOD e GR). Porém cabe ressaltar que a enzima APX se manteve alta também durante o outono, em relação ao verificado no inverno e primavera (Fig. 4.8 APX). A enzima SOD foi também significativamente menos ativa nas plantas expostas no outono em comparação com os resultados do verão (Fig. 4.8 SOD). Por fim, a atividade da enzima GR determinada nas plantas do inverno foi significativamente maior do que nas plantas da primavera (Fig. 4.8 GR).

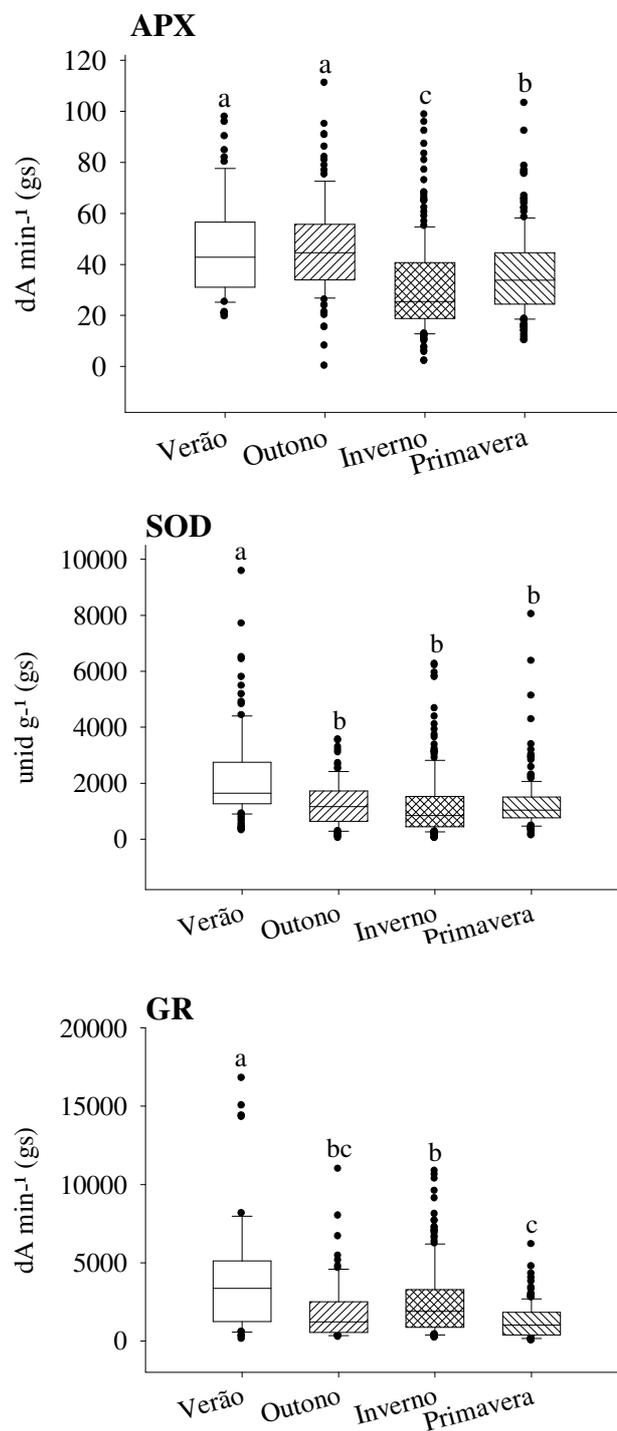


Figura 4.8 - Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GR) em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as diferentes estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as estações do ano para cada enzima ($P = <0,001$).

Foram observadas alterações no estado redox dos compostos de ácido ascórbico e glutatona em plantas de *N. tabacum*, demonstradas pelas mudanças nas concentrações destes nas suas formas reduzidas (AA e GSH) e oxidadas (DHA e GSSG), assim como nas razões AA/AA+DHA e GSH/GSH+GSSG., que evidenciam a proporção de alteração entre estes dois compostos, (Figs. 4.9 a 4.15).

Em todas as exposições, foram obtidas concentrações maiores de AA (forma reduzida) em relação às concentrações de DHA (forma oxidada). Houve alterações nos conteúdos de AA e DHA entre as exposições de cada estação, assim como a razão entre estes compostos (Fig. 4.9 a 4.11).

Durante o verão, as plantas expostas na 1.^a exposição tiveram menores concentrações de AA em relação à 2.^a exposição (Fig. 4.9 – verão). Nesta mesma estação, o conteúdo de DHA foi similar nas plantas de ambas as exposições (Fig. 4.10 – verão). Quando avaliado o estado redox do AA, durante a 1.^a exposição, estimou-se razão menor devido aos menores conteúdos de AA (Fig. 4.11 – verão).

Durante o outono, nas 1.^a e 3.^a exposições foram obtidos maiores valores de AA, comparando-se com os níveis de AA determinados nas plantas expostas durante a 2.^a exposição (Fig. 4.9 – outono), enquanto que para DHA as oscilações entre as estações foram menores, ocorrendo diferença significativa somente entre os maiores valores encontrados na 3.^a exposição e os menores valores encontrados na 1.^a exposição (Fig. 4.10 – outono). Em relação a razão, maiores valores ocorreram na 1.^a exposição em decorrência dos valores baixos de DHA. Nas demais exposições desta estação, as razões foram mais baixas (Fig. 4.11 – outono).

Em todas as exposições de inverno, observa-se o mesmo perfil para AA e DHA. Para ambas as formas de ácido ascórbico, os valores mais altos foram determinados nas plantas da 1.^a exposição, em relação às demais exposições (Figs. 4.9 – inverno e 4.10 – inverno) A queda nos conteúdos de DHA foi mais representativa nas três últimas exposições (Fig. 4.10 – inverno). Quando avaliadas as razões entre estes dois compostos, uma tendência oposta foi observada entre o estado redox do AA e as concentrações de AA e DHA, ou seja, as razões foram mais baixas nas 3 primeiras exposições, intermediárias na 4.^a exposição e mais altas na última, refletindo as maiores concentrações de AA em relação ao DHA (Fig. – 4.11 inverno).

Na primavera, houve variações similares entre exposições no conteúdo de AA e DHA, sendo determinadas maiores concentrações foliares na última exposição quando comparadas às demais (Fig. 4.9 – primavera e 4.10 – primavera). O estado redox das plantas nesta estação apresentou-se mais alto na 4.^a exposição em comparação com as demais exposições, refletindo maior conteúdo de AA proporcionalmente ao de DHA (Fig. 4.11 – primavera).

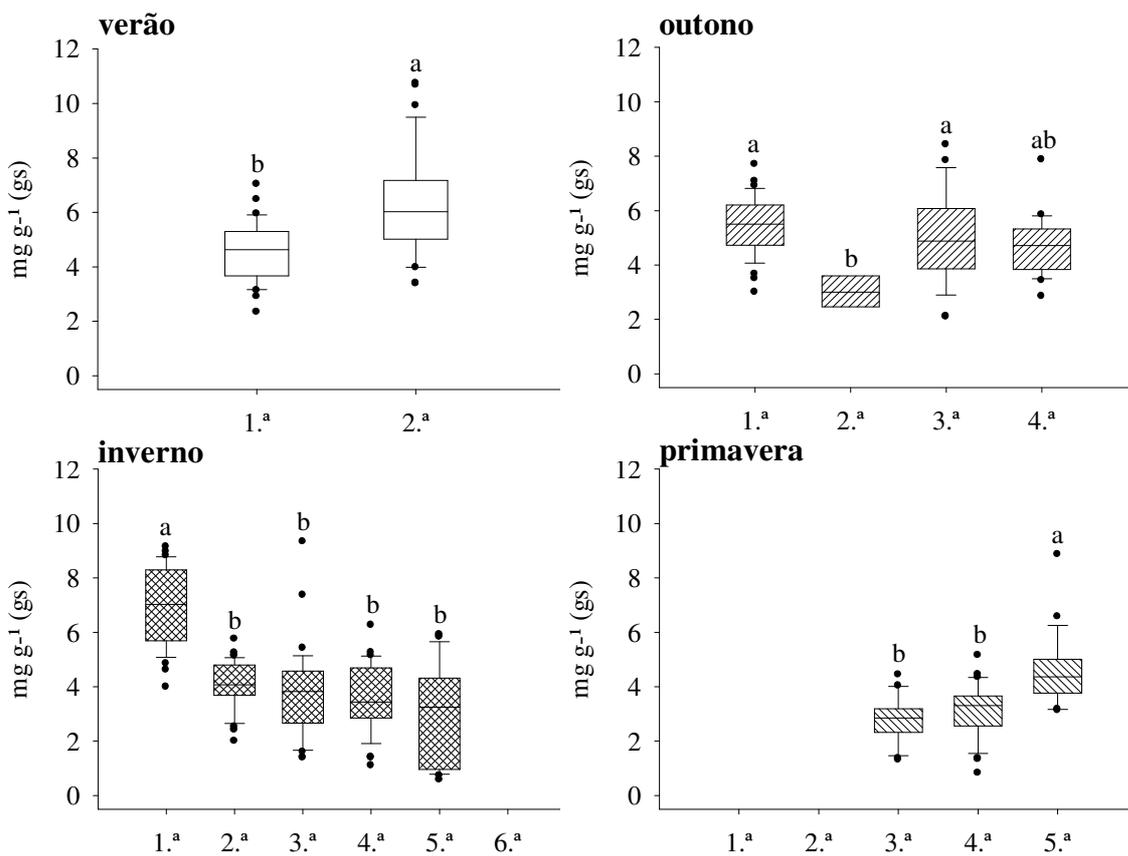


Figura 4.9 - Concentrações de ácido ascórbico (AA) em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as diferentes exposições de todas as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação do ano ($P < 0,001$).

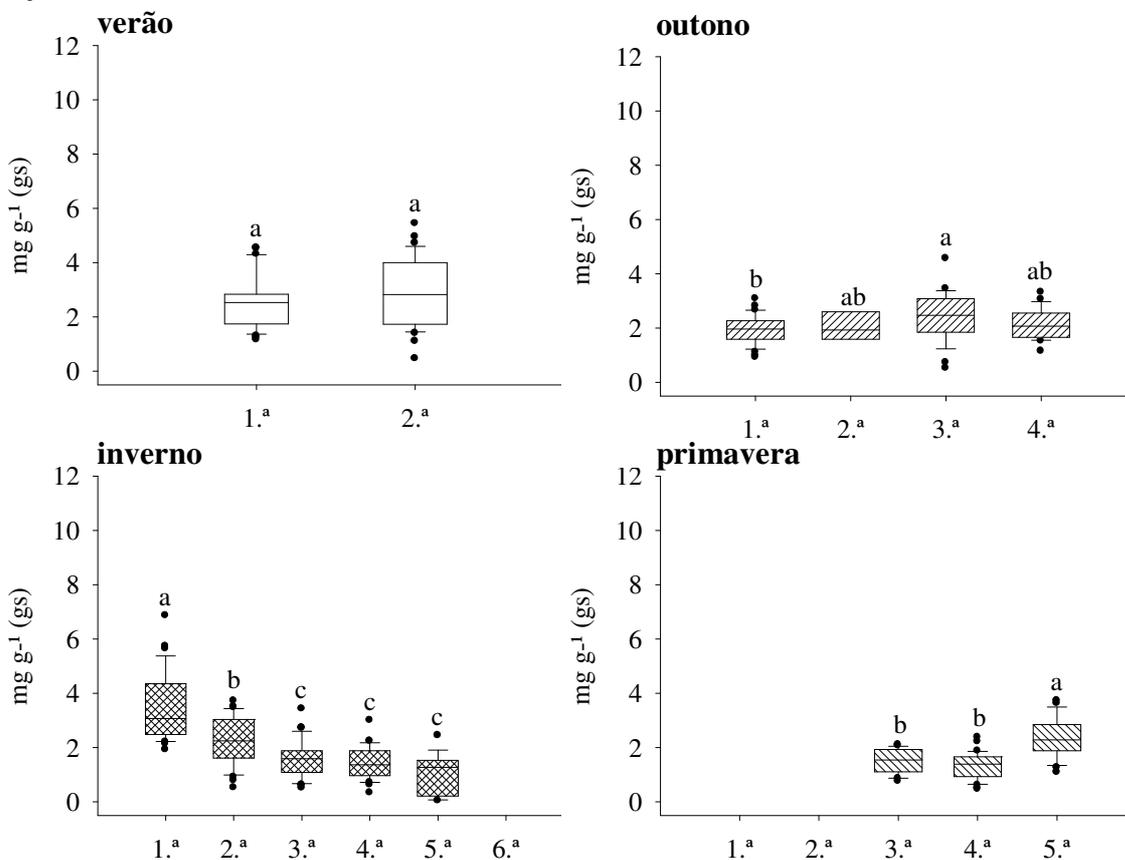


Figura 4.10 - Concentrações de deidroascorbato (DHA) em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as diferentes exposições de todas as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação do ano ($P < 0,001$).

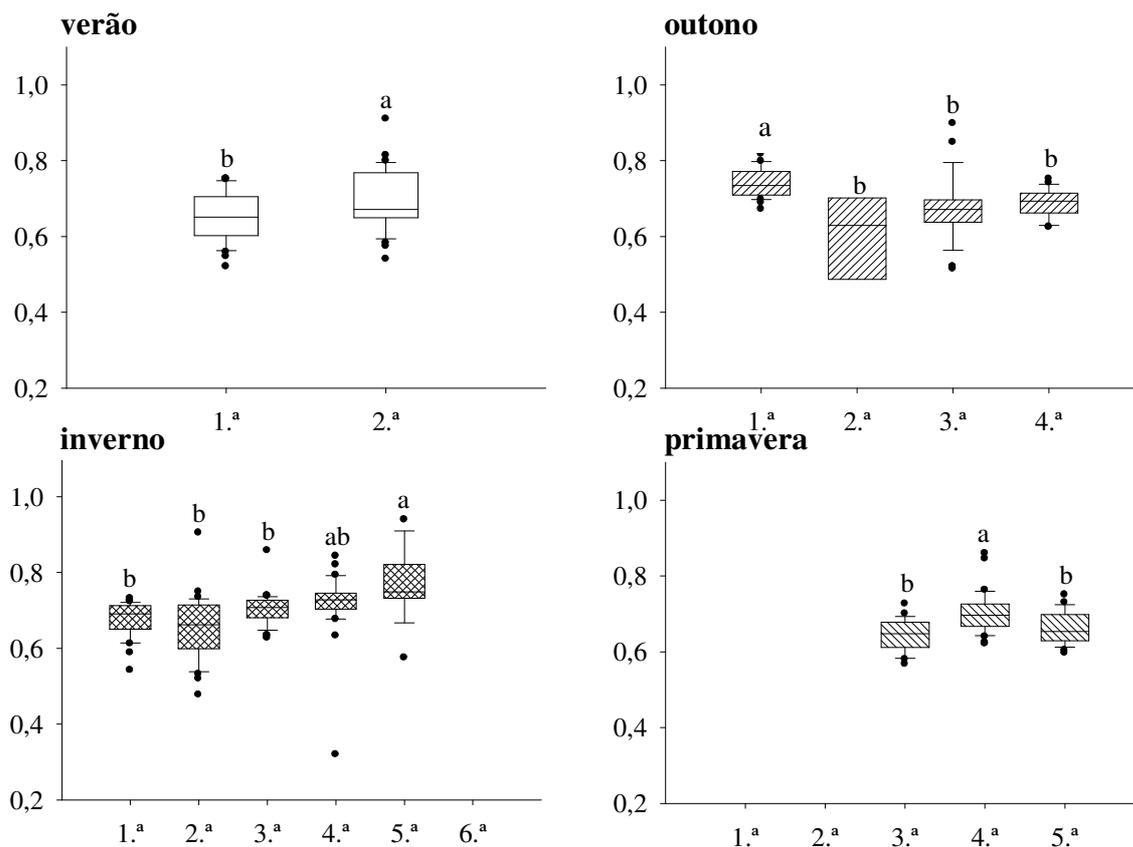


Figura 4.11. Razão entre as concentrações AA por AA + DHA (mg-1(gs)) de em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as exposições de todas as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação ($P = <0,001$).

Em todas as exposições, foram obtidas concentrações maiores de GSH relativas às concentrações de GSSG, do mesmo modo que foi verificado para o ácido ascórbico.

Durante o verão, não foram observadas alterações nas concentrações de GSH ou GSSG (Fig. 4.12 – verão e 4.13 – verão), padrão refletido nas razões obtidas desta estação (Fig. 4.14 – verão).

No outono, por outro lado, os valores de GSH foram mais altos nas plantas da 1.^a exposição somente quando comparados aos valores encontrados na exposição 4 (Fig. 4.12 – outono), enquanto que, para GSSG, observou-se nível significativamente maior nas plantas da 3.^a exposição em comparação com o verificado nas demais exposições (Fig. 4.13 – outono). Pode-se observar também variação nos valores da razão entre estes compostos para esta estação, sendo estimadas maiores razões na 1.^a exposição, quando comparadas às obtidas nas demais, que refletem o aumento dos conteúdos de GSH naquele período (Fig. 4.14 – outono).

Na estação de inverno, os conteúdos de GSH foram maiores nas plantas da 1.^a exposição quando comparados aos obtidos em plantas das 4.^a a 6.^a exposições. Na quinta exposição, as plantas também continham significativamente menos GSH do que as das 2.^a e 3.^a exposições. (Fig. 4.12 – inverno). Porém, para GSSG, as concentrações se mantiveram similares em todas as exposições e foram mais baixas do que as de GSH durante toda a estação (Fig. 4.13 – inverno).

Durante a primavera, houve maiores concentrações de GSH nas três primeiras exposições, intermediária na 4.^a e menor na 5.^a exposição (Fig. 4.12 – primavera). Para GSSG, as plantas amostradas se apresentaram com concentrações mais altas na 3.^a e 4.^a exposições, intermediárias na 1.^a e 5.^a, e mais baixas durante a 2.^a exposição (Fig. 4.13 – primavera).

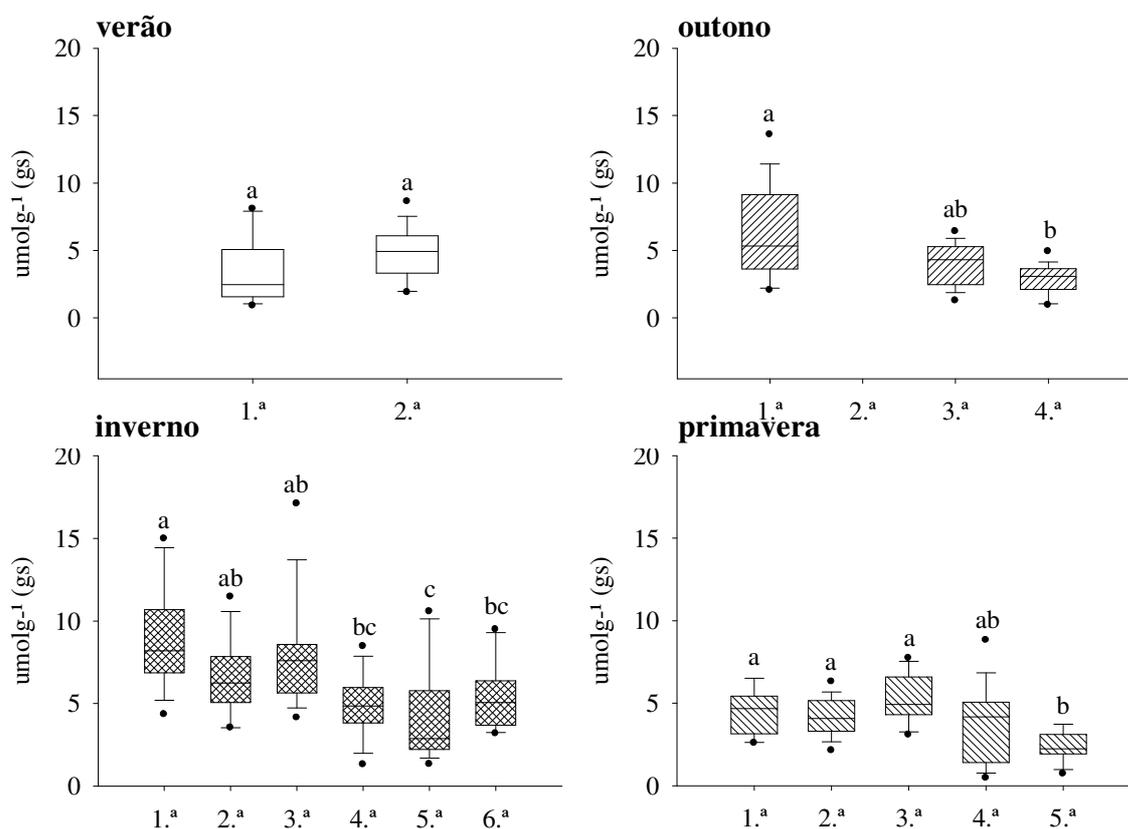


Figura 4.12 - Concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as diferentes exposições de todas as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação do ano ($P = <0,001$).

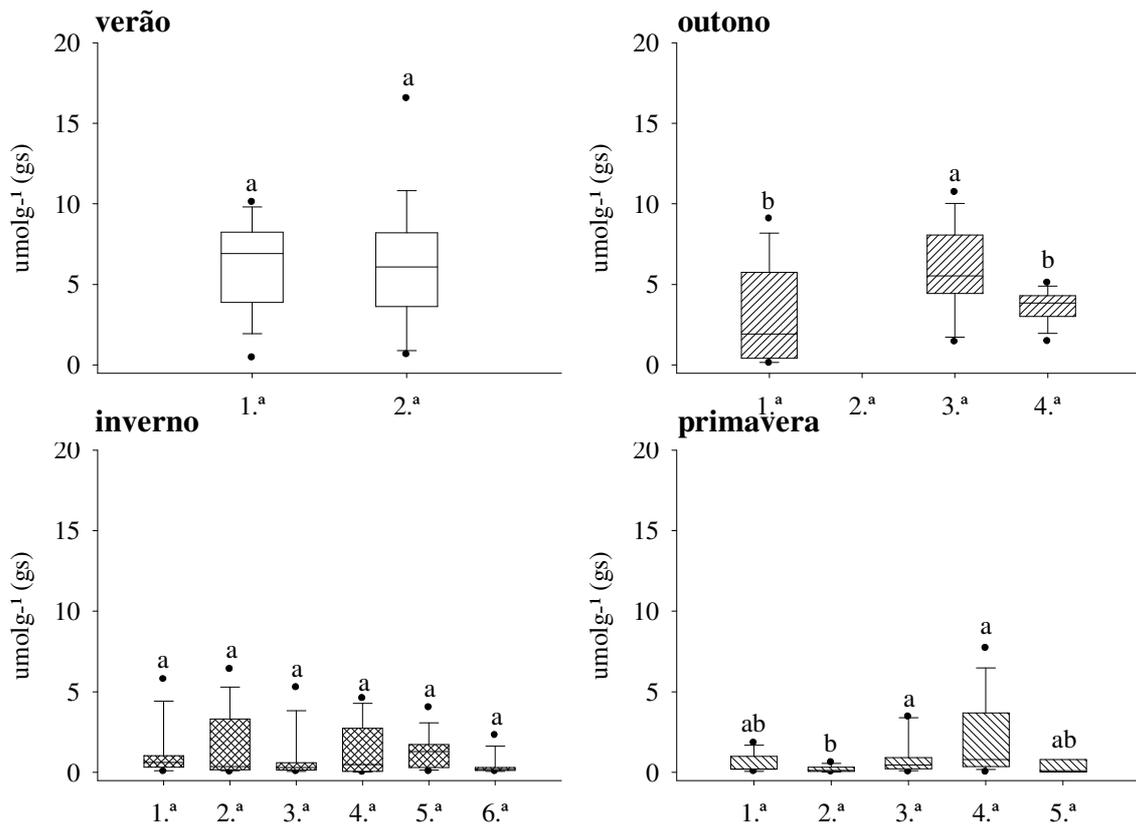


Figura 4.13 - Concentrações de glutatona oxidada (GSSG) em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as diferentes exposições de todas as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação ($P = <0,001$).

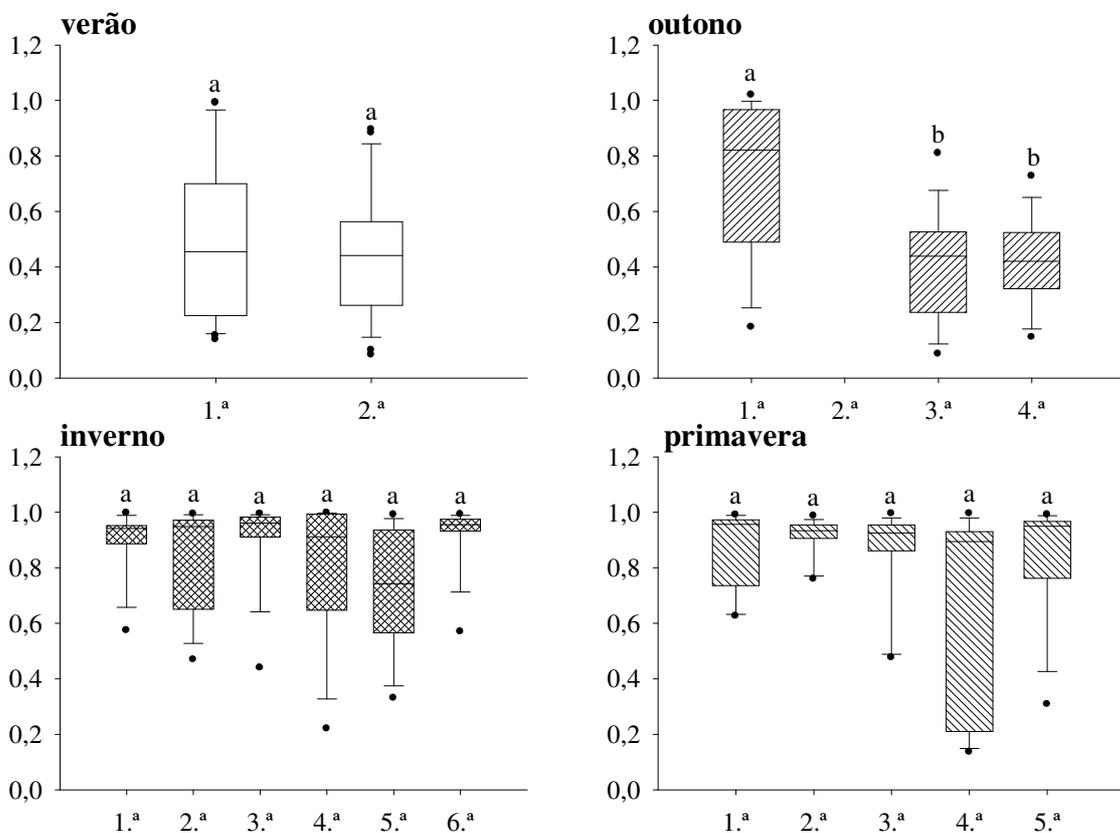


Figura 4.14 - Razão entre as concentrações GSH por GSH+GSSG ($\mu\text{mol}^{-1}(\text{gs})$) de em de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as exposições de todas as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação ($P = <0,001$).

Os conteúdos de ácido ascórbico e glutatona de plantas de *N. tabacum* foram comparados sazonalmente, agrupando todas as exposições por estação (Fig. 4.15).

Em relação aos compostos de ácido ascórbico, durante o verão houve as maiores concentrações de AA e também de DHA, o que diminuiu o estado redox nessas plantas uma vez que o DHA esteve mais alto. Durante o outono, as concentrações de AA foram bem altas em relação ao DHA e, assim, neste caso a razão foi alta. Durante o inverno, observaram-se baixas concentrações de AA e DHA, porém a razão foi a mais alta entre as estimadas em todas as estações, pois se registraram menores quantidades de DHA em relação a AA. Já na primavera, obtiveram-se as menores concentrações de AA, DHA e os menores valores da razão, em relação às outras estações (Fig. 4.15 AA, DHA e AA/AA+DHA).

Os compostos de glutatona, GSH e GSSG foram antagônicos durante o verão, o outono e o inverno. Somente durante a primavera, ambos permaneceram com concentrações mais baixas em relação às demais estações. Para o estado redox da glutatona, dois grupos distintos foram observados, plantas do verão e outono com valores mais baixos e plantas do inverno e primavera com valores mais altos. Embora as amostras do inverno e primavera tivessem apresentado valores de razões de GSH/GSH+GSSG próximos e altos, dois motivos distintos justificaram esse aumento: no caso do inverno, houve maiores concentrações de GSH, enquanto que, para a primavera, houve concentrações muito baixas de GSSG (Fig. 4.15 GSH, GSSG e GSH/GSH+GSSG).

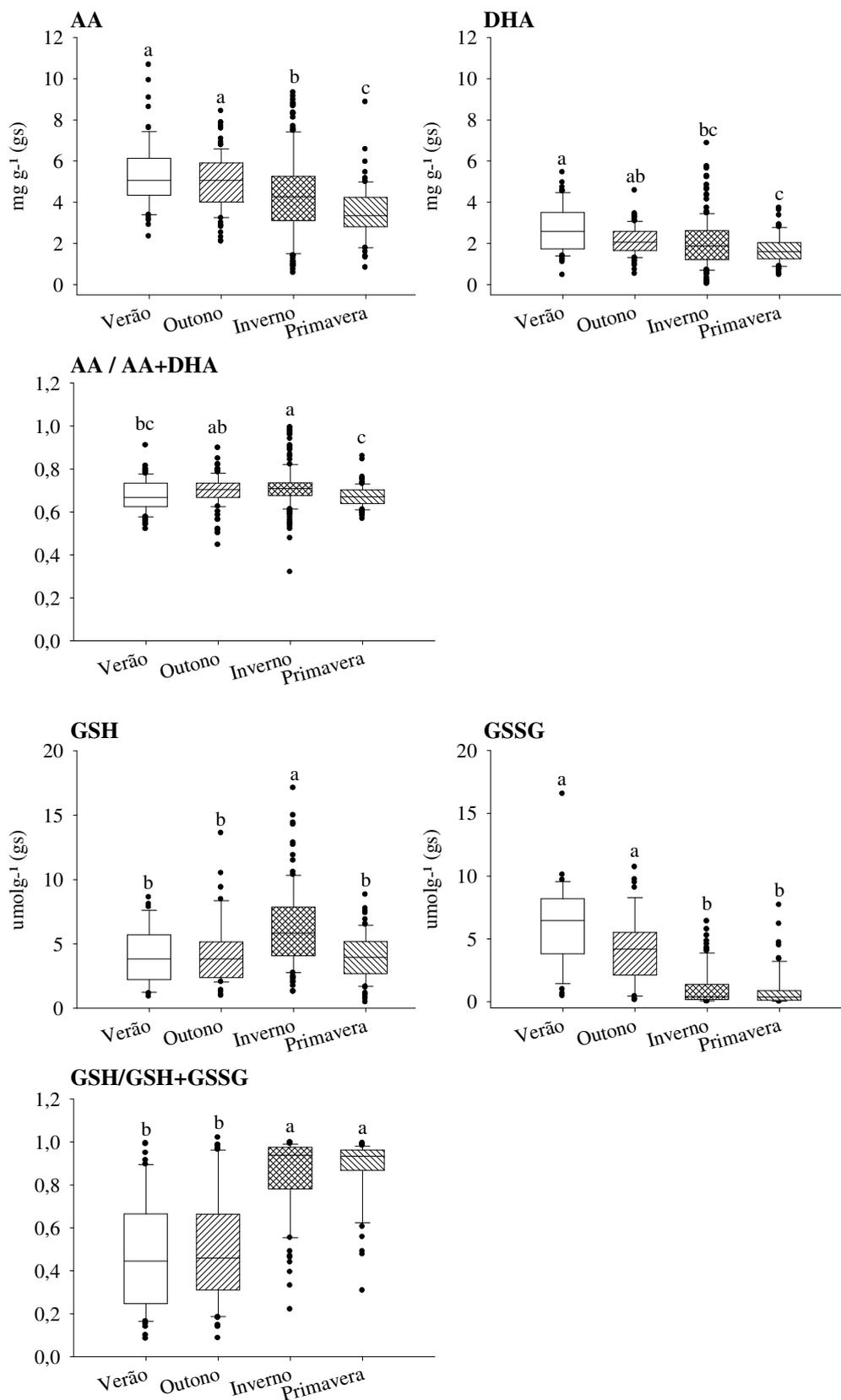


Figura 4.15 - Respostas antioxidativas dos compostos de ácido ascórbico (AA, DHA e razão AA/AA+DHA) e de glutatona (GSH, GSSG e razão GSH/GSH+GSSG) em folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' durante as estações do ano. Letras minúsculas representam diferenças entre as exposições de cada estação ($P = <0,001$).

As análises de correlação de Pearson e de regressão linear multivariada foram realizadas com o intuito de estabelecer relações entre as respostas antioxidativas de plantas de *N. tabacum* e as condições ambientais (fatores climáticos e poluentes), em média, de 2 a 6 dias anteriores a cada dia de amostragem. As correlações de Pearson apontaram relações diretas ou inversas entre pares de antioxidantes e fatores ambientais, enquanto que a regressão linear estabeleceu as variáveis que preponderantemente explicaram as variações nos antioxidantes. Além das formas já apresentadas para ácido ascórbico e glutathiona (AA, DHA, razão AA/AA+DHA, GSH, GSSG e razão GSH/GSH+GSSG), essas análises foram aplicadas também para concentrações de ácido ascórbico total (AAtot) e de glutathiona total, obtidas respectivamente a partir da soma de concentrações de AA e DHA e de GSH e GSSG, visando explicar de forma mais clara os efeitos dos fatores ambientais sobre esses compostos.

A correlação de Pearson apontou, em geral, uma provável defasagem de tempo entre ocorrência de alteração das condições ambientais (independentemente da variável considerada) e seus reflexos sobre o perfil dos antioxidantes foliares analisados. Em vários casos, as correlações mais fortes (identificadas por valores de r mais altos) ocorreram entre os indicadores do sistema antioxidante e as médias das diferentes variáveis ambientais entre 4 e 6 dias anteriores à análise dos mesmos (Tab. 4.4).

Estas análises apontaram relação significativa entre todos os antioxidantes e a AOTzero e/ou valores máximos diários de ozônio. As correlações mais fortes obtidas foram: positiva entre GSH e AOT20 de 5 dias anteriores ($r = 0,53$); e negativa entre GSSG e AOTzero de 6 dias anteriores ($r = -0,54$). As correlações mais fracas obtidas foram: positiva entre SOD e temperatura de 2 dias anteriores e também entre APX e AOT40 de três dias anteriores (ambas 0,12); e negativa entre GR e temperatura de 3 dias anteriores e também entre GR e AOTzero de dois dias anteriores.

As três enzimas apresentaram correlações com a temperatura dos dias anteriores, sendo correlações positivas entre APX e SOD e negativas para GR. As enzimas SOD e GR apresentaram correlações significativas também com radiação global, sendo que este fator pareceu contribuir para um aumento na atividade de SOD e um decréscimo na atividade de GR. As três enzimas apresentaram correlação negativa com a AOTzero, porém a relação mais forte ocorreu com a APX, que também demonstrou ser a menos influenciada pelos demais fatores ambientais dentre as enzimas avaliadas.

A glutathiona apresentou, na grande maioria dos casos, correlações altamente significativas com todos os indicadores de contaminação atmosférica por ozônio, sendo essas sempre positivas para GSH e negativas para GSSG. O estado redox de glutathiona apresentou correlações positivas com médias máximas diárias de O_3 e com as AOTs zero, 20 e 40,

refletindo as fortes correlações positivas encontradas para GSH. Além disso, para GSH, também houve uma relação significativa com a umidade do ar e a precipitação em todos os dias avaliados (Tab.4.4).

Para AA, correlações significativas com os índices de ozônio foram geralmente observadas entre quatro e seis dias antes, demonstrando uma resposta mais tardia ao ozônio do que a respostas dos compostos de glutathione. O estado redox de AA apresentou a maior correlação positiva com O_3 , dentre os demais dados que relacionam ao ácido ascórbico, devido principalmente às fortes correlações positivas encontradas para AA. Os óxidos de nitrogênio (NO e NO_2) apresentaram relações positivas com o ácido ascórbico (Tab.4.4).

Tabela 4. 4 – Correlação de Pearson entre condições ambientais e antioxidantes. Valores de r para dados de 2 a 6 dias anteriores ao dia de amostragem. Valores médios de temperatura (°C), umidade relativa (%) e radiação solar global (MJ/m²), concentrações médias de NO e NO₂, máximas diárias de O₃ (ppb) e valores acumulados de precipitação (mm), AOTzero, AOT20 e AOT40 (ppb). Diferenças significativas destacadas (**p<0,005** e **p<0,05**).

	dias	T	UR	P	R	O ₃	AOTzero	AOT20	AOT40	NO*	NO ₂ *
APX	2	0,13	0,00	0,01	-0,05	-0,03	-0,19	-0,01	0,10	-0,06	0,03
	3	0,06	-0,04	0,02	-0,01	0,01	-0,15	-0,01	0,10	-0,01	0,09
	4	0,13	-0,03	0,00	-0,02	0,01	-0,26	-0,02	0,12	-0,05	-0,11
	5	0,13	-0,05	-0,06	0,00	-0,01	-0,25	-0,03	0,10	-0,09	-0,14
	6	0,14	-0,06	-0,05	-0,03	0,02	-0,24	0,00	0,12	0,00	0,18
SOD	2	0,12	-0,05	-0,05	0,16	-0,03	-0,16	-0,07	-0,08	-0,10	0,00
	3	0,10	-0,07	-0,04	0,15	-0,10	-0,16	-0,10	-0,09	-0,14	-0,06
	4	0,18	-0,14	-0,05	0,21	-0,09	-0,16	-0,07	-0,08	-0,15	-0,19
	5	0,21	-0,14	-0,05	0,22	-0,04	-0,09	0,00	-0,07	-0,24	-0,26
	6	0,21	-0,16	-0,07	0,17	-0,08	-0,10	-0,04	-0,11	-0,11	-0,03
GR	2	-0,18	0,13	-0,04	-0,18	-0,16	-0,13	-0,20	-0,14	-0,11	-0,10
	3	-0,13	0,18	0,03	-0,28	-0,18	-0,23	-0,22	-0,14	-0,11	-0,10
	4	-0,15	0,14	0,08	-0,28	-0,11	-0,19	-0,16	-0,07	-0,12	-0,12
	5	-0,14	0,13	0,08	-0,27	-0,10	-0,17	-0,15	-0,07	-0,15	-0,12
	6	-0,11	0,10	0,10	-0,28	-0,06	-0,15	-0,12	-0,04	0,02	0,13
GSH	2	-0,11	-0,21	-0,25	-0,06	0,29	0,20	0,27	0,27	0,32	0,09
	3	-0,11	-0,24	-0,20	-0,03	0,31	0,20	0,29	0,25	0,27	0,02
	4	-0,09	-0,40	-0,24	0,05	0,43	0,33	0,47	0,39	0,22	-0,06
	5	-0,04	-0,39	-0,25	0,00	0,48	0,31	0,53	0,46	0,09	-0,17
	6	-0,06	-0,41	-0,24	-0,02	0,47	0,31	0,52	0,44	0,16	0,21
GSSG	2	0,10	0,20	0,03	-0,21	-0,28	-0,47	-0,30	-0,12	-0,29	-0,06
	3	0,06	0,17	0,01	-0,23	-0,28	-0,48	-0,30	-0,10	-0,23	0,00
	4	0,16	0,12	0,04	-0,19	-0,24	-0,50	-0,23	-0,08	-0,19	-0,07
	5	0,09	0,07	0,00	-0,15	-0,32	-0,51	-0,29	-0,12	-0,15	-0,05
	6	0,10	0,08	0,04	-0,16	-0,31	-0,54	-0,29	-0,13	0,05	0,26
Gtot	2	0,05	-0,01	-0,17	-0,19	0,04	-0,23	-0,02	0,12	-0,04	-0,01
	3	0,02	-0,05	-0,12	-0,18	0,06	-0,22	0,01	0,13	-0,03	-0,03
	4	0,12	-0,23	-0,14	-0,10	0,19	-0,12	0,21	0,27	-0,04	-0,18
	5	0,12	-0,27	-0,19	-0,09	0,19	-0,13	0,24	0,31	-0,14	-0,25
	6	0,12	-0,29	-0,15	-0,11	0,19	-0,15	0,24	0,29	0,14	0,34
<u>GSH</u> Gtot	2	-0,05	-0,22	-0,14	0,24	0,33	0,44	0,33	0,15	0,31	0,05
	3	-0,01	-0,17	-0,08	0,23	0,33	0,43	0,32	0,14	0,23	-0,04
	4	-0,10	-0,15	-0,11	0,20	0,30	0,47	0,28	0,16	0,16	0,01
	5	0,00	-0,11	-0,06	0,16	0,39	0,46	0,36	0,22	0,07	-0,04
	6	-0,01	-0,12	-0,08	0,15	0,38	0,51	0,37	0,21	-0,05	-0,21
AA	2	0,02	-0,03	-0,20	-0,06	0,14	0,00	0,10	0,14	0,41	0,41
	3	0,01	-0,01	-0,15	-0,18	0,11	-0,09	0,05	0,11	0,44	0,42
	4	0,11	-0,01	-0,10	-0,32	0,23	-0,06	0,16	0,18	0,32	0,06
	5	0,11	-0,09	-0,09	-0,25	0,29	-0,02	0,25	0,27	0,36	0,07
	6	0,10	-0,12	-0,09	-0,22	0,32	0,02	0,29	0,31	0,13	0,34
DHA	2	-0,08	0,08	-0,09	-0,17	-0,03	-0,10	-0,03	-0,01	0,25	0,23
	3	-0,09	0,08	-0,03	-0,25	-0,09	-0,20	-0,09	-0,06	0,28	0,27
	4	-0,14	0,10	0,01	-0,44	-0,07	-0,24	-0,08	-0,11	0,17	-0,01
	5	-0,16	0,08	0,03	-0,44	-0,01	-0,21	0,02	-0,01	0,19	-0,04
	6	-0,15	0,02	0,05	-0,41	0,01	-0,20	0,03	0,02	0,09	0,27
AAtot	2	-0,02	0,01	-0,17	-0,12	0,08	-0,04	0,05	0,09	0,38	0,37
	3	-0,04	0,03	-0,11	-0,22	0,04	-0,14	-0,01	0,04	0,41	0,40
	4	0,12	-0,23	-0,14	-0,10	0,19	-0,12	0,21	0,27	-0,04	-0,18
	5	0,00	-0,03	-0,05	-0,34	0,19	-0,09	0,17	0,18	0,32	0,03
	6	-0,01	-0,07	-0,05	-0,31	0,22	-0,06	0,21	0,21	0,12	0,33
<u>AA</u> AAtot	2	0,09	-0,16	-0,09	0,11	0,20	0,17	0,13	0,15	0,09	0,13
	3	0,08	-0,14	-0,13	0,14	0,24	0,21	0,15	0,19	0,06	0,07
	4	0,20	-0,17	-0,13	0,24	0,32	0,30	0,25	0,31	0,08	0,08
	5	0,21	-0,25	-0,15	0,33	0,33	0,36	0,27	0,30	0,12	0,13
	6	0,18	-0,21	-0,19	0,32	0,34	0,38	0,29	0,30	0,03	0,00

* Dados de NO e NO₂ coletados somente até dia 31 de agosto.

Os resultados apresentados, referentes a regressão linear, estabeleceram que as variações nos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e no estado redox de ácido ascórbico e glutathiona em plantas de *N. tabacum* também foram explicadas de forma combinada por oscilações nas condições climáticas e nos níveis de contaminação de O₃ no período entre 4 e 6 dias que antecederam os dias de amostragem. Na tabela 4.5, foram apresentados, em equações de 2.º grau, apenas os melhores modelos de regressão encontrados para cada antioxidante, ou seja, aqueles com coeficientes de explicação (r^2) mais altos.

Dentre todas as variáveis ambientais avaliadas, a precipitação foi a única que não contribuiu significativamente para explicar as variações no sistema antioxidante das plantas de *N. tabacum*.

O modelo linear menos explicativo foi proposto para APX (15%) e o mais explicativo foi proposto para GSH (33%). Em relação às enzimas, SOD e APX aumentaram sua atividade na medida em que a temperatura média aumentou e a umidade relativa juntamente com o nível de O₃ diminuiu nos dias anteriores à amostragem (defasagem de 6 e 5 dias respectivamente). Porém, as variações na atividade da GR foram significativamente explicadas apenas por variações na intensidade de radiação solar nos 6 dias anteriores a amostragem (Tab. 4.5).

A concentração de ácido ascórbico (reduzido, oxidado e total) aumentou em resposta a aumento da temperatura, diminuição da umidade relativa e da radiação solar nos 4 dias anteriores à análise desse composto. Suas formas reduzida e oxidada estiveram respectivamente mais e menos concentradas quando os níveis de O₃ eram mais altos. O estado redox do ácido ascórbico foi maior quando a radiação solar e o O₃ estavam mais altos (Tab. 4.5)

As concentrações de glutathiona (reduzida, oxidada e total) foram mais altas após períodos de menor umidade relativa. O nível de GSH foi afetado positivamente por picos de concentração de O₃ e os níveis de GSSG e Gtot foram menores na medida em que a contaminação por O₃ foi maior. GSH e Gtot foram ainda maiores na medida em que a radiação solar era menor nos 6 dias que precederam a amostragem. O estado redox da glutathiona foi explicado negativamente pela temperatura média e positivamente pela umidade relativa, radiação solar e contaminação atmosférica por O₃ no período de 5 dias anterior a amostragem (Tab. 4.5).

Tabela 4.5 - Equações de regressão linear para antioxidantes de plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas durante o ano de 2008. Transformações de dados, quando utilizadas, precedem à sigla do antioxidante: logaritmo de 10 (log10), raiz quadrada (raiz²) e ranking (rank). Sigla das variáveis colocadas logo após coeficientes: temperatura média (T), umidade relativa (UR), radiação solar global (R), valores máximos diários de O₃ (máx O₃) e AOTzero. Valores de R² com p = <0,001.

Equação	R ²	dias*
(rank) SOD = 265,7 +(17,2*T) -(4,5*UR) -(2,9*máx O ₃)	0,27	6 dias
(log10)APX = 2,0 +(0,02*T) -(0,006*UR) -(0,0003*AOTzero)	0,15	5 dias
AA = 8,2 +(0,2*T) -(0,06*UR) -(0,3*R) +(0,02*máx O ₃)	0,28	4 dias
(raiz ²)DHA = 2,8 +(0,03*T) -(0,01*UR) -(0,06*R) -(0,0002*AOTzero)	0,29	4 dias
AA _{tot} = 15,3 +(0,4*T) -(0,1*UR) -(0,4*R)	0,27	4 dias
(rank)AA/AA _{tot} = -12,9 + (4,3*R) + (1,6*máx O ₃)	0,26	5 dias
(log10)GR = 3,9 -(0,05*R)	0,16	6 dias
(raiz ²)GSH = 5,4 -(0,04*UR) -(0,06*R) +(0,02*máx O ₃)	0,33	6 dias
(rank)GSSG = 383,7 -(1,8*UR) -(0,08*AOTzero)	0,25	6 dias
(log10)G _{tot} = 2,3 +(0,03*T) -(0,019*UR) -0,03*R -(0,0001*AOTzero)	0,32	6 dias
(rank)GSH/G _{tot} = -5,04 -(11,7*T) +(2,4*UR) +(5,14*R) +(2,7*máx O ₃)	0,22	5 dias

*Número de dias que antecederam cada amostragem de plantas para análise dos antioxidantes, para o qual foram calculados os valores médios de cada variável ambiental inserida na análise multivariada.

Finalmente, as respostas antioxidativas (enzimas e formas reduzida e oxidada de ácido ascórbico e glutatona) de plantas de *N. tabacum* foram novamente avaliadas em conjunto, desta vez incluindo as variações na intensidade de necroses foliares (danos) observadas nas mesmas amostras foliares, por intermédio de um gráfico bidimensional gerado a partir da análise de componentes principais (ACP).

A ACP resumiu 55% da variabilidade total dos dados nos dois primeiros eixos (38 % no eixo 1 e 18 % no eixo 2). Em uma visão geral, houve uma sazonalidade bem definida, com o agrupamento de dados referentes ao inverno e primavera no lado positivo do eixo 1 e lado negativo do eixo 2 contra o agrupamento dos dados referentes ao verão e outono do lado negativo do eixo 1. Junto ao agrupamento de dados do inverno e primavera, encontram-se os danos e a GSH, e o lado oposto encontra-se os demais antioxidantes. O vetor que representa GSSG possui a maior correlação com eixo 1 (-0,84), seguido dos vetores AA (-0,73) e DHA (-0,71). Em relação ao eixo 2, as maiores correlações foram com os vetores GSH (0,55), AA (0,52) e GSSG (-0,48). A análise da posição dos vetores ainda permite ressaltar que: as três enzimas, APX, SOD e GR estão fortemente relacionadas; AA e DHA também estão

fortemente relacionados; AA, DHA, APX, SOD e GR estão inversamente relacionados a danos; e GSSG está inversamente relacionada à GSH. As unidades amostrais do inverno e da primavera foram caracterizadas, em sua maioria, por baixos níveis dos antioxidantes e pela presença de danos visíveis, ocorrendo o inverso para as unidades amostrais do verão e outono (Tab. 4.6 e fig. 4.16).

Tabela 4.6 - Correlação de Pearson e Kendall das variáveis biológicas com os eixos 1 e 2. Valores de r obtidos através de valores médios por planta das respostas antioxidativas (AA, DHA, GSH, GSSG, APX, SOD e GR) e injúrias foliares visíveis (danos) em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas durante o ano de 2008.

Variáveis	eixo 1	eixo 2
Danos	0,36	-0,30
APX	-0,46	0,35
SOD	-0,25	0,09
GR	-0,41	0,12
GSH	0,26	0,55
GSSG	-0,84	-0,48
AA	-0,73	0,52
DHA	-0,71	0,42

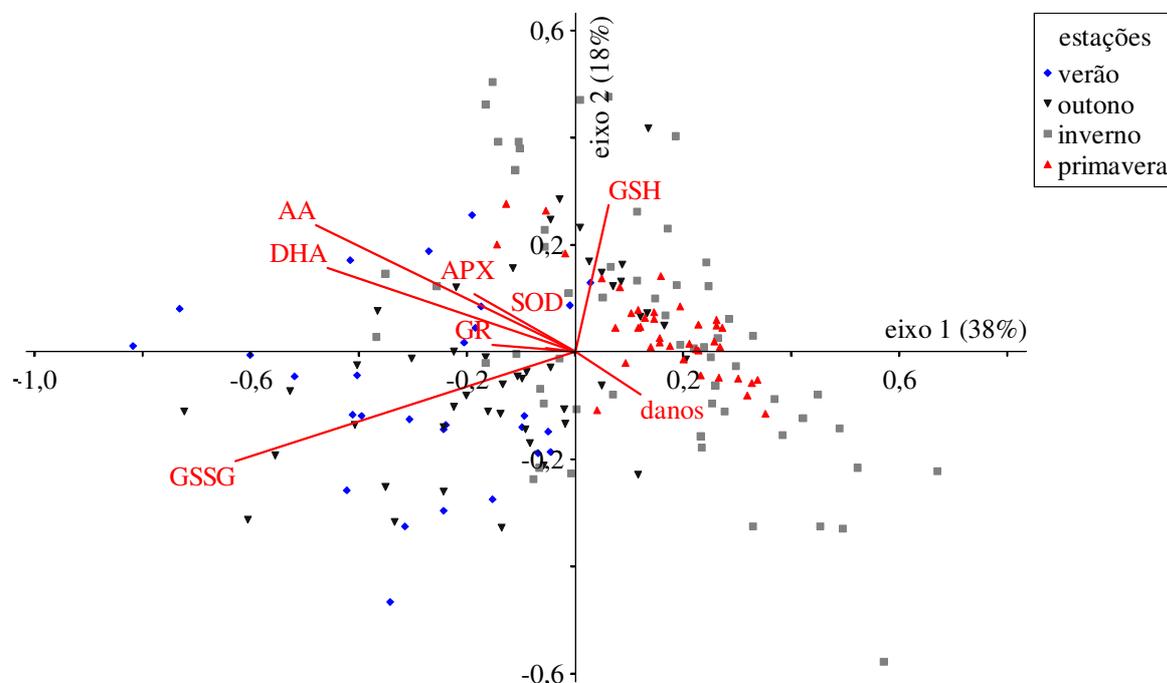


Figura 4.16. Análise de componentes principais (ACP) das variáveis biológicas avaliadas em folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas durante as estações do ano de 2008.

5. DISCUSSÃO

A atmosfera da área de estudo, localizada na região sul da cidade de São Paulo, mostrou-se favorável à formação de oxidantes fotoquímicos, observando-se comportamento similar ao encontrado em estudos realizados em sistema fechado. Esses estudos estabelecem a variação na concentração das principais espécies envolvidas no ciclo fotoquímico do O_3 em função da intensidade da luz do dia. O ciclo fotoquímico inicia-se com a conversão de NO a NO_2 pela reação com o propeno, entre outros compostos orgânicos voláteis (COVs). No decorrer do dia, conforme o aumento da intensidade da radiação solar, a fotólise do NO_2 e conseqüentemente a concentração de O_3 no sistema aumentam também e a diminuição na concentração de NO_2 somente ocorre após todo NO ter sido consumido (CETESB 2000). Esse perfil diário, exemplificado na fig. 4.1, foi encontrado diversas vezes durante o ano de 2008, na área de exposição das plantas de *N. tabacum* do presente estudo. Souza et al. (2009), em estudo realizado com *N. tabacum* 'Bel W3' na mesma área utilizada neste estudo, durante os meses de setembro e outubro de 2002, encontraram o mesmo perfil diário. As autoras salientaram que a formação do O_3 no período de estudo ocorreu sob condições de forte radiação solar, alta temperatura e baixa umidade relativa do ar.

Os dados climáticos obtidos para os períodos de exposição de plantas de *N. tabacum* (Tab 4.1) evidenciam maior precipitação acumulada no período correspondente às exposições de verão e baixo acúmulo entre a 2.^a exposição de outono e a 5.^a exposição de inverno, caracterizando parte do outono e quase todo o inverno com períodos de seca. Esses resultados estão de acordo com o Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo, que caracterizou o inverno de 2008 como “muito seco”, devido principalmente ao mês de julho. O mesmo relatório ainda aponta que, durante o mês de setembro, ocorreram vários dias seguidos com baixa umidade relativa, sendo que em alguns dias houve condições para formação de oxidantes fotoquímicos (NO_x e O_3). Porém, no relatório é ressaltado que houve menor ocorrência de eventos de altas concentrações de O_3 na RMSP em 2008, quando comparado aos anos anteriores, fato explicado pela alta incidência de dias nublados e chuvosos durante o período de maior ocorrência de O_3 (setembro a março), condições meteorológicas desfavoráveis à formação deste poluente (CETESB 2009).

O ano de 2008, no local de exposição das plantas, também se mostrou atípico em relação à contaminação atmosférica por O_3 , registrando-se menores concentrações do que as obtidas nos estudos realizados por outros autores no mesmo local, porém em anos anteriores. Estas concentrações médias de O_3 estiveram em torno de 40ppb a 50ppb em 2002 e 2003 (Sant' Anna 2008), em torno de 60ppb em 2004 (Esposito et al. 2009) e 30ppb em setembro e

outubro de 2002 (Souza et al. 2009). Durante o ano de 2008, por sua vez, a concentração média se manteve em torno de 20ppb na maioria das exposições de *N. tabacum*, apresentando-se de forma ainda mais amena entre as exposições 2 a 4 de outono, em torno de 10ppb. As menores concentrações de O₃ durante o outono podem ser explicadas com base no estudo do comportamento do ozônio na Região Metropolitana de São Paulo - RMSP (CETESB 2000). Este destaca que o comportamento do O₃ na RMSP apresenta um perfil sazonal, com maior ocorrência de altas concentrações desde o final do inverno até início do verão. Além disso, a maior frequência de altas concentrações não ocorre nos meses mais quentes e com maior incidência de radiação solar provavelmente pelo aumento da nebulosidade que ocorre nesses meses.

O Valor de Referência para a Proteção da Produtividade Agrícola (VRPP), que estabelece uma AOT40 trimestral abaixo de 3000ppb.h (CETESB 2009), não foi ultrapassado durante o período de exposição das plantas de *N. tabacum* (VRPP: exposições de verão e outono juntas – 860ppb.h ; inverno - 978 ppb.h e primavera: 591 ppb.h), confirmando a condição atípica de contaminação atmosférica pelo poluente em 2008 no local de estudo.

Sabe-se que *N. tabacum* 'Bel W3' é uma cultivar muito sensível ao ozônio. A exposição por 4 horas de 200ppb de O₃ é suficiente para gerar injúrias foliares visíveis características (VDI 2003). O padrão de injúrias foliares típicas de plantas expostas ao O₃ já é bem estabelecido por diversos autores (Heggestad 1991, Klumpp *et al.* 2001, VDI 2003, Vergé *et al.* 2002). Os danos visíveis induzidos pelo O₃ em *N. tabacum* 'Bel W3' se iniciam como pontos brilhantes nos espaços intervenais da superfície adaxial das folhas, progredindo para pontos necróticos acinzentados ou amarronzados (Domingos *et al.* 2002, VDI 2003). As injúrias inicialmente ocorrem nas folhas mais velhas, progredindo para as mais jovens com o aumento da exposição ao O₃ e podem levar ao amarelecimento total da folha, acelerando a senescência e a abscisão foliar (Sanz *et al.* 2002). Este padrão de injúrias foliares típicas foi observado nas plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas na região do presente estudo (Fig. 4.4), apesar da condição atípica de contaminação atmosférica neste ano de 2008. No entanto, as porcentagens de área foliar coberta por estas necroses estimadas foram menores do que as estimadas por Esposito et al. (2009), Sant'Anna (2007) e Souza et al. (2009), acompanhando as variações ano a ano nos níveis de ozônio na atmosfera já mencionadas. Sant'Anna (2007), em particular, observou que as injúrias foliares visíveis alcançaram, em média, 25 a 40% da área foliar de plantas de *N. tabacum* expostas no local do presente estudo, faixa que foi incluída pela autora em uma classe de danos que representou um nível de contaminação atmosférica alto, em torno de 40 e 50 ppb horários. No presente estudo, a concentração média de O₃ foi inferior a 20 ppb na maioria das exposições e a maior porcentagem média de área

foliar afetada foi de 19,9%. Assim, ambos os estudos destacaram a boa resposta qualitativa de *N. tabacum* 'Bel W3' ao O₃, pelo menos quando seguido o protocolo VDI (2003).

É importante ressaltar, ainda, que os mesmos danos foliares observados em *N. tabacum* em 2008 puderam caracterizar qualitativamente as estações do ano, no que diz respeito ao nível de contaminação atmosférica. Isto porque durante o outono, estação com as mais baixas concentrações de O₃ de 2008, houve a menor frequência das ocorrências de danos foliares e, da mesma forma, durante o inverno, estação com as mais altas concentrações de O₃ de 2008, houve a maior frequência de danos foliares (Fig. 4.3 e Tab. 2). Sant'Anna (2007) observou a mesma resposta qualitativa sazonal em seu estudo realizado em 2002 e 2003, o qual objetivou avaliar o potencial bioindicador de O₃ em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' em diversas regiões da cidade de São Paulo. A autora verificou que as maiores porcentagens de danos induzidos por O₃ ocorreu nas estações da primavera e verão e que a intensidade de danos acompanhou a sazonalidade observada nos níveis de O₃, ressaltando novamente o potencial de *N. tabacum* 'Bel-W3' para avaliar qualitativamente a contaminação atmosférica nas diferentes áreas de seu estudo.

Porém, Sant'Anna (2007) encontrou baixa explicabilidade do modelo linear estabelecido entre danos típicos e concentrações de O₃, concluindo que uma avaliação quantitativa da contaminação atmosférica por intermédio da análise da área foliar coberta com necroses seria inviável. Klumpp *et al.* (2006), em um estudo realizado em diversos países da Europa, também observaram relação linear fraca entre danos em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' e concentrações de O₃ na grande maioria dos locais estudados, exceto em duas cidades que apresentaram condições ambientais bem homogêneas. Esses resultados demonstram que a baixa eficiência dessa cultivar para o biomonitoramento quantitativo de ozônio parece não estar restrita às regiões de clima sub-tropical, como é o caso de São Paulo, onde se espera que as variações climáticas sejam menos marcadas sazonalmente e mais intensas em um curto período de tempo do que nas regiões de clima temperado.

De fato, diversos autores, que realizaram estudos com a cultivar 'Bel-W3' de *N. tabacum* em diferentes regiões de clima temperado (Ball *et al.* 1998, Davison *et al.* 2003, Klumpp *et al.* 2006, Krupa *et al.* 1993, Muné-Bosh & Alegre 2002 e Peñuelas *et al.* 1998), apontam que outros fatores, tanto ambientais como biológicos, dentre estes se destacam os antioxidantes, influenciam na relação linear entre injúrias foliares e O₃.

As variações sazonais no sistema antioxidante e as associações indicadas pelas correlações de Pearson, (Figs. 4.5 a 4.15 e Tab. 4.3) apontam para uma mudança no perfil do ciclo ascorbato-glutationa das plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas ao longo do período experimental, em resposta às oscilações nas condições ambientais, tanto nas concentrações de

ozônio quanto nas variáveis climáticas. Essas mudanças no perfil antioxidativo já foram apresentadas por diversos autores (Dizengremel et al. 2008, Halliwell & Gutteridge 2007, Mittler 2002, Noctor & Foyer 1998).

As mudanças no perfil de antioxidantes observadas no presente estudo, particularmente em resposta ao ozônio, pareceram coerentes e podem ser inferidas à luz do esquema didático apresentado por Sharma & Davis (1997) (fig. 1.3). Primeiramente, parece ter ocorrido queda nas atividades das enzimas SOD e APX (apontada pelas correlações negativas com O_3), que participam da seqüência de reações que promove a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (SOD) e a conversão deste em H_2O (APX). A APX utiliza como substrato o AA, que é oxidado a DHA. Portanto, a queda da atividade de APX pode ter resultado no acúmulo de AA (correlação positiva com O_3), que permanece nesta forma reduzida e assim mantém baixos os níveis de DHA (correlação negativa com O_3). O DHA, por sua vez, é regenerado através da enzima dehidroascorbato redutase (DHAR), que oxida GSH à GSSG. Portanto, com níveis baixos de DHA, a GSH não deve ter sido utilizada nos momentos de maior contaminação por ozônio, podendo explicar a correlação positiva com O_3 , enquanto que a GSSG se mantém baixa (correlação negativa com O_3), juntamente com os níveis baixos de DHA. Por fim, os baixos níveis de GSSG explicariam a baixa atividade da enzima GR sob condições de maior exposição das plantas ao ozônio (correlação negativa com O_3).

Contudo, considerando essa alta complexidade do sistema antioxidante (Mancini *et al.* 2006) e a reconhecida influência de fatores ambientais sobre a planta exposta ao O_3 (Klumpp *et al.* 2006, Krupa *et al.* 1993, Peñuelas *et al.* 1998), a compreensão das mudanças no sistema antioxidante, resultando ou não no aumento da tolerância das plantas ao estresse oxidativo, deve ser estabelecida dentro do um contexto ambiental local. Por esse motivo, realizaram-se as análises multivariadas, que permitem identificar efeitos combinados e significativos de variáveis independentes sobre variáveis dependentes.

Os modelos de regressão encontrados nas análises de regressão (tab. 4.4) confirmaram a influência dos fatores ambientais no sistema antioxidante de plantas de *N. tabacum* expostas no local de estudo durante o período experimental e apontaram, realmente, para uma baixa eficiência do sistema antioxidante, contribuindo para explicar a alta sensibilidade da cultivar 'Bel W3' ao estresse oxidativo induzido por O_3 , entre outros fatores ambientais.

As alterações no perfil de alguns antioxidantes nas plantas utilizadas ocorreram em resposta a picos médios horários de concentração de O_3 nos 4 a 6 dias que antecederam as amostragens. Nesse caso, incluem-se a SOD, as formas reduzidas de ácido ascórbico e de glutatona e o estado redox dessas duas substâncias. As mudanças nos padrões dos demais

indicadores do sistema antioxidante analisados foram mais evidentemente decorrentes da exposição total ao O₃ (AOTzero de 4 a 6 dias anteriores).

O crescente acúmulo de peróxido de hidrogênio no mesofilo mostrado por Pedroso (2009) e a redução da atividade das enzimas SOD e APX em resposta a maiores concentrações de O₃ (relação negativa também identificada nas análises de regressão) parecem indicar inibição destas pelo acúmulo de H₂O₂, como foi mencionado por Mancini *et al.* (2006). Com a redução na atividade de APX, em particular, é esperado um aumento do potencial redox do ácido ascórbico, devido a um aumento dos níveis do ácido ascórbico em sua forma reduzida e/ou uma redução dos níveis do composto oxidado, como apontado pelas análises de regressão multivariada. Em qualquer um desses casos, a razão entre AA/AA_{tot} aumentaria em plantas submetidas a um gradiente crescente de concentrações de O₃. Essa relação positiva foi apontada neste estudo.

Ainda, pode-se levantar a hipótese de que houve um aumento na síntese de AA e GSH, uma vez que a correlação com o O₃ se mostrou positiva para ambos e a eficiência do ciclo teria sido comprometida pela perda na atividade das enzimas e da capacidade de reduzir o H₂O₂ em água. Contudo, considerando que o conteúdo total de ácido ascórbico nas plantas de *N. tabacum* não foi afetado por ozônio, de acordo com o modelo de regressão encontrado, a mudança das proporções entre AA e DHA explicariam melhor o aumento do estado redox do ácido ascórbico nas plantas que cresceram sob concentrações mais altas do O₃. Esposito *et al.* (2009), em trabalho realizado com exposição de *N. tabacum* 'Bel W3' também no Instituto de Botânica, no ano de 2004, mensurou o ácido ascórbico total e obteve relação negativa deste com as concentrações de O₃ de 5 dias anteriores. Deve-se considerar que as plantas utilizadas por essas autoras estiveram expostas a concentrações médias de ozônio mais altas do que foi observado no presente estudo. Assim, no experimento realizado em 2004, seria razoável esperar um consumo do ácido ascórbico nas plantas, em resposta ao aumento dos níveis de ozônio, indicando maior perturbação ao ciclo ascorbato-glutationa.

Burkey *et al.* (2002 e 2006) defendem que o AA apoplástico é o primeiro antioxidante utilizado na defesa contra espécies ativas de oxigênio. Seus estudos realizados com várias espécies de plantas tolerantes e sensíveis ao O₃ demonstraram diferentes alterações nos conteúdos de AA em resposta ao O₃. Os autores discutem que a ocorrência de diferentes respostas nas concentrações de AA está relacionada a três aspectos distintos: 1.º síntese de quantidades suficientes de AA, 2.º manutenção do estoque de AA reduzido e 3.º a capacidade de acumular AA reduzido no apoplasto foliar. Assim, altas concentrações de AA não significam diretamente maior tolerância ao O₃, uma vez que a localização deste é tão importante quanto a capacidade de síntese. Os mesmos autores salientam que o O₃ em plantas

sensíveis aumenta a síntese de AA, que é realizada no interior da célula, porém a sensibilidade destas plantas está associada as menores quantidades de carregadores de AA em suas membranas e, assim, estas plantas têm menores quantidades de AA apoplástico. Por outro lado, as plantas tolerantes ao O₃ são capazes de repor rapidamente as concentrações de AA apoplástico. Assim, a determinação das concentrações de AA especificamente no apoplasto de plantas de *N. tabacum* 'Bel-W3' expostas a um gradiente crescente de contaminação atmosférica por ozônio poderá contribuir para definir mais precisamente o papel do ácido ascórbico na tolerância destas ao estresse oxidativo.

De qualquer modo, em consequência das alterações nas reações que envolvem o ácido ascórbico no ciclo ascorbato-glutationa, é possível esperar que o estado redox da glutaciona seja também maior em plantas submetidas a maiores concentrações de O₃, mesmo que a atividade da GR não tenha sido alterada por maiores níveis de O₃. As análises de regressão multivariada parecem ter apontado para esse caminho no presente estudo, por meio das relações positivas com GSH e negativas com GSSG. Isto porque seriam observados proporcionalmente maiores níveis da forma reduzida e menores níveis da forma oxidada de glutaciona em decorrência da diminuição da oxi-redução do ácido ascórbico. Além disso, o conteúdo de glutaciona total foi reduzido nas plantas expostas a maiores níveis de O₃, indicando igualmente uma perda potencial da eficiência do ciclo ascorbato glutaciona. Baccio *et al.* (2008), ao exporem plantas de clones sensíveis e tolerantes de álamo por 15 dias a 60 ppb de O₃, por 5 horas ao dia, observaram maiores quantidades de GSH nos clones tolerantes, pois estes apresentavam maior expressão do gene γ -ECS, um dos principais responsáveis pela síntese de GSH. Partindo deste fato, podemos novamente inferir que a síntese de glutaciona (GSH) em *N. tabacum* não seria intensificada, por esta ser uma espécie sensível ao O₃, com menor expressão do gene γ -ECS. No presente estudo, a glutaciona total diminuiu com aumento de ozônio, sugerindo justamente essa suposta diminuição da síntese de glutaciona.

Denota-se que as alterações no ciclo ascorbato glutaciona foram evidentes mesmo considerando que, durante o período de estudo, as concentrações atmosféricas de O₃ foram atipicamente baixas no local de estudo, em comparação com os níveis de contaminação observados em trabalhos anteriores realizados no mesmo local (Esposito *et al.* 2009, Sant'Anna 2007, Souza *et al.* 2009), ressaltando a alta sensibilidade dessa cultivar ao O₃.

Outros fatores ambientais contribuíram para as mencionadas alterações, dentre eles os principais são temperatura, umidade relativa e radiação solar, que interferem diretamente no processo fotossintético. Isto ocorre, por exemplo, por influência destes sobre a abertura e fechamento estomático. Conseqüentemente, o sistema antioxidativo também seria afetado, visto que o processo fotossintético é uma fonte natural de espécies reativas de oxigênio,

conforme indicado por diversos autores (Iriti & Faoro 2007, Larcher 2000, Mittler 2002, Moraes *et al.* 2004, Peñuelas *et al.* 1998, Sharma & Davis 1997).

Estas três principais variáveis climáticas demonstraram influenciar as respostas antioxidativas de plantas da cultivar 'Bel W3' em conjunto com as variáveis de O₃ nos modelos apresentados no presente estudo (Tab. 4.4). A temperatura alta acelera os movimentos das moléculas, aumentando as atividades metabólicas e auxiliando na atividade enzimática, enquanto que as temperaturas mais baixas diminuem os processos metabólicos, uma vez que aumenta a energia de ativação necessária para realizar os processos bioquímicos. A umidade relativa elevada propicia a abertura estomática, favorecendo as trocas gasosas, porém ao mesmo tempo permite a entrada de maiores quantidades de O₃ na célula. Este dois fatores em conjunto alteram a transpiração na medida em que alteram a diferença de pressão de vapor entre a superfície da planta e o ar que a envolve. Portanto, a transpiração intensifica-se com a diminuição da umidade relativa do ar e com o aumento da temperatura (Larcher 2000, Peñuelas *et al.* 1998). A radiação intensa pode sobrecarregar o aparato fotossintético, principalmente diminuindo a eficiência do fotossistema II (FSII), onde, como uma medida de proteção, o aporte excessivo de radiação é desviado via fluorescência para evitar danos ao centro de reação do FSII (Bray *et al.* 2000, Larcher 2000). Desse modo, um efeito associado dessas variáveis climáticas e do ozônio sobre o sistema de defesas das plantas é um resultado esperado.

Cabe ainda ressaltar que houve uma relação temporal evidente entre as mudanças nas condições ambientais e seus reflexos sobre o sistema antioxidante, o que contribui para explicar o fato de que as primeiras necroses foliares sempre surgem após alguns dias do início da exposição. Em tese, a morte celular em grande extensão, a ponto de se visualizarem áreas da folha necrosadas, deve ocorrer após o rompimento do equilíbrio pro-oxidante/antioxidante (Bray *et al.* 2000). Sendo assim, espera-se que haja um intervalo de tempo entre a ocorrência de níveis tóxicos de ozônio na atmosfera, a mudança do sistema antioxidante, o rompimento desse equilíbrio e o surgimento de injúrias visíveis. Essa defasagem de tempo parece variar em função das condições ambientais como um todo durante o monitoramento, e não somente em função dos níveis de contaminação atmosférica por O₃. Esposito *et al.* (2009) confirmaram haver essa relação temporal entre injúrias foliares e antioxidantes em plantas de *N. tabacum* e concentrações de O₃ em seu estudo realizado em condições de campo. As autoras mostraram que o aumento da porcentagem de área foliar com necroses ao longo da exposição foi explicado pela diminuição dos níveis de ácido ascórbico total 2 dias antes do dia de análise da injúria e por maiores concentrações de ozônio cinco dias antes. Souza *et al.* (2009), em

trabalho também realizado com *N. tabacum* 'Bel W3', confirmou que as necroses foliares típicas foram associadas a picos de concentração de O₃ nos 5 dias anteriores.

Klumpp *et al.* (2006) salientam que o retardamento das respostas biológicas é devido não somente às alterações nas condições ambientais, mas também à demora no próprio desenvolvimento da injúria, que se inicia no nível microscópico. Predoso (2009), em paralelo ao estudo aqui apresentado, pode comprovar essa suposição de que danos microscópicos antecedem os macroscópicos. A autora, por meio de técnica histoquímica, verificou a ocorrência de células mortas em tecido foliar aparentemente sadio das mesmas plantas utilizadas neste trabalho. Em geral, o número de células mortas aumentou no decorrer das exposições e esse aumento foi significativamente relacionado com o aumento das concentrações de ozônio.

No presente estudo, houve evidências de que a sazonalidade nas respostas do sistema antioxidante das plantas pode também ter interferido na intensidade de injúrias visíveis tipicamente induzidas por O₃.

Por exemplo, durante as exposições de verão, observaram-se a menor ocorrência de injúrias foliares, porém foram medidos altos picos horários de concentração e concentrações médias de O₃ (20ppb/h) próximas às encontradas nas estações inverno e primavera, estações em que foram observadas as maiores ocorrências de danos. Justamente nas exposições do verão evidenciaram-se as maiores atividades de APX, SOD e GR, e as maiores concentrações de AA e GSH, assim uma maior capacidade de oxi-redução, fato que poderia explicar a menor ocorrência de danos foliares. De forma oposta, na 5.^a exposição de inverno registraram-se a maior porcentagem média de área foliar com injúrias visíveis (19,9%), a máxima porcentagem de área foliar danificada (87,5%) e também as mais baixas atividades de enzimáticas (APX, SOD e GR) e concentrações de AA e GSH, evidenciando a perda da capacidade oxidativa destas plantas, que parece ter se refletido na maior ocorrência de injúrias foliares.

O gráfico gerado pela análise de componentes principais (Tab. 4.3 e Fig. 4.16) comprovou a associação entre a perda da capacidade antioxidativa e a visualização dos danos foliares induzidos por O₃ em um contexto mais abrangente. Verifica-se que os vetores relativos aos antioxidantes apresentam-se opostos aos vetores relativos aos danos, sugerindo que a maior eficiência antioxidativa ocorreu no verão e outono, quando houve menos ocorrência de danos foliares.

Mancini *et al.* (2006), através da expressão e supressão de genes em células de tabacos transgênicos, inibiram a atividade das enzimas catalases, ou ativaram uma alta expressão de SOD, o que acabou sinalizando a morte celular pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio.

Mittler (2002) discute a importância da atividade da APX em plantas sensíveis ao O₃, em manter o H₂O₂ abaixo de um limiar crítico, em estado de homeostase. Quando este equilíbrio é quebrado, o H₂O₂ passa a ser um sinalizador da morte celular. Pedroso (2009), utilizando técnica histoquímica, observou crescente acúmulo de H₂O₂ no parênquima paliçádico das mesmas folhas de plantas aqui analisadas, no decorrer da exposição destas no ambiente do PEFI, principalmente na estação da primavera. Este acúmulo observado por Pedroso (2009), acompanhado por baixas atividades da enzima APX durante as mesmas exposições de primavera, indica que o H₂O₂ deve ter atuado como sinalizador de morte celular, que inclusive foi detectada de forma pronunciada pela autora nessa estação. Os dados deste estudo confirmam que, durante o período da primavera, as plantas de tabaco estiveram realmente sob estresse oxidativo, evidenciando alterações no ciclo ascorbato-glutationa, que podem estar relacionadas ao aumento dos níveis de O₃, culminando com o surgimento de danos foliares.

É preciso lembrar, finalmente, que as injúrias foliares induzidas por O₃ em plantas sensíveis diminuem a área foliar sadia, gerando perda da capacidade fotossintética e queda na assimilação líquida de carbono, podendo acarretar distúrbios em diversos processos bioquímicos, inclusive levando a queda da capacidade antioxidativa (Clark *et al.* 2000, Heath 1996, Peñuelas *et al.* 1998). Silva, D.T & Moraes, R.M. (comunicação pessoal) observaram tais relações opostas, ao realizarem as análises de trocas gasosas nas mesmas folhas do mesmo conjunto de plantas deste estudo e nos mesmos dias de amostragem (Projeto Bioindicadores). As autoras identificaram, por intermédio de uma análise de ACP, relação oposta entre a assimilação do carbono (Asat) e a intensidade de danos e concluíram que o surgimento de injúrias foliares em *N. tabacum* pode reduzir a área de tecido fotossintetizante e conseqüentemente a assimilação de carbono.

6. CONCLUSÕES

A hipótese testada foi comprovada uma vez que as variações na capacidade de oxirredução de plantas de *N. tabacum* 'Bel W3', expostas em um local contaminado por O₃, ocorreram em resposta às variações condições nas ambientais e foram capazes de interferir no surgimento de injúrias foliares características da exposição a esse poluente. Isso pode diminuir a eficiência desta espécie para programas de biomonitoramento quantitativo em regiões urbanas brasileiras.

Dentro deste contexto, conclui-se que:

1.) Houve perda na capacidade de oxirredução em plantas de *N. tabacum* Bel-W3, expostas em ambiente contaminado por ozônio à medida que as concentrações totais de e/ou picos deste poluente eram mais altos, em associação aos efeitos induzidos por alterações climáticas durante o período de exposições. Esse fato reforça a alta sensibilidade das plantas de *N. tabacum* 'Bel-W3' a este poluente.

2.) Todos os fatores ambientais avaliados, exceto a precipitação, determinaram as variações nos parâmetros indicadores da capacidade de oxirredução mensurados nessas plantas e foram correspondentes a períodos entre 4 a 6 dias anteriores ao dia de amostragem. As maiores concentrações totais de ozônio (AOTzero) promoveram: diminuição na atividade da enzima APX e queda nas concentrações de GSSG enquanto que os maiores picos de ozônio (máximas diárias de O₃) promoveram: queda na atividade da enzima SOD e aumento nas concentrações de AA e GSH. Os maiores valores de temperatura média promoveram aumento na atividade das enzimas SOD e APX e das concentrações de AA e DHA enquanto que os maiores valores médios de umidade relativa promoveram decréscimo nas atividades de APX e SOD e nas concentrações de AA, DHA, GSH e GSSG. Os maiores valores médios de radiação solar global promoveram decréscimo na atividade de GR e nas concentrações de AA e DHA e GSH.

3.) Os antioxidantes que determinam preponderantemente a resposta ao O₃ nas plantas expostas neste estudo foram pela análise de Pearson (ordem por maiores valores de r): 1.º) GSSG, 2.º) GSH, 3.º) AA, 4.º) APX, 5.º) DHA, 6.º) GR e 7.º) SOD; e pela análise de regressão (ordem por maiores valores de r²): 1.º) GSH, 2.º) DHA, 3.º) AA, 4.º) SOD, 5.º) GSSG e 6.º) APX. A enzima GR não pode ser determinada pelo ozônio quando considerada todas as variáveis ambientais, apresentando correlação somente com irradiação solar global.

4.) As variações na capacidade de oxi-redução foram capazes de interferir no surgimento e na intensidade de necroses foliares nas plantas expostas no ambiente contaminado e, assim, na eficiência da cultivar para biomonitoramento de ozônio em áreas urbanas brasileiras. Como se comprovou que as condições meteorológicas locais afetam a capacidade antioxidativa de plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3', sua eficiência para monitoramento de O₃ deve ser determinada em escala local ou no máximo regional.

7. RESUMO

Na atualidade, um dos principais poluentes com ação fitotóxica é o ozônio (O_3), causando perdas na produtividade agrícola e seleção de espécies vegetais tolerantes em detrimento das sensíveis, entre outras perturbações. A alta toxicidade de O_3 está associada ao seu alto poder oxidativo, que leva à formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). Como a formação destas EROs é um fenômeno natural, houve a evolução de um sistema de defesas que envolve reações de oxi-redução, formado por diversos compostos, entre os quais o ácido ascórbico (AA) e a glutatona (GSH), assim como as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR), que neutralizam substâncias oxidativas e impedem danos celulares. Plantas que possuem conteúdos altos e/ou alta capacidade de oxi-redução são mais tolerantes ao O_3 . Em espécies vegetais sensíveis, os efeitos oxidativos em nível celular rapidamente se propagam nos tecidos vegetais gerando sintomas foliares visíveis típicos, que são indicadores efetivos do potencial de toxicidade do poluente no ar. *Nicotiana tabacum* 'Bel W3', planta bioindicadora sensível padronizada, vem sendo empregada para a qualificação dos níveis tóxicos de O_3 há várias décadas em países do hemisfério norte. Contudo, sua capacidade de oxi-redução e a eficiência do sistema celular antioxidativo em manter o equilíbrio oxidante-antioxidante podem modular a intensidade de danos em folhas dessa cultivar, dependendo das condições ambientais nos locais em monitoramento. Assim o presente estudo visou a verificar se há variações na capacidade de oxi-redução em plantas de *N. tabacum* 'Bel-W3', quando expostas em ambiente contaminado por ozônio na cidade de São Paulo; determinar quais fatores ambientais preponderantemente causam mudanças nessa capacidade e verificar se estas variações interferem no surgimento e na intensidade de necroses foliares nas plantas expostas no ambiente contaminado e, assim, na eficiência da cultivar para biomonitoramento de ozônio em áreas urbanas brasileiras. As plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' foram cultivadas a em casa de vegetação sob ar filtrado e foram expostas em um local do Instituto de Botânica durante o ano de 2008, onde outros autores já comprovaram a presença de O_3 em concentração fitotóxica. As condições meteorológicas e as concentrações horárias de O_3 e NO_x foram monitoradas durante o ano de estudo. Em cada estação do ano, foram realizadas exposições consecutivas de plantas, com duração de 14 dias cada. Cada exposição foi iniciada com 18 plantas e, em três dias sorteados, eram retiradas 06 plantas igualmente sorteadas. Nas 6^a. e 7^a. folhas mais velhas dessas plantas, foram realizadas as análises da porcentagem de área foliar afetada por injúrias visíveis e determinadas as concentrações de glutatona na sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), concentrações de ácido ascórbico na forma reduzida (AA)

e oxidada (DHA), além das atividades de SOD, APX e GR. As concentrações médias de O₃ durante o período de luz apresentaram-se maiores nas exposições de inverno e primavera, em relação às exposições de verão e outono. Em geral, as concentrações médias ficaram em torno de 20ppb e foram atipicamente baixas para a região. As injúrias foliares visíveis foram verificadas em todas as estações do ano, mas foram mais intensas no inverno e a primavera. SOD, APX e GR apresentaram tendências semelhantes de queda na atividade no inverno e primavera. Este padrão foi o inverso ao analisar a razão de concentração de GSH/GSH+GSSG e de AA/AA+DHA, que indicam o estado redox desses antioxidantes, que se apresentaram maiores durante o inverno e, para a razão de glutathiona, também durante a primavera. Houve perda na capacidade de oxi-redução nas plantas à medida que as concentrações totais de e/ou picos deste poluente eram mais alto, nos 4 a 6 dias que antecederam as amostragens, revelando uma defasagem de dias entre a exposição ao poluente e a resposta antioxidativa. Houve efeitos induzidos por alterações climáticas durante o período de exposições, em associação aos causados por O₃. Plantas com necroses foliares possuíam baixa capacidade antioxidativa. Durante o inverno e primavera, a menor eficiência antioxidativa poderia explicar a maior ocorrência de injúrias nesses períodos. Como se comprovou que as condições meteorológicas locais afetam a capacidade antioxidativa de plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3', sua eficiência para monitoramento de O₃ deve ser determinada em escala local ou no máximo regional.

8. ABSTRACT

Actually, ozone (O_3) is one of the main pollutants with phytotoxic action. It causes losses in the agricultural productivity and promotes the selection of tolerant plant species in detriment of the sensitive ones, among other disturbances. The high toxicity of O_3 is associated with its high oxidative power, resulting from the intensified formation of reactive oxygen species (ROS) in the plants. As the ROS are naturally formed during the photosynthesis and respiration, a defense system was evolved in plants, which scavenges these oxidative species and prevents cell damage. This system consists on oxidation-reduction reactions, involving several compounds, among them ascorbic acid (AA) and glutathione (GSH) and enzymes superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR). Tolerant plant species generally have high contents and/or high redox capacity. In sensitive plant species, the oxidative effects at cell level quickly spread in leaf tissues, resulting in visible typical symptoms, which are effective indicators of ozone pollution in the atmosphere. *Nicotiana tabacum* 'Bel W3', a standardized sensitive bioindicator cultivar, has been employed for several decades in the northern hemisphere for qualifying toxic levels of O_3 . However, its oxi-reduction capacity and the efficiency of its antioxidants in maintaining the oxidant-antioxidant balance may modulate the intensity of leaf injury in plants growing in the field under varied environmental conditions. Thus the present study aimed to determine whether the oxi-reduction capacity in plants of *N. tabacum* 'Bel-W3' varies along their growth in a site contaminated by ozone in the city of São Paulo; to determine which environmental factors preponderantly cause the changes in such capacity and to verify whether these changes affect the occurrence and the intensity of leaf necroses in the plants and consequently the efficiency of *N. tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in Brazilian urban areas. Plants of *N. tabacum* 'Bel W3' were grown in a greenhouse under filtered air and were exposed during the year 2008 in a site of the Institute of Botany, where phytotoxic concentrations of O_3 were previously measured. Meteorological conditions and hourly concentrations of O_3 and NO_x were monitored during all the experimental period. Plant exposures of 14 days each were continuously carried out in all seasons of the year. Each exposure period started with 18 plants. Six plants were randomly sampled in three days randomly chosen per exposure. The percentage of leaf area affected by necroses and the concentrations of the reduced and oxidized forms of glutathione (GSH and GSSG respectively) and ascorbic acid (AA and DHA), and the activity of SOD, APX and GR were determined in the 6th. and 7th. older leaves of these plants. The average concentrations of O_3 during the light period were higher in the winter and spring than in the summer and autumn.

In general, the average concentrations were around 20ppb and were unusually low for the region. Typical leaf necroses were observed in plants exposed during all seasons, but they were more intense during winter and spring. SOD, APX and GR activities decreased in plants sampled during winter and spring. Increased GSH/GSH+GSSG and AA/AA+DHA ratios were estimated in the winter. The ratio of glutathione was also enhanced during spring. The oxi-reduction capacity in the plants decreased while the ozone concentrations increased in the 4 to 6 days before the plant sampling, revealing a delay in the antioxidative responses to changes in the atmospheric concentrations of ozone. Meteorological variations during the exposure periods also induced changes in the levels of the leaf antioxidants. Leaf necroses occurred in plants with low antioxidative capacity, an association that was mainly verified during the winter and spring. As the local meteorological conditions also affected the oxi-reduction capacity of plants of *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3', its availability for biomonitoring O₃ should be determined in local or at maximum regional scales.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, M., Agrawal, S. B.** 2000. Effects of air pollution on plant diversity. *In*. M. Agrawal, S. B. Agrawal (eds.). Environmental pollution and plant responses. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 137-152.
- Arndt, U., Schweiger, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *In*: Ellenberg et al. (Eds.). Biological monitoring signals from the environment. Vieweg, Eschborn, pp. 199-298.
- Asada, K.** 1984. Assay of ascorbate-specific peroxidase. *Methods Enzymological*, v.105, pp.427-429.
- Ashmore, M., Toet, S., Emberson, L.** 2006. Ozone – a significant threat to future world food production? *New Phytologist*.170: 199–201.
- Baccio, D. D, Castagna, A., Paoletti, E., Sebastian, L., Ranieri, A.** 2008. Could the differences in O₃ sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O₃ influx? *Tree Physiology* 28, 1761–1772.
- Baier, M., Kandlbinder, A., Gollack, D., Dietz, K. J.** 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant, Cell and Environment*. 28, 1012–1020.
- Ball, G.R., Benton, J., Palmer-Brown, D., Fuhrer, J., Skärby, L., Gimeno, B.S., Millis, G.** 1998. Identifying factors which modify the effects of ambient ozone on white clover (*Trifolium repens*) in Europe. *Environmental Pollution* 103: 7-16.
- Barros, F., Mamede, M. C. H., Melo, M. M. R. F., Lopes, E. A., Jung-Mendaçolli, S. L., Kirizawa, M., Muniz, C. F. S., Makino-Watanabe, H., Chiea, S. A. C., Melhem, T. S.** 2002. A flora fanerogâmica do PEFI: composição, afinidades e conservação. *In*: Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo (Bicudo, D.C., Forti, M.C., Bicudo, C.E.M. orgs.). São Paulo: Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. p. 93-110.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. *In*: B. B. Buchanan, W. Gruissen, R. L. Jones (eds.). *Biochemistry, Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, New York, pp. 1158-1203.
- Burkey, K.O., Eason G.** 2002. Ozone tolerance in snap bean is associated with elevated ascorbic acid in the leaf apoplasto. *Physiologia Plantarum* 114: 387–394.
- Burkey, K.O., Neufeld, H. S., Souza, L., Chappelka, A. H., Davison, A.W.** 2006. Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone-sensitive wildflowers. *Environmental Pollution*. 143: 427-434.

- Clark, A.J., Lantodolt, W., Bucher, J.B., Strasser, R.J.** 2000. Beech (*Fagus sylvatica*) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll *a* fluorescence performance index. *Environmental Pollution* 109: 501-507.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.** 2000. Estudo do comportamento do Ozônio na Região Metropolitana de São Paulo. São Paulo: série relatórios.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.** 2009. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo: 2008. São Paulo: série relatórios.
- Davison, A.W., Neufeldb, H.S., Chappelkac, A.H., Wolffa, K., Finkelsteind, P.L.** 2003. Interpreting spatial variation in ozone symptoms shown by cutleaf cone flower, *Rudbeckia laciniata* L. *Environmental Pollution* 125: 61-70.
- Dizengremel, P., Thiec, D. L., Bagard, M., Jolivet, Y.** 2008. Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution*. 156: 11-15.
- Domingos, M., Klumpp, A., Klumpp, G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230-236. *Environmental Pollution*. 156: 11-15.
- Domingos, M., Bourotte, C., Klumpp, A., Klumpp, G., Forti, M. C.** 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo (Bicudo DC, Forti MC , Bicudo CEM, orgs.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 221-249.
- Elson, D.M.** Atmospheric pollution: a global problem. 2nd ed. Oxford: Blackwell; 1992. p.3.
- Emberson, L., Kuylenstierna, J., Ashmore, M.** 2003. Assessing the extent of air pollution impacts in developing country regions. In: Emberson *et al.* (Eds.). Air pollution impacts on crops and forests. A global assessment. Imperial College Press, London, pp. 309-335.
- Epstein, E.** 1975. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Tradução e notas de E. Malvolta. Livros técnicos e científicos. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Esposito, M. P., Ferreira, M. L., Sant'Anna, S. M. R., Domingos, M. , Souza, S. R.** 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' under environmental conditions in São Paulo, SE – Brazil. *Atmospheric Environment* 43(3): 619-623.
- Gadallah, M. A. A.** 2000. Effects of acid mist and ascorbic acid treatment on the growth, stability of leaf membranes, chlorophyll content and some mineral elements of *Carthamus tinctorius*, the safflower. *Water, Air, and Soil Pollution*. 118: 311-327.

- Halliwell, R. , Gutteridge, M. C.** 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. London: Oxford University Press.
- Heath, R. L.** 2008. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change?. *Environmental Pollution*. 155: 453-463.
- Heggestad, H. E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C, and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264-291.
- Iqbal, M., Abdin, M. Z., Mahmooduzzafar, Y. A. , Agrawal, M.** 1996. Resistance mechanism in plants against air pollution. In: M. Yunus, M. Iqbal (Eds.). *Plant Response to Air Pollution*. Jhon Wiley and sons, Chischester, pp.195-204.
- Iriti, M. , Faoro, F.** 2007. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollut.* 187: 285–301.
- Klumpp, A., Klumpp, G., , Domingos, M.** 1994. Active biomonitoring at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85: 109-16.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M. J., Rasmussen, S., Ribas, H., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P. , Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment*. 40 (38): 7437 – 7448.
- Krupa, S. V. , Manning, W. J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.
- Noctor, G. & Foyer, C.H.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249 - 279.
- Larcher, W.** 2000. A Planta sobre estresse. In: Larcher, W. *Ecofisiologia Vegetal*. 2000. pp. 341-437. Rima, São Carlos.
- López, A., Montaña, A., Garcia, P. , Garrido A.** 2005. Note: quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fresh olives in commercial presentations of table olives. *Food Science. Tech. Int.* 11(3):199-204.
- Luwe, M.** 1996. Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations. *Plant Cell and Environment* 19: 321-328.
- Mancini, A.; Buschini, A.; Restivo, F.M.; Rossi, C. & Poli, P.** 2006. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Science*. 170: 845-852.
- Manning, W. J, Feder.** 1980. Manning WJ , Feder WA. 1980. *Biomonitoring air pollutants with plants*. Applied Science Publishers LTD, London.

- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plants Scienci* Vol. 7 (9): 405-410.
- Moraes, R. M., Bulbovas, P., Furlan, C. M., Domingos, M. Meirelles, S. T., Delitti, W. B. C., Sanz, M. J.** 2004. Physiological responses of saplings of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, under ozone fumigation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Muggli, R.** 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. *In:* F. Corongiu, S. Banni, M. A. Dessi and C. Rice-Evans (Eds.). *Free radicals and antioxidants in nutrition*. Richelieu Press, London.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L.** 2002. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* 214: 608-615.
- Noctor, G., Foyer, C.H.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249 - 279.
- Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B. S., Filella, I.** 1998. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (NE. Spain). *Environmental Monitoring and Assessment*. 56 (2): 221 – 224.
- Ramachandra Reddy, A., Chaitanya, K. V., Jutur, P. P., Sumithra, K.** 2004. Diferencial antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*. Artigo *in press* (disponível para consulta on-line).
- Sant'Anna, S. M. R.** 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* Bel W3 para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo. Tese de doutorado - São Paulo.
- Sant'Anna, S. M., Espósito, M. P., Domingos, M., Souza, S.R.** 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* Bel W3 for biomonitoring photochemical compounds in São Paulo, Southeast Brazil. *Environmental Pollution* 151: 389-394.
- Sanz, M.J., Sánchez, G., Calatayud, V., Minaya, M.A., Cerveró, J.** 2002. La contaminación atmosférica en los bosques: guía para la identificación de daños visibles por ozono. 1ª ed. Artegraf S.A, Madrid.
- 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 Environment* 34: 2161-2181.
- Sharma, Y. K., Davis, K. R.** 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology, Medicine*, Vol. 23, No. 3, pp. 480–488.
- Souza, S. R. Sant'Anna, S. M. R. Rinaldi, M. C. S., Domingos, M.** 2009. Short-term Leaf Responses of *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' to Ozone under the Environmental Conditions

of São Paulo, SE – Brazil. Brazilian archives of biology and technology an international journal. Vol. 52, n. 1: pp. 251-258.

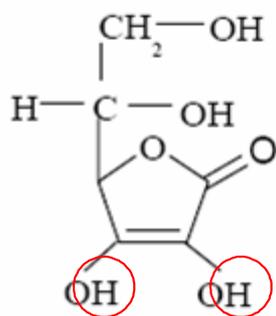
VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 1999. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/1. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

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.

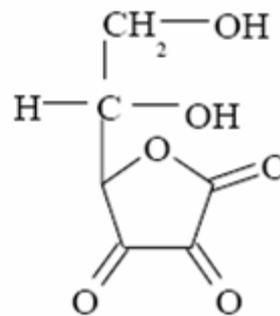
Vergé, X., Chapuis, A. , Delpoux, M. 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). Environmental Pollution 85: 337-349.

ANEXOS

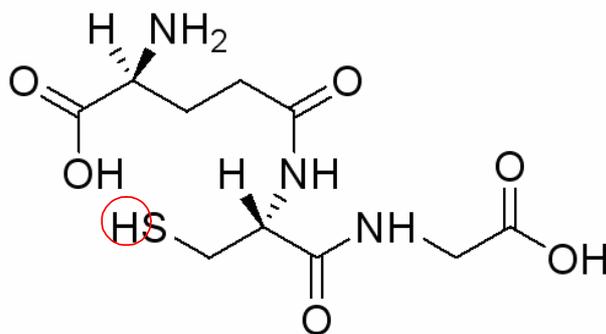
Anexo 1. Representação molecular dos antioxidantes ácido ascórbico e glutaciona. Ácido ascórbico nas formas reduzida: AA e oxidada: DHA (deidroascorbato) e moléculas de Glutaciona nas formas reduzida: GSH e oxidada: GSSG. Observar: círculo vermelho – hidrogênios removidos das moléculas AA e DHA após o processo de oxidação resultando nas moléculas DHA e GSSG. Retângulo vermelho – duas moléculas GS ligam-se após a perda do hidrogênio (GS-SG).



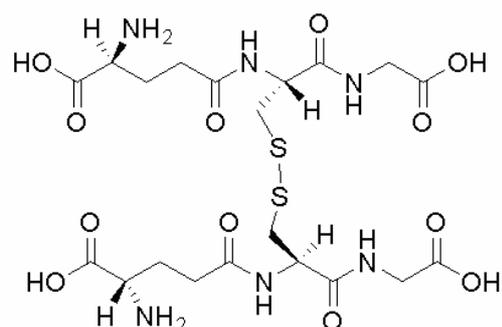
AA



DHA



GSH



GSSG

Anexo 2. Catálogo fotográfico de *N. tabacum* 'Bel W3'. Injúrias foliares induzidas por O₃ apresentadas no Método para Padronização da Exposição de Plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' proposto por VDI (2003).

