

ELIZABETH DE SOUZA LIMA

**Capacidade de *Tradescantia pallida* (Rose) DR
Hunt cv Purpurea Boom para
biomonitoramento do potencial clastogênico de
ozônio**

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

SÃO PAULO

2007

ELIZABETH DE SOUZA LIMA

**Capacidade de *Tradescantia pallida* (Rose) DR
Hunt cv Purpurea Boom para
biomonitoramento do potencial clastogênico de
ozônio**

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

ORIENTADORA: DRA. MARISA DOMINGOS

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Lima, Elizabeth de Souza

L732c Capacidade de *Tradescantia pallida* (Rose) DR Hunt cv Purpurea Boom para avaliação do potencial clastogênico de ozônio / Elizabeth de Souza Lima -- São Paulo, 2007.

121 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2007

Bibliografia.

1. Commelinaceae. 2. Poluição atmosférica. 3. Micronúcleos. I. Título

CDU 582.565.2

Aos meus pais, Pedro e Bia, por tudo.

“Só o conhecimento traz o poder.”

(Sigmund Freud)

Agradecimentos

À Dra. Marisa Domingos, minha orientadora, pela serenidade, dedicação e conhecimento com que me conduziu ao longo desse trabalho. Sou privilegiada por ter sido orientada por uma cientista tão competente e humana.

A Amariles Celsa de Souza, competente e dedicada auxiliar técnica da Seção de Ecologia, pelo auxílio em todas as atividades práticas desse trabalho. E, principalmente, por sua amizade.

Às auxiliares técnicas Marli, Dóris e Valdenice, igualmente competentes e dedicadas, pelo imensurável apoio, e por tornar mais coloridos (e saborosos) nossos dias na Seção de Ecologia.

À Dra. Silvia Ribeiro de Souza, pelo apoio no uso dos equipamentos de fumigação e procedimentos analíticos.

Aos amigos estagiários e pós graduandos da Seção de Ecologia e todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram com esse trabalho.

Às minhas professoras da graduação, Dra. Mara Magenta e Msc. Suzana Martins, por me apresentarem a esse fascinante mundo da Biologia Vegetal.

Ao Instituto de Astronomia e Geofísica da Universidade de São Paulo (IAG/ USP) pela concessão dos dados de monitoramento climático.

À Secretaria de Estado da Educação, por conceder a bolsa-auxílio que permitiu que eu pudesse dedicar preciosas horas à execução desse trabalho.

Índice

Resumo	01
Abstract	03
Capítulo 1	Introdução
1.1.Introdução geral e justificativas	05
1.2.Objetivos	18
1.3. Literatura citada	18
Capítulo 2	Monitoramento da frequência espontânea de micronúcleos em <i>T. pallida</i> 'Purpurea' em ambiente isento de contaminação atmosférica
2.1.Resumo	29
2.2.Introdução	31
2.3.Material e Métodos	33
2.4.Resultados	37
2.5.Discussão	42
2.6.Literatura citada	44
Capítulo 3	Grau de sensibilidade de <i>Tradescantia pallida</i> 'Purpurea' ao ozônio por meio de respostas clastogênicas
3.1.Resumo	49
3.2.Introdução	51
3.3.Material e Métodos	55
3.4.Resultados	62
3.5.Discussão	75
3.6.Literatura citada	82
Capítulo 4	Discussão geral
4.1 Literatura citada	98
Capítulo 5	Bibliografia
	101

Resumo

Ozônio, um dos principais poluentes em áreas urbanas, é altamente oxidativo, promovendo injúrias diversas em plantas. Para monitorar a presença desse e de outros contaminantes atmosféricos e avaliar riscos para os seres vivos, são utilizadas espécies vegetais bioindicadoras, as quais podem apresentar cloroses, necroses, pigmentações foliares típicas, desarranjos fisiológicos e aberrações cromossômicas como quebras cromossômicas, originando fragmentos denominados micronúcleos (MCN). Entre as espécies que apresentam tais anormalidades cromossômicas, pode-se citar *Tradescantia pallida* (Rose) DR Hunt cv. 'Purpurea' Boom, uma Commelinaceae originária da América Central e amplamente utilizada em paisagismo em vários países, inclusive no Brasil. Entretanto, a formação de MCN é condicionada por diversos fatores, entre os quais a poluição atmosférica e as variáveis climáticas, cuja influência ainda não está bem estabelecida para *T. pallida* 'Purpurea'. No presente estudo, assim, pretendeu-se: (1) investigar a frequência basal de micronúcleos em células-mães de grão de pólen de indivíduos cultivados exclusivamente em casa de vegetação, isenta de poluentes clastogênicos; (2) determinar a sensibilidade dessa cultivar ao ozônio e identificar fatores (temperatura e antioxidantes) que exercem influência sobre as respostas clastogênicas ao poluente; (3) determinar o tempo de recuperação adequado para diagnosticar clastogênese. A frequência espontânea de MCN, monitorada ao longo de 17 meses em inflorescências provenientes de plantas mantidas na casa de vegetação, foi geralmente baixa (entre 0,4 a 1,8%) e foi influenciada, entre os fatores climáticos monitorados, apenas pela temperatura três dias antes da amostragem (amplitude térmica e valores máximos diários). Em paralelo, ramos florais coletados das mesmas plantas, foram expostos, em câmara de fumigação fechada, a 60ppb de ozônio, por três horas, nas quatro estações climáticas do ano

ou a 80 ppb de ozônio somente na primavera e ao ar filtrado. Os ramos florais permaneceram, após exposição, na câmara de fumigação fechada com aporte de ar filtrado para períodos de recuperação, de 24 a 120 horas. Ao término de cada tempo de recuperação estudado, os ramos florais foram fixados e dissecados. Das brácteas extraiu-se ácido ascórbico total e a contagem de MCN em células-mães de grão de pólen foi feita nos botões florais. Houve aumento significativo da formação de MCN em inflorescências fumigadas com ozônio, em relação àquelas fumigadas com ar filtrado somente, demonstrando a alta sensibilidade de *T. pallida* 'Purpurea' ao poluente. Esse aumento foi mais conspícuo no inverno e no verão. A concentração de ácido ascórbico variou ao longo do tempo de recuperação, tendo sido condicionada pela amplitude térmica e por temperaturas máximas em cada dia. Porém, não foi alterada significativamente pelo ozônio. A intensidade de formação de MCN foi influenciada por variações da concentração desse antioxidante 24 horas antes e igualmente pela amplitude térmica e por temperaturas máximas em cada dia. Sob temperaturas máximas mais amenas observaram-se as maiores taxas de MCN. O tempo de recuperação mais indicado para diagnosticar clastogênese imposta por ozônio foi de 72 horas após exposição ao poluente. Contudo, não foi possível estabelecer uma curva dose X resposta entre frequência de MCN e diferentes concentrações de ozônio, de modo que a capacidade de *T. pallida* 'Purpurea' para avaliação do potencial clastogênico de ozônio ainda não pôde ser estabelecida.

Palavras-chave: ecotoxicologia, micronúcleo, ozônio, bioensaio Trad-MCN.

Abstract

Ozone, one of the most important air pollutants in urban areas, is highly oxidative. It promotes different kinds of injury in plants. Bioindicator plant species are often used for monitoring the presence of ozone and of other contaminants in the air, as well as the biological risks associated, by means of leaf chlorosis, necrosis and other typical pigmentations, physiological disturbances and chromosomal fragments or micronuclei (clastogenesis). Among the plants that show clastogenic injuries, we can quote *Tradescantia pallida* (Rose) DR Hunt cv Purpurea Boom, a Commelinaceae from Central America and frequently cultivated in gardens in several parts of the world, including Brazil. However, micronuclei formation in inflorescences of *T. pallida* 'Purpurea' exposed to air pollution is conditioned by several environmental factors, such as pollutants and climatic variables, whose influence is still not established. to investigate: (1) the basal frequency of micronuclei in pollen mother cells from plants cultivated inside a greenhouse, free from clastogenic air pollutants, (2) the sensitivity of this cultivar to ozone, identifying factors (temperature and antioxidants) that may influence on the clastogenic responses to the pollutant; (3) the appropriate recovery time to observe clastogenesis in this plant. Spontaneous micronuclei frequency, monitored during 17 months in plants maintained inside the greenhouse, was generally low (0,4-1,8%) and was influenced, among climatic factors analyzed, by air temperature three days before analysis (thermal amplitude and maximal daily values). In parallel, flowering branches were collected from the same plants and exposed, into closed fumigation chambers, to 60 ppb of ozone, for three hours in one day of the four climatic seasons of the year or to 80 ppb of ozone only in spring and to filtered air. The flowering

branches remained, after exposure, in the closed fumigation chamber with filtered air for recovery times from 24 to 120 hours. Then, the flowering branches were dissected at the end of each recovery time. Total ascorbic acid was determined in the bracts and micronuclei were scored in pollen mother cells of flower buds. The frequency of micronuclei increased significantly in inflorescences exposed to ozone, regarding to the frequency estimated in those exposed only to filtered air, revealing the high sensitivity of *T. pallida* 'Pupurea' to ozone. This increase was more conspicuous in winter and summer. The ascorbic acid concentration varied along the recovery times and was conditioned by thermal amplitude and maximal air temperatures in each day. However, this concentration was not affected by ozone. The intensity of micronuclei formation was influenced by both the variations in the concentrations of this antioxidant 24 hours before scoring of micronuclei and thermal amplitudes and maximal temperatures in each day. The highest rates of micronuclei in *T. pallida* 'Purpurea' were observed under mild daily maximum temperatures. The most appropriate recovery time to detect clastogenesis induced by ozone was 72 hours after exposure. However, it was not possible to establish a dose-response curve between micronuclei frequency and different ozone concentrations, so that the capacity of *T. pallida* 'Purpurea' for evaluating the clastogenic potential of ozone still remains undetermined.

Key words: ecotoxicology, micronuclei, ozone, Trad-MCN bioassay.

Introdução geral

1.1 Introdução geral e justificativas

1.1.1.) Poluição atmosférica

A espécie humana, ao longo de seu histórico de ocupação da Terra, têm se caracterizado pela notável capacidade de alterar o ambiente para garantir melhores condições de sobrevivência. Da manipulação do fogo à queima de combustíveis diversos para alimentar suas máquinas, passando pelos impactos tecnológico, econômico e social da Revolução Industrial, tais alterações trazem sérias implicações para os ecossistemas e, paradoxalmente, para a saúde do próprio ser humano.

Entre essas implicações, destaca-se a crescente emissão de gases e partículas poluentes, oriundos de atividades antrópicas, que degradam a qualidade do ar nas regiões

mais densamente povoadas do planeta. Junte-se a isso, as emissões provenientes de fontes e processos naturais, como fumaça de erupções vulcânicas, queimadas, decomposição, etc.

De acordo com a Resolução nº 3 de 28/06/1990, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 1990), considera-se poluente do ar como:

“(…) qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e a flora (...) e as atividades normais da comunidade”

Nas áreas com grande concentração de habitantes, são verificados dois tipos de fonte de emissão de poluentes atmosféricos: móvel, que engloba a frota de veículos automotores, e estacionária, que abrange as atividades industriais (CETESB 2007).

Os poluentes do ar são classificados como primários e secundários. Os primeiros são emitidos diretamente de suas fontes, enquanto que os secundários derivam de reações entre aqueles (Finlayson-Pitts *et al.* 1997).

Entre os poluentes primários, destacam-se as partículas inaláveis ou material particulado (MP), partículas totais em suspensão (PTS), monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), óxidos de nitrogênio (NO_x), dióxido de enxofre (SO₂) e monóxido de carbono (CO) (CETESB 2007).

Os poluentes secundários são originados de reações entre os poluentes primários. Algumas dessas reações ocorrem na presença de luz solar e seus produtos compõem um grupo de poluentes secundários denominados *smog* fotoquímico. Os principais constituintes do *smog* fotoquímico são nitrato de peroxiacetila (PAN) e ozônio (O₃) (Clapp &

Jenkin 2001).

Com o intuito de divulgar entre a comunidade a qualidade do ar na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), a Companhia Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) periodicamente atribui índices de qualidade do ar para vários poluentes gasosos e material particulado, provenientes de atividades antrópicas. Esses índices são calculados de acordo com uma função matemática, que relaciona concentração do poluente com o valor do índice e mostram, por exemplo, que o ozônio pode oferecer riscos insignificantes em concentração de até $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ou sérios riscos à saúde humana em concentração acima de $800 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (CETESB 2007).

As conseqüências para a população variam de acordo com o tempo de exposição e a toxicidade do poluente e são crescente preocupação dos órgãos gestores de saúde pública. Correlações entre poluição do ar, doenças diversas e morbidade têm sido amplamente investigadas (Logan 1953, Schwartz & Dockery 1992, Saldiva *et al.* 1994, Saldiva *et al.* 1995, Spengler *et al.* 1996, Goldsmith *et al.* 1996, entre muitos outros).

1.1.2) Ozônio como poluente

Pode-se dizer que o ozônio é um gás com função ambígua em relação aos seres vivos, de acordo com a camada atmosférica em que é encontrado. Na estratosfera, camada delimitada entre 10 e 50km da superfície terrestre, o ozônio absorve radiação ultravioleta entre 240 e 320 nm, protegendo a biosfera dos efeitos nocivos dessa radiação (Krupa & Manning 1988).

Na troposfera, camada atmosférica mais próxima da superfície, onde vivem os seres vivos, o ozônio é formado quando dióxido de nitrogênio é dissociado em óxido nítrico e oxigênio atômico, na presença de luz solar. O oxigênio atômico reage com oxigênio molecular e forma ozônio. Essa reação de fotodissociação é reversível, em condições de equilíbrio químico da troposfera (Krupa & Manning 1988).

Entretanto, em ambientes com ar poluído, a emissão de hidrocarbonetos, como os compostos orgânicos voláteis (COV), rompe esse equilíbrio. Os COV reagem com óxido nítrico, tornando a reação de fotodissociação do dióxido de nitrogênio não reversível e promovendo o acúmulo de ozônio (Clapp 2001).

Uma vez formado, o ozônio troposférico pode ser transportado pelo vento para longas distâncias afetando tanto áreas densamente urbanizadas quanto rurais (Rodrigues *et al.*, 1996). Sua concentração em um ambiente também não é estanque, uma vez que a razão entre seus precursores, NO_x e COV, que regulam a formação e decomposição de ozônio na atmosfera, pode variar de acordo com a densidade horária do tráfego veicular, principal responsável pela emissão de tais precursores (Seinfeld 1989).

Ozônio é considerado o mais tóxico entre os poluentes oxidativos (Alloway & Ayres 1993, Gardner & Gardner 1994). Seus efeitos deletérios consistem na alta reatividade com membranas e biomoléculas como lipídios, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos (Heath 1975, Mehlman & Borek 1987). Uma vez difundido nos espaços intercelulares dos seres vivos, o poluente reage com a superfície aquosa e forma as espécies ativas de oxigênio (EAO), que são moléculas ou íons com um átomo livre na sua camada eletrônica mais externa, o que confere instabilidade eletrônica e alta reatividade indiscriminada com biomoléculas (Emerit 1984).

1.1.3) Efeitos do ozônio sobre as plantas

O aumento da concentração de ozônio, inclusive em remotas regiões agrícolas, tem possibilitado muitos estudos sobre os efeitos desse poluente sobre as comunidades vegetais. O poluente penetra nas folhas através dos estômatos e se difunde na câmara subestomática (Krupa & Manning 1988, Ashmore 2005). Por ser altamente reativo com a superfície aquosa dos tecidos do mesofilo, promove a formação de EAO e a concentração de ozônio nas câmaras subestomáticas logo chega a patamares muito baixos, próximos de zero (Laisk *et al.* 1989).

Desde a década de 1950, muitos estudos têm sido conduzidos para compreender os efeitos do ozônio sobre plantas. No início daquela década, começaram a ser observadas lesões cloróticas em folhas de plantas de *Nicotiana tabacum* Bel-W3 cultivadas em vastas regiões dos EUA. Essas injúrias, a princípio, atribuídas apenas a condições climáticas, foram, anos depois, acertadamente correlacionadas com episódios de alta concentração de ozônio troposférico (Treshow & Anderson 1989).

A partir de então, pesquisadores, em diversas partes do mundo e com as mais variadas espécies, de cultivares de interesse agrônômico a espécies arbóreas nativas, passaram a investigar os efeitos desse poluente sobre as plantas. A tabela 1.1 lista tais injúrias de acordo com o nível de organização do vegetal e também de acordo com alguns dos inúmeros estudos desenvolvidos com vistas a compreender a interação poluente – planta.

Tabela 1.1. Injúrias decorrentes de exposição a ozônio, ordenadas de acordo com o nível de organização.

NÍVEL DE ORGANIZAÇÃO	INJÚRIAS	REFERÊNCIA
Molecular	Peroxidação lipídica, formação de compostos tóxicos como malondialdeído, oxidação de proteínas e aminoácidos, oxidação de enzimas de reparo, provocando danos no DNA	Janakiraman & Harney 1976 Castillo et al. 1984 Chernikova et al. 2000 Calatayud et al. 2003, Moraes et al. 2004 Iglesias et al. 2006
Celular	Alterações na permeabilidade e ruptura de membranas	Perchorowicz & Ting 1974
Tecido/ órgão	Cloroses, necroses e senescência precoce	Heggestad 1991 Orendovici et al. 2003 Sant'Anna 2007
Organismo	Perda de biomassa, alterações na arquitetura dos ramos, alterações nas relações com patógenos e pragas	Percy et al. 2002
População	Alterações nos ciclos de vida	Misik et al. 2007
Comunidade/ecossistema	Perda de diversidade, alterações fitossociológicas, alterações na ciclagem de nutrientes	Novak et al. 2003

1.1.4) Sistema de defesas antioxidativas

Antioxidantes são extremamente importantes para a sobrevivência de seres aeróbicos, pois desintoxicam as EAO formadas nos processos metabólicos, em condições naturais. Entretanto, em condições de estresse oxidativo, as EAO podem superar a capacidade de desintoxicação do sistema de defesas antioxidativas, reagindo com ácidos graxos insaturados dos lipídios das membranas, desnaturando proteínas e reagindo com bases do DNA, causando mutações (Darral 1989). Os aldeídos derivados da peroxidação lipídica podem inativar proteínas e enzimas (Smirnoff 1995).

Assim, tais seres vivos, entre os quais as plantas, desenvolveram um sistema de substâncias enzimáticas e não enzimáticas, que têm por objetivo manter o equilíbrio oxidante/antioxidante e impedir a formação de injúrias diversas, durante os processos metabólicos naturais. Essas substâncias estão distribuídas entre as organelas celulares, especialmente cloroplastos e mitocôndrias, diretamente envolvidos no transporte de elétrons e na fotorrespiração, eventos que produzem EAO (Scandalios 1993).

Entre os componentes desse sistema, pode-se destacar ácido ascórbico (vitamina C), glutatona, alfa-tocoferol (vitamina E), carotenóides, flavonóides, antocianinas (não enzimáticos), superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalases, glutatona redutase, entre outras substâncias enzimáticas (Mittler 2002).

Ácido ascórbico ocorre em todos os tecidos, em maior quantidade em células fotossintéticas e meristemas e também em alguns frutos (Smirnoff 1995). São atribuídos a esse antioxidante influência na divisão celular e expansão das células, fotoproteção no processo de fotossíntese e também proteção contra estresse oxidativo imposto por ozônio

(Smirnoff 1996).

Vários estudos correlacionam tolerância a ozônio e concentração de ácido ascórbico, mostrando que os genótipos que sintetizam menor concentração desse antioxidante são mais sensíveis ao poluente (Conklin & Barth 2004).

Espécies vegetais sensíveis, as quais são ineficientes em compensar o estresse oxidativo ocasionado por ozônio e outros poluentes do ar têm sido, ao longo dos anos, importantes ferramentas para monitorar a presença dos mesmos na atmosfera, bem como avaliar riscos potenciais aos organismos vivos.

1.1.5) Biomonitoramento de qualidade do ar com plantas

Alterações físico-químicas do ambiente frequentemente causam alterações morfológicas e fisiológicas nos seres vivos. O grau de alteração depende da intensidade e do potencial deletério dessas alterações ambientais. Com isso, todos os organismos podem ser considerados bioindicadores, pois a resposta a estímulos ambientais é uma das condições para classificá-lo como vivente (Klumpp 2001).

Nesse contexto, plantas são ferramentas bastante eficientes para apontar alterações ao longo do tempo devido ao seu sedentarismo e condição estática em um ambiente. Também mostram respostas a agentes clastogênicos do mesmo modo que outros organismos eucariotos, certas espécies são altamente sensíveis a agentes clastogênicos, no caso das plantas herbáceas, apresentam ciclo de vida curto e, por fim, constituem material de baixo custo e fácil manejo. Com isso, as plantas superiores constituem uma eficiente

ferramenta para estudos *in situ* de poluição do ar (Constantin & Owens 1982). O primeiro registro do reconhecimento dos efeitos de poluição sobre plantas data de 1661, com a publicação de 'Fumifugium' por J. Evelyn (*apud* De Temmerman *et al.*, 2004). Em meados do século XIX, Nylander correlacionou frequência de líquens a poluição do ar (*apud* De Temmerman 2004). Mas, apenas em meados do século XX, registros de alta concentração de poluentes, os quais causaram alta mortalidade entre os habitantes (Logan 1953) e perdas agrícolas (Heggstad 1991) intensificaram estudos de biomonitoramento da poluição do ar com plantas, especialmente com variedades de *Nicotiana tabacum* (De Temmerman *et al.*, 2004).

De Temmerman *et al.*, (2004) classificam as espécies vegetais utilizadas em biomonitoramento de acordo com o tipo de reação ao poluente:

- **Bioindicadoras:** são sensíveis e apresentam sintomas visíveis como necroses e cloroses foliares, bem como alteração na morfologia e aborto de flores e frutos;
- **Biosensoras ou biomarcadoras:** os sintomas apresentados não são visíveis, necessitando de microscópio ou técnicas de análises fisiológicas. Os danos restringem-se a alterações nos níveis molecular, celular, além de distúrbios fisiológicos;
- **Bioacumuladoras:** espécies menos sensíveis à poluição do ar, acumulam partículas e gases-traço em seus tecidos;
- **Indicadoras ecológicas:** são observadas mudanças em comunidades vegetais,

como o desaparecimento de espécies não tolerantes à poluição ou colonização de espécies oportunistas e/ou mais tolerantes.

Nos últimos anos, muitas espécies vegetais têm sido utilizadas com eficiência no monitoramento de poluentes, sobretudo ozônio. Entre essas espécies, destacam-se, pela difusão e procedimentos analíticos simples, aquelas que apresentam mutagênese, enquadradas na categoria de biosensoras, como *Allium cepa*, *Vicia faba* e clones de híbridos de *Tradescantia* sp. (Grant 1994).

1.1.6) Bioensaios de mutagênese e clastogênese

Agentes genotóxicos (como as EAO) podem causar lesões primárias em DNA, como oxidação e dimerização de bases nitrogenadas, as quais podem ou não ser atenuadas com enzimas de reparo do DNA. Injúrias mais dramáticas ocorrem tanto no nível de gene quanto de cromossomos e levam, respectivamente, à expressão de genes mutantes e alterações estruturais (fragmentações e aberrações) cromossômicas (Uhl *et al.*, 2003).

Os bioensaios utilizados para detectar genotoxicidade, listados por Grant (1999), baseiam-se, freqüentemente, em dois grupos de injúrias: aberrações cromossômicas e mutações genéticas.

A fragmentação de braços de cromossomos (clastogênese) ocorre durante a divisão celular, tanto em mitose quanto em meiose e em consequência de mutações genéticas. Tem sido, igualmente, utilizada como resposta bioindicadora da presença de agentes

genotóxicos no ambiente. Tais fragmentos, denominados micronúcleos (MCN), organizam-se fora do núcleo principal e podem ser visualizados em fases específicas da divisão celular (Uhl *et al.*, 2003).

Entre os bioensaios de clastogênese mais utilizados, estão o *Allium* Test, que consiste em quantificar MCN em células do ápice de raiz de espécies como *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, entre outras (Fiskesjo 1997).

Outra categoria de bioensaio de clastogênese, denominado TRAD-MCN envolve clones híbridos de *Tradescantia* sp. (BNL e KU). Tal bioensaio consiste em quantificar MCN em células-mães de grão de pólen em ramos florais expostos a um agente de clastogênese. Se tais células estiverem nas fases iniciais do ciclo meiótico (prófase I), consideradas as mais sensíveis à ação de agentes de clastogênese, serão formados MCN, os quais poderão ser visualizados na fase de tétrades (Ma 1982). A figura 1.1 mostra o ciclo meiótico em células-mães de grão de pólen em *Tradescantia* sp. .

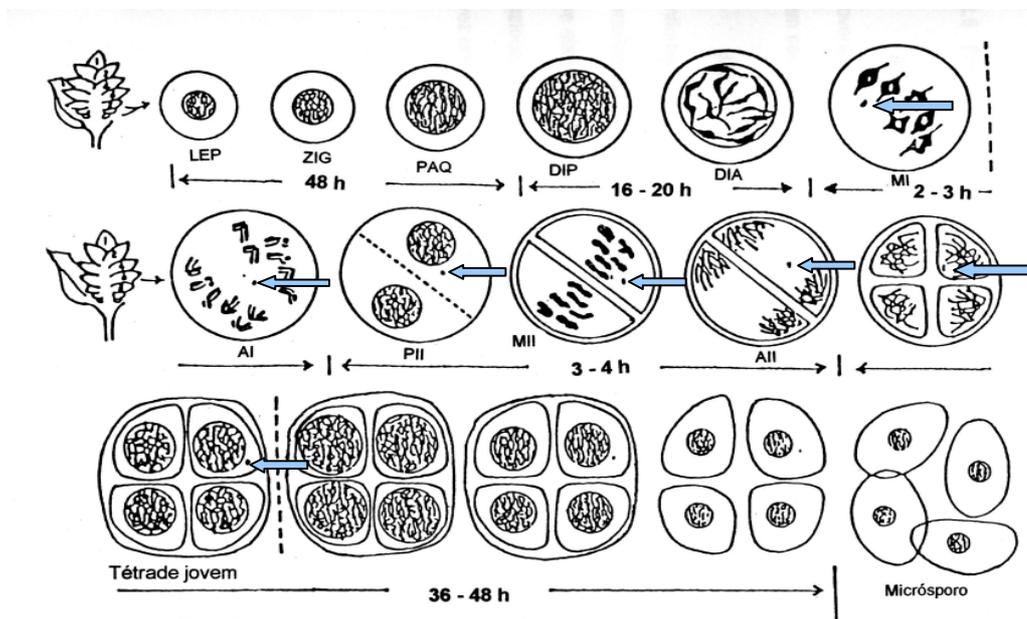


Figura 1.1: Ciclo meiótico em *Tradescantia* sp. (Ma 1983). As setas indicam presença de micronúcleos.

Os clones da série BNL foram desenvolvidos na década de 1950, no Brookhaven National Laboratory, EUA. Tais clones demonstraram, desde o início, sensibilidade a agentes genotóxicos, especialmente radiação (Rodrigues *et al.* 1997).

Apenas a partir da década de 1970, os clones BNL, especialmente o 4430, híbrido diplóide resultante do cruzamento de *T. hirsutifolia* e *T. subacaulis*, passaram a ser utilizados em biomonitoramento de poluição ambiental (Vant' Hof & Schairer 1982). Nessa mesma época, foram desenvolvidos os clones da série KU, na Universidade de Kioto, Japão, para o mesmo fim (Ichikawa 1992). Desde então, inúmeros estudos têm aplicado tais clones na detecção, principalmente, de poluentes em água (Gill & Sandhu 1992), ar (Ferreira *et al.* 2007) e solo (Cotelle *et al.* 1999), entre muitos outros.

Na região metropolitana de São Paulo, vários estudos têm sido conduzidos com tais clones para detectar a presença de poluentes atmosféricos (Batalha *et al.* 1999, Sant'Anna 2003, entre outros)

Porém, alguns desses autores apontam dificuldades de adaptação dos clones às condições climáticas da região, o que compromete sua eficiência como bioindicador de contaminação do ambiente (Sant'Anna 2003, Ferreira 2004).

Além disso, a formação de MCN pode ser condicionada por diversos fatores, entre climáticos (radiação, temperatura, umidade relativa), poluentes diversos ou substâncias tóxicas (formaldeído, pesticidas, etc) (Rodrigues *et al.* 1997). Em relação à poluição atmosférica, essa não especificidade dificulta investigações *in situ* sobre o potencial clastogênico de poluentes específicos como o ozônio, como ocorreu no estudo de Savóia (2007). Em vista disso, estudos devem ser conduzidos para atestar a clastogênese de ozônio, em condições experimentais controladas.

Aliás, embora reconhecidamente fitotóxico para várias espécies vegetais, não é

consencioso que ozônio possa impor clastogênese para clones de *Tradescantia* (Rodrigues *et al.* 1996)

Assim com o intuito de propor uma espécie que possa ser empregada para biomonitoramento de ozônio, adaptada às condições climáticas da Região e eficiente para o bioensaio TRAD-MCN, o presente estudo propõe investigar o potencial bioindicador de *Tradescantia pallida* ‘Purpurea’ para ozônio.

Tradescantia pallida ‘Purpurea’ é uma cultivar nativa da América Central, muito utilizada em várias partes do mundo para ornamentação de canteiros, inclusive no Brasil e tem sido utilizada para monitorar poluição ambiental por meio do bioensaio TRAD-MCN (Batalha *et al.* 1999, Guimarães *et al.* 2000, Suyama *et al.*, 2002, Sant’Anna 2003, Savóia 2007)

No presente estudo, levantaram-se as seguintes hipóteses:

- *T. pallida* ‘Purpurea’, devido ao seu alto conteúdo de água nas células do mesofilo, de acordo com Paiva *et al.* (2003), é sensível ao ozônio.
- A intensidade da injúria clastogênica depende da capacidade antioxidativa, de modo que esta aparecerá após a quebra do equilíbrio oxidante/ antioxidante. Partindo desse desequilíbrio, um certo período é requerido para a formação de micronúcleos.

1.2. Objetivos

- Estabelecer frequência basal de micronúcleos em indivíduos cultivados em ambiente isento de contaminação do ar (casa de vegetação) e fatores condicionantes;
- Determinar o grau de sensibilidade de *T. pallida* 'Purpurea' a ozônio e fatores condicionantes além do período necessário para a visualização dos danos;
- Estabelecer a capacidade bioindicadora de *T.pallida* 'Purpurea' para avaliar riscos clastogênicos impostos por ozônio.

1.3. Literatura citada

Alloway, B. J. & Ayres, D. C. 1993. Chemical Principles of Environmental Pollution. Blackie Academic & Professional, UK.

- Ashmore, M. R.** 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment* 28: 949-964
- Batalha, J. R. F., Guimarães, E.T., Lobo, D. J. A., Lichtenfels, A. J. F. C., Deur, T., Carvalho, H. A., Alves, E. S., Domingos, M., Rodrigues, G. S. & Saldiva, P. H. N.** 1999. Exploring the clastogenicity effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using *Tradescantia micronuclei* assay. *Mutation Research* 426: 229-232
- Calatayud, A., Iglesias, D. J., Talón, M. & Barreno, E.** 2003. Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 839-845
- Castillo, F. J., Penel, C. & Greppin, H.** 1984. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves. *Plant Physiology* 74: 846-851
- CETESB.- Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo** 2007. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo – 2006. Série *Relatórios*/ Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Chernikova, T., Robinson, J. M., Lee, E. H. & Mulchi, C.** 2000. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynthesis Research* 64: 15-26
- Clapp, L. J. & Jenkin, M. E.** 2001. Analysis of the relation between ambient levels of O₃,

NO₂ and NO as a function of NO_x in the UK. *Atmosphere Environment* 35: 6391-6405

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. 1990. Resolução nº 03, de 28/09/1990.

Ministério do Meio Ambiente.

[Http://www.conama.gov.br/port/conama/res/res90/res0390.html](http://www.conama.gov.br/port/conama/res/res90/res0390.html) (acesso em

11/10/2006)

Conklin, P. L. & Barth, C. 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment* 27: 959-970

Constantin, M. J. & Owens, A. 1982. Plant genetic systems with potential for the detection of atmospheric mutagens. *In*: R. R. Tice, D. L. Costa, K. M. Schaich. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Plenum Press, New York. Pp 159-177.

Cotelle, S., Masfaraud, J. F. & Férard, J. F. 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/ Vicia* – micronucleus and the *Tradescantia* – micronucleus assays. *Mutation Research* 426: 167-171

Darral, N. M. 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell and Environment* 12: 1-30

**De Temmerman, L., Bell, J. N. B., Garrec, J. P., Klumpp, A., Krause, G. H. M.,
Tonnejck, A. E. G.** 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – onsiderations

- for the future. *In*: A. Klumpp, W. Ansel, & G. Klumpp. (eds). 2004. Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness. Cuvillier Verlag, Gottingen. pp. 337-373
- Emerit, I.** 1984. Active oxygen species at the origin of sister chromatid exchanges. *In*: Hollaender, A. (ed). 1984. Basic Life Sciences – Sister Chromatid Exchanges – part A Plenum Press, USA. 127-139 pp
- Ferreira, M. I.** 2004. Avaliação do potencial genotóxico da poluição atmosférica no Parque do Ibirapuera, São Paulo, com o bioensaio TRAD-STH de clones da *Tradescantia* . Dissertação de Mestrado. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ferreira, M. I., Domingos, M., Gomes, H. A, Saldiva, P. H. N. & Assunção, J. V.** 2007. Evaluation of mutagenic potential of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, São Paulo – SP, Brazil, using the *Tradescantia* stamen hair assay. Environmental Pollution 145: 219-224
- Finlayson-Pitts, B. & Pitts Jr., J. N.** 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. Science 276: 1045-1052
- Fiskesjo, G.** 1997. Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. *In*: G. Fiskesjo (ed). Plants for Environment Studies. CRC Press, USA. 308-333 pp

- Gardner, D. E. & Gardner, S. C. M.** 1994. Toxicology of air pollution. *In*: L. G. Cockerham, & B. S. Shane (eds) 1994. Basic Environmental Toxicology, CRC Press, USA. pp 287-319
- Gill, B. S. & Sandhu, S. S.** 1992. application of the *Tradescantia* micronucleus assay for the genetic evaluation of chemical mixtures in soil and aqueous media. *Mutation Research* 270: 65-69.
- Goldsmith, J. R., Friger, M. D. & Abramson, M.** 1996. Associations between health and ' air pollution in time-series analyses. *Archives of Environmental Health* 51: 359-367.
- Grant, W.** 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research* 310: 175-185.
- Grant, W.** 1999. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research* 426: 107-112.
- Guimarães, E. T., Domingos, M., Alves, E. S., Caldini Jr. , N., Lobo, D. J. A., Lichtenfels, A. J. F. C. & Saldiva, P. H. N.** 2000. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brasil) with the *Tradescantia* – micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environmental and Experimental Botany* 44: 1-8.
- Heath, R. L.** 1975. Ozone. *In*: J. B. Mudd, & T. T. Kozłowski (eds). 1975. Responses of

plants to air pollution. Academic Press, Inc., USA, pp. 23-55.

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.

Ichikawa, S. 1992. *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its responses to ionizing radiations and chemical mutagens, and some synergistic effects found. *Mutation Research* 270: 3-22.

Iglesias, D. J., Calatayud, A., Barreno, E., Primo-Millo, E., Talon, M. 2006. Responses of citrus plants to ozone: leaf biochemistry, antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 125-131.

Janakiraman, R. & Harney, P. M. 1976. Effects of ozone on meiotic chromosomes of *Vicia faba*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology* 18: 727-730.

Klumpp, A. 2001. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. *In*: Maia, N. B., Martos, H. L. & Barreira, W. (eds). 2001. Indicadores ambientais: conceitos e aplicações. Editora da Pontifícia Universidade Católica – EDUC, São Paulo, pp. 77-93.

Krupa, S. A. & Manning, W. J. 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137

- Laisk, A., Kull, O. & Moldau, H.** 1989. Ozone concentration in the leaf intercellular air space is close to zero. *Plant Physiology* 90: 1163-1167
- Logan, W. P. D.** 1953. Mortality in London fog incident. *Lancet* 1: 336-338
- Ma, T.H.** 1982. *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiose). A report of the U.S. Environmental Protection Agency. *Mutation Research* 99: 293-302.
- Ma, T. H.** 1983. *Tradescantia*-micronucleus (Trade-MCN) test for environmental clastogenesis. *In*: A. R. Klover, T. K. Wong, L. D. Grant, R. S. Dewoskin & T. J. Huges (eds). *In vivo* toxicity testing of environmental agents. Plenum Press, New York, pp. 191-214.
- Mehlman, M. A. & Borek, C.** 1987. Toxicology and biochemical mechanisms of ozone. *Environmental Research* 42: 36-53
- Misik, M., Micieta, K., Solenska, M., Misikova, K., Pisarcikova, H. & Knasmuller, S.** 2007. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia* micronucleus and pollen abortion tests with wild life plants: demonstration of the efficacy of emission controls in a eastern European city. *Environmental Pollution* 145: 459-466.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410

- Moraes, R. M., Furlan, C. M., Bulbovas, P., Domingos, M., Meirelles, S. T., Salatino, A., Delitti, W. B. C. & Sanz, M. J.** 2004. Photosynthetic responses of tropical trees to short-term exposure to ozone. *Photosynthetica* 42: 291-293.
- Novak, K., Skelly, J. M., Schaub, M., Krauchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuer, P.** 2003. ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environmental Pollution* 125: 41-52.
- Orendovici, T., Skelly, J. M., Ferdinand, J. A., Savage, J. E., Sanz, M. J. & Smith, G. C.** 2003. Response of native plants of northeastern United States and southern Spain to ozone exposures, determining exposure response relationships. *Environmental Pollution* 125: 31-40
- Paiva, E.A.S., Isaias, R.M.S., Vale, F.H.A., Queiroz & C.G.S.** 2003. The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *Purpurea Boom* (Commelinaceae) leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 617-624.
- Perchorowicz, J. T. & Ting, I. P.** 1974. Ozone effects on plant cell permeability. *American Journal of Botany* 61: 787-793.
- Percy, K. E., Awmack, C. S., Lindroth, R. L., Kubiske, M. E., Kopper, B. J., Isebrands,**

- J. G., Pregitzer, K. S., Hendrey, G. R., Dickson, R. E., Zak, D. R., Oksanen, E., Sober, Zaak, Harrington, R. & Karnosky, D.** 2002. . Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO₂ e O₃. *Nature* 420: 403-407.
- Rodrigues, G.S., Madkour, S.A. & Weinstein, L.H.**, 1996. Genotoxic activity of ozone in *Tradescantia*. *Environmental and Experimental Botany* 36: 45-50.
- Rodrigues, G. S., Ma, T. H., Pimentel, D. & Weinstein, L. H.** 1997. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16(4): 325-359
- Saldiva, P. H. N., Lichtenfels, A. J. F. C., Paiva, P. S. O., Barone, I. A., Martins, M. A., Massad. E., Pereira, J. C. R., Xavier, V. P., Singer, J. M. & Bohm, G. M.** 1994. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, brazil: a preliminary report. *Environmental Research* 65: 218-225.
- Sant'Anna, E. T. G.** 2003; Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação dos riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero *Tradescantia*. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo. 102 p
- 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 doutoramento, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.

Savóia, E. J. L. 2007. Potencial de *Tradescantia pallida* cv 'Purpurea' para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André – São Paulo – por meio do bioensaio Trad – MCN e do acúmulo foliar de elementos tóxicos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7-12.

Seinfeld, J.H. 1989. Urban air Pollution: state of the Science. *Science*. 243: 745-752.

Schwartz, J. & Dockery, D. W. 1992. Increased mortality in Philadelphia associated with daily air pollution concentrations. *American Review of Respiratory Disease* 145: 600-604

Smirnoff, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. *In*: N. Smirnoff (ed). 1995. *Environmental and Plant Metabolism – Flexibility and Acclimation*. BIOS Scientific Publisher Limited, UK, pp. 217-243.

Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.

Spengler, J. D., Koutrakis, P., Dockery, D. W., Raizenne, M. & Speizer, F. E. 1996. Health effects of acid aerosols on North american children: air pollution exposures. *Environmental Health Perspectives* 104(5): 492-499.

- Suyiama, F., Guimarães, E. T., Lobo, D. J. .A., Rodrigues, G. S., Domingos, M. Alves, E. S., Carvalho, H. A. & Saldiva, P. H. N.** 2002. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *Purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35: 127-129.
- Treshow, M. & Anderson, F. K.** 1989. *Plant stress from air pollution*. John Wiley & Sons, UK.
- Uhl, M., Plewa, M. J., Majer, B. J., Knasmuller, S.** 2003. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. *In: J. Maluszynska, & M. Plewa* (eds). *Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and Human Health*. Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego, Katowice, pp. 1-30.
- Vant' Hof, J. & Schairer, L. A.** 1982. *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens – a report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* 99: 303-315.

Monitoramento da frequência espontânea de micronúcleos em *T. pallida* 'Purpurea' em ambiente isento de contaminação atmosférica

2.1. Resumo

Entre as espécies vegetais utilizadas em biomonitoramento da poluição atmosférica, *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt cv Purpurea Boom, uma Commelinaceae de hábito herbáceo, originária da América Central, tem sido utilizada com eficiência, devido à sua rusticidade, facilidade de cultivo e boa adaptação às condições climáticas do Brasil. O bioensaio TRAD-MCN, o qual é empregado para tal espécie, consiste em quantificar fragmentação de cromossomos, induzida por agentes mutagênicos, como contaminantes do ar, durante a prófase I da meiose. Esses fragmentos, chamados de micronúcleos (MCN), organizam-se na periferia do núcleo e são visualizados em tétrades de células – mães de grãos

de pólen. Entretanto, não são conhecidos registros de acompanhamento da frequência espontânea de MCN em ambientes *indoor*, livres de poluentes atmosféricos, para *T. pallida* 'Purpurea'. Nesse estudo, propõe-se demonstrar a variação na frequência basal de MCN, no período de agosto de 2005 a dezembro de 2006 e correlacionar tais valores às médias de temperatura e de umidade relativa máximas, mínimas, e à variação diária de radiação solar global registrada no período. Indivíduos de *T. pallida* 'Purpurea' foram cultivados em vasos plásticos, exclusivamente em casa de vegetação climatizada, com irrigação por capilaridade e adubação quinzenal. Foram coletadas inflorescências dessas plantas e empregado o bioensaio TRAD-MCN, com análise de dez lâminas por mês. A temperatura dentro da casa de vegetação foi auferida por termohigrógrafo. Dados sobre umidade relativa do ar e radiação solar global foram cedidos pelo Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo e corrigidos para as condições da casa de vegetação. A média mensal das máximas registradas foi de 24 °C (janeiro de 2006) a 33,6 °C (outubro de 2005), mínimas de 16,9 °C (setembro de 2006) a 26,1 °C (novembro de 2006) e variação de 4,8 °C (novembro de 2006) a 13 °C (setembro de 2006). A média de radiação solar global variou entre 6,34 (setembro de 2005) a 10,78 (dezembro de 2005) MJ/ m². A umidade relativa do ar variou entre 65,1% (agosto de 2005) a 75,7 (setembro de 2005). A porcentagem de MCN variou de 0,4% (novembro de 2005) a 1,8% (junho de 2006). No entanto, análises estatísticas não indicaram diferenças entre os meses. Não houve relação significativa entre as frequências basais e umidade relativa do ar e radiação solar global. Entretanto, episódios mais amenos de temperatura máxima diária (entre 22 e 28°C) e menores oscilações térmicas (amplitude entre 4 e 8 °C) foram determinantes para picos de MCN ao longo do experimento.

Palavras-chave: bioensaio Trad-MCN, clastogênese, Commelinaceae,

2.2. Introdução

Alterações fenotípicas e genotípicas dos órgãos reprodutivos de vegetais são dramaticamente influenciadas pelas condições do ambiente. Essa plasticidade pode ser explicada pelo fato de que carpelos e estames são originados pela diferenciação de tecidos meristemáticos vegetativos, constantemente afetados pelas alterações ambientais, sobretudo climáticas (Chiarello & Gulmon 1991).

Disfunções hormonais e expressão de genes induzem alterações na ontogênese de estames e carpelos e gametogênese (Raghavan 1997). Em várias espécies, anormalidades na meiose são responsáveis pela formação de pólen estéril e baixa produção de sementes (Golubovskaya 1979).

Como exemplo, Corrêa *et al.* (2005) conduziram experimento de análise de microsporogênese e viabilidade polínica em espécies de Araceae e constataram que a temperatura e sazonalidade climática podem afetar a produção de pólen viável. Em outro estudo, Souza *et al.* (2006) encontraram segregação incompleta de cromossomos na meiose e formação de micronúcleos em uma espécie de Rubiaceae e também creditaram essas alterações a fatores ambientais e expressão gênica.

Entre as alterações ambientais mais dramáticas, a poluição de diversos tipos pode afetar, de modo significativo, a reprodução das plantas. Em um estudo, emissões de contaminantes do ar, oriundos de pólo industrial, foram positivamente correlacionadas com esterilidade de pólen em diversas espécies arbóreas nativas em uma região da Europa (Misik *et al.* 2007).

Em face dessa influência, para algumas espécies vegetais empregadas em ensaios de genotoxicidade, a correta compreensão dos dados depende do prévio conhecimento

da ocorrência dessas anomalias em condições de ausência dos poluentes ou de agentes genotóxicos a que se pretende monitorar. Assim, vários estudos foram realizados nos últimos anos, com o objetivo de estabelecer níveis basais de mutações espontâneas, especialmente em clones de *Tradescantia* sp.

A maior parte desses estudos aborda a frequência de mutações espontâneas em células somáticas de pêlo estaminal em clones KU e BNL, utilizando o bioensaio TRAD – STH (Ichikawa 1992, Ma *et al.* 1994). Nesses experimentos, a variação na temperatura ambiente pode ser correlacionada com a taxa de mutações. Apesar da ampla difusão do bioensaio de clastogênese com células – mães de grão de pólen, poucos estudos se propuseram a acompanhar a frequência espontânea de micronúcleos em clones de *Tradescantia* sp. Pode-se destacar, nesse grupo, o experimento conduzido por Klumpp *et al.* (2004), que simularam diversos gradientes de temperatura e umidade relativa do ar em laboratório e expuseram inflorescências do clone BNL 4430 para conferir sua eficácia em diferentes condições térmicas. Não há registros de experimento semelhante envolvendo *Tradescantia pallida* 'Purpurea'.

Em face disso, o presente estudo propõe delimitar a taxa espontânea de micronúcleos em tétrades de *T. pallida* 'Purpurea' e estabelecer um valor basal com plantas cultivadas em ambiente comprovadamente isento de contaminantes atmosféricos, mas submetido à sazonalidade climática observada na cidade de São Paulo. e correlacionar os valores basais às oscilações da temperatura, umidade relativa do ar e radiação solar global, registrados ao longo do experimento.

2.3. Material e métodos

2.3.1) Cultivo

Indivíduos de *T. pallida* 'Purpurea' foram propagados vegetativamente por estacas e plantados em vasos plásticos contendo uma mistura de substrato de casca de *Pinus* e turfa e vermiculita, na proporção de 3:1. Pedacos de barbante de náilon foram introduzidos no fundo de cada vaso, deixando que uma extremidade ficasse entre o substrato e a outra imersa em caixotes plásticos abastecidos com água, o que garantiu constante irrigação por capilaridade.

As plantas foram adubadas quinzenalmente com solução hidrossolúvel de N-P-K (10-30-20) e permaneceram durante todo o experimento na casa de vegetação da Seção de Ecologia do Instituto de Botânica (figura 2.1.A e 2.1.B). Esse ambiente recebeu ar filtrado, isento de partículas e de gases, durante todo o experimento. Aparelhos de ar condicionado, cujo funcionamento era controlado por termostato, permitiram simular as condições térmicas similares às do ambiente externo. Durante o cultivo, as plantas permaneceram sob fotoperíodo de, aproximadamente, 12 h.



Figura 2.1. Condições de cultivo de *T. pallida* 'Purpurea' para o experimento. **A:** Casa de vegetação da Seção de Ecologia/ IBT. **B:** *T. pallida* 'Purpurea' plantada em vasos plásticos sobre caixotes com água para irrigação. Fotos: E. S. Lima.

2.3.2) Bioensaio TRAD-MCN

Inflorescências de *T. pallida* 'Purpurea' foram coletadas na segunda ou terceira semana de cada mês, entre agosto de 2005 e dezembro de 2006. Tais inflorescências não passaram por período de recuperação e foram diretamente fixadas após coleta. O material coletado foi fixado solução de Carnoy # 1 (Singh 2003), onde permaneceu por 24 horas e depois, foi transferido para solução de etanol a 70% até a preparação para o bioensaio TRAD-MCN (figura 2.2).

O protocolo adotado para o bioensaio foi o estabelecido por Ma (1981). Para cada amostragem mensal, foram coletadas dez inflorescências jovens das plantas mantidas na casa de vegetação. Entre os botões de cada uma dessas inflorescências, um deve apresentar

células-mães no estágio da prófase I da meiose, mais especificamente, a fase de tétrades, onde é possível visualizar micronúcleos (MCN), como na figura 2.3. Esses botões foram dissecados com estiletos e as anteras foram maceradas sobre lâmina de vidro, juntamente com o corante aceto carmim (Roth 1964).

As lâminas foram analisadas em microscópio (modelo CBB, Olympus), em aumento de 400 X

A frequência de MCN foi expressa em porcentagem, para lâmina analisada, a partir do seguinte cálculo (Silva 2005):

$\% \text{ de MCN} = a/b * 100$, sendo: a = total de MCN encontrados

b = total de tétrades analisadas

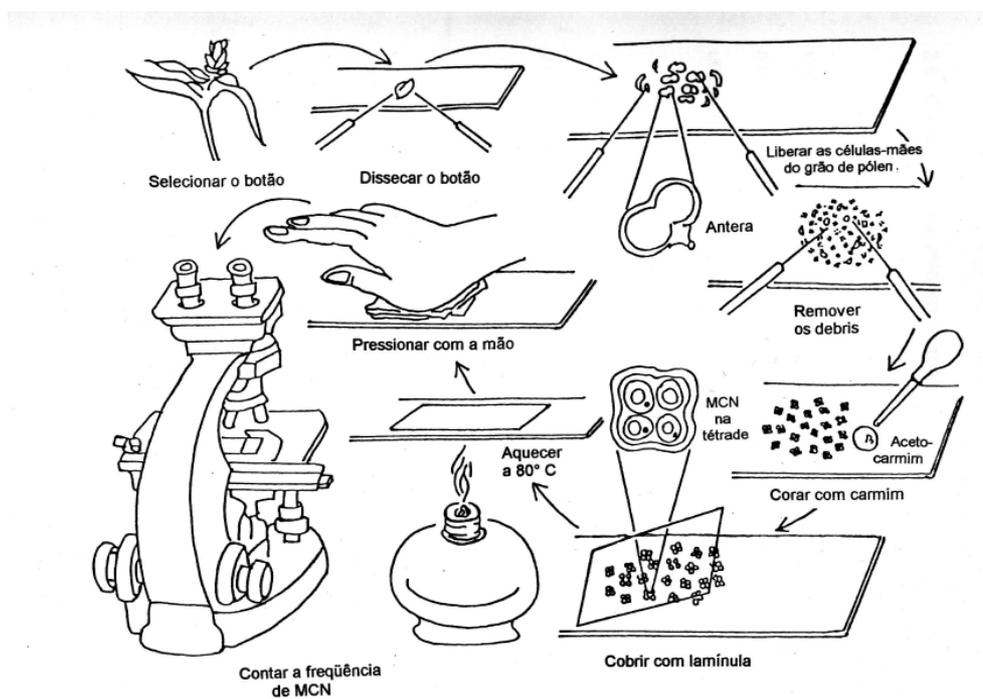


Figura 2.2. Procedimentos protocolados para o bioensaio TRAD-MCN (Ma 1981).

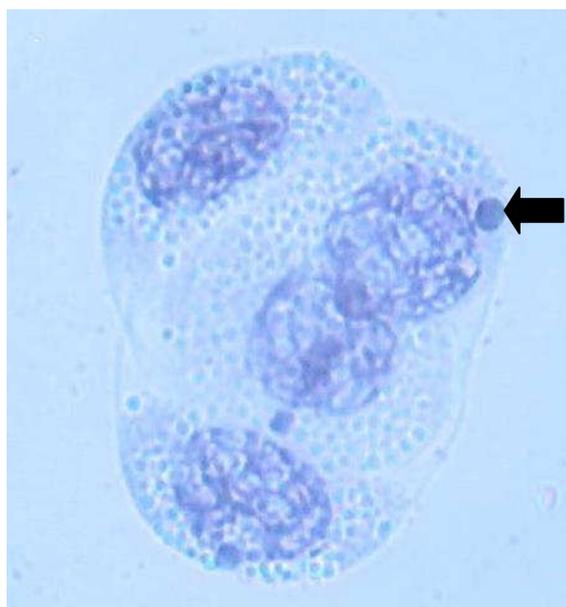


Figura 2.3: Tétrade de *T. pallida* 'Purpurea' com um micronúcleo, apontado pela seta. Foto: E. S. Lima.

Durante todo o período, a temperatura foi auferida por termohigrógrafo (TZ- -18 td, Zootechnikh, Poland). Entretanto, falhas ocasionais no equipamento não permitiram reunir dados contínuos ao longo de todo o período. Para preencher tais lacunas, foram adotados, então, dados fornecidos pelo Instituto de Astronomia e Geofísica (IAG) da Universidade de São Paulo. Foi empregado um índice de correção, obtido a partir dos dados registrados pelo termohigrógrafo, para tornar os valores cedidos pelo IAG adequados para as condições da casa de vegetação. Da mesma maneira, os valores diários de umidade relativa do ar e de radiação global, também cedidos pelo IAG, foram adaptados às condições da casa de vegetação, tendo por base as diferenças entre os valores gerados por Bulbovas (2005) para o mesmo local e para seus locais de amostragem situados na cidade de São Paulo.

2.3.4) Análises estatísticas

Foi empregada análise de variância (não paramétrica; teste de Kruskal-Wallis) com 1 fator para verificar se houve variação na frequência basal de MCN ao longo dos meses.

Foram realizadas análises de regressão entre a frequência de micronúcleos e os registros de temperatura e de umidade relativa do ar (com valores máximos, mínimos e médios diários, assim como com a amplitude entre valores máximos e mínimos em cada dia) e os de radiação solar global média.

2.4. Resultados

A figura 2.4 ilustra os valores diários das variáveis climáticas, registrados na casa de vegetação da Seção de Ecologia do IBT. Na figura 2.4.A, nota-se que não houve forte sazonalidade nas temperaturas médias, máximas e mínimas diárias ao longo dos meses de amostragem. A temperatura média permaneceu em uma faixa entre 20 e 30°C. A média mensal das máximas registradas variou de 24°C (janeiro de 2006) a 33,6°C (outubro de 2005), das mínimas de 16,9°C (setembro de 2006) a 26,1°C (novembro de 2006) e da amplitude térmica de 4,8°C (novembro de 2006) a 13°C (setembro de 2006). A figura 2.4.B mostra os valores de máximas e mínimas diárias para umidade relativa do ar. Nota-se considerável variação entre as médias diárias dos valores mínimos registrados (20% a 80%) e menor variação nos valores máximos diários ao longo do ano (60 a 90%). Em média, a umidade

relativa do ar, em base diária, ficou entre 65,1% (agosto de 2005) e 75,7 (setembro de 2005). Com o índice de correção empregado para adequar os valores cedidos pelo IAG à casa de vegetação, constatou-se redução da umidade relativa do ar em 11% nesse recinto, em relação à observada no ambiente externo. Na figura 2.4.C, a média de radiação solar global variou entre 6,34 (setembro de 2005) a 10,78 (dezembro de 2005) MJ/ m² . Com a correção dos valores fornecidos pelo IAG, foi constatada uma redução de 45% de radiação incidente na casa de vegetação em relação ao ambiente externo.

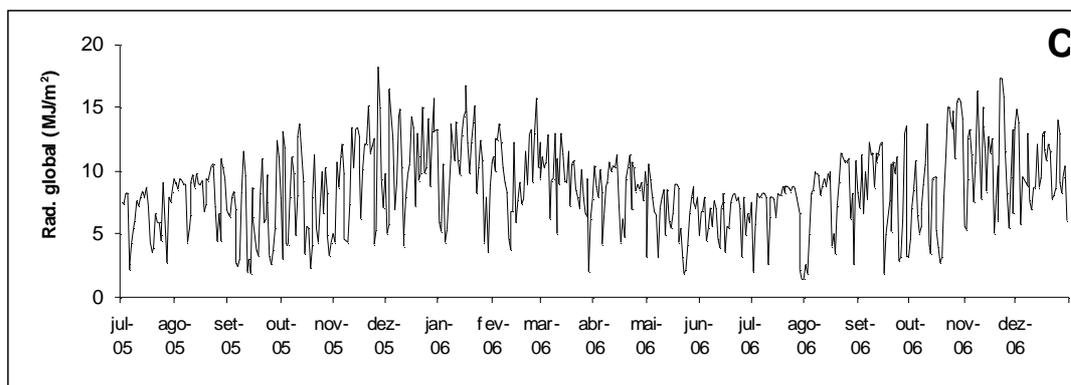
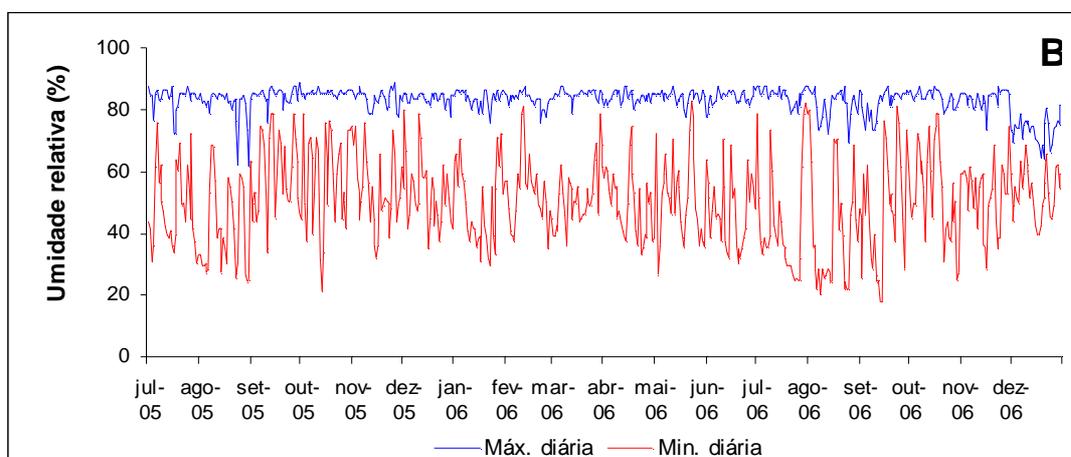
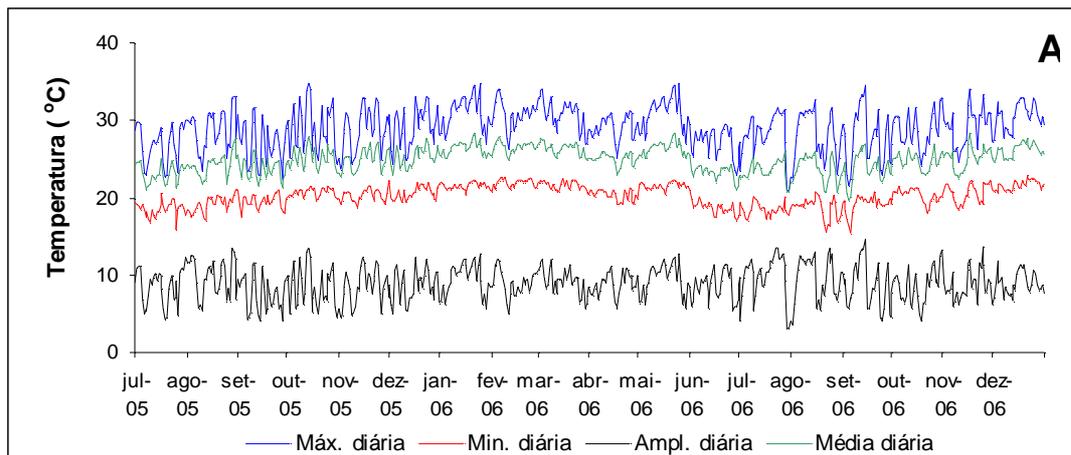


Figura 2.4: Variáveis climáticas registradas na casa de vegetação Seção de Ecologia/IBT durante o experimento de monitoramento (agosto de 2005 a dezembro de 2006). **A:** Temperatura máxima, média, mínima e amplitude térmica diária; **B:** Umidade relativa do ar máxima e mínima diárias; **C:** média diária de radiação solar global.

A figura 2.5 mostra a frequência de MCN obtida de células-mães de grão de pólen em inflorescências coletadas entre os indivíduos de *T. pallida* 'Purpurea' cultivados exclusivamente em casa de vegetação. Análises de variância indicaram que a frequência de MCN não indica diferenças significativas entre os meses investigados. Entretanto, nota-se tendência de aumento dessa frequência nos meses em que foram registradas as temperaturas mais amenas e radiação solar mais baixa. Os referidos meses foram junho e agosto (mediana = 1,3% para ambos os meses).

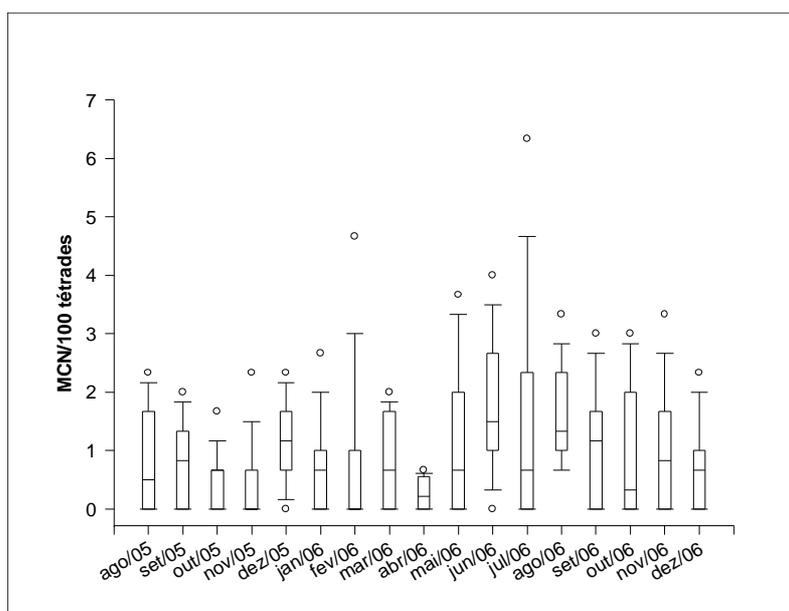


Figura 2.5: Frequência de micronúcleos (MCN) observada em inflorescências de plantas de *T. pallida* 'Purpurea' mantidas em casa de vegetação, ambiente isento de contaminação atmosférica, entre agosto de 2005 e dezembro de 2006.

A linha que divide cada retângulo indica a mediana dos dados; os retângulos delimitam os 25% de dados acima e abaixo da mediana (percentis de 25 e 75); as barras de erro mostram os valores situados entre os percentis de 10 e 25 ou entre os de 75 e 90 e os símbolos (o) os valores extremos (abaixo do percentil de 5 ou acima do de 95).

Foram construídas matrizes de regressão entre a taxa de micronúcleos obtida em cada dia de amostragem e os valores das variáveis climáticas mencionadas anteriormente, no próprio dia de análise e nos 05 dias que antecederam a amostragem, assim como com valores médios mensais (dados não mostrados). Verificou-se relação significativa e mais evidente (com base no maior valor de r^2) entre frequência de MCN e amplitude térmica e valores máximos de temperatura registrados três dias (72 horas) antes da amostragem, como mostra a figura 2.6. Assim, a menor frequência de MCN observada ao longo de um mês pode ser explicada pela maior oscilação térmica (figura 2.5.A), com $r^2 = 0,49$ e também por picos de temperatura registrados 72 horas antes (figura 2.5.B), com $r^2 = 0,47$. Por outro lado, as oscilações na frequência de MCN não foram associadas à sazonalidade nos valores de umidade relativa e de radiação global (dados não mostrados).

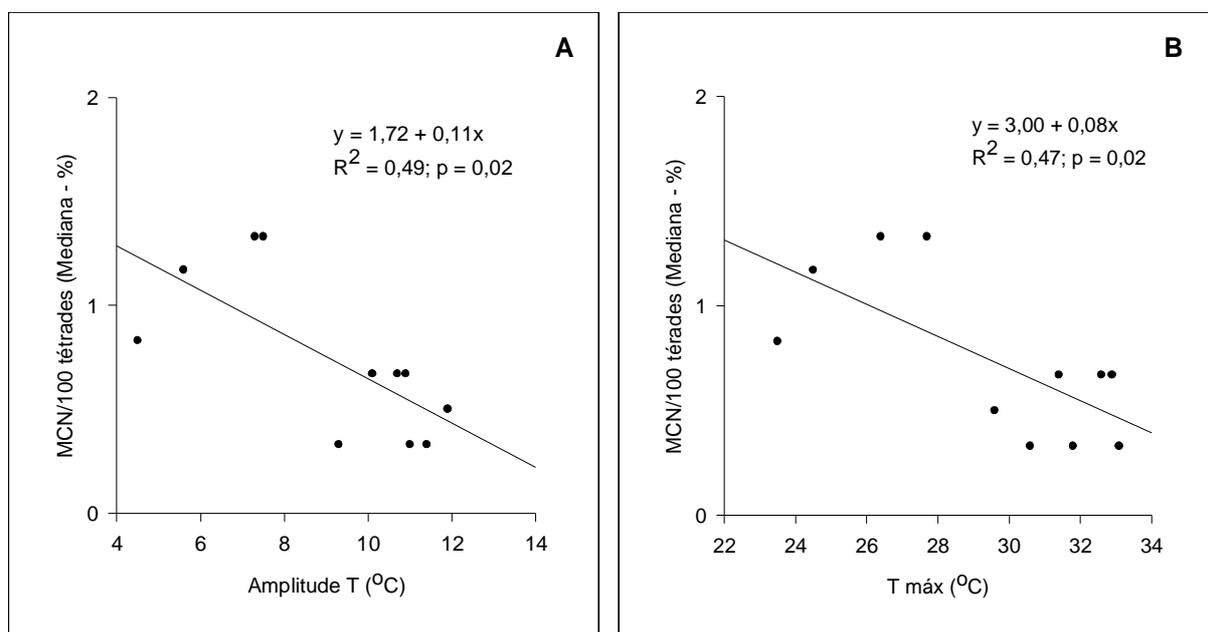


Figura 2.6: Relação entre frequência de micronúcleos (MCN) e temperatura do ar três dias antes da amostragem. **A:** MCN *versus* amplitude térmica; **B:** MCN *versus* máximas de temperatura.

2.5. Discussão

As frequências espontâneas de MCN observadas no presente estudo variaram entre 0,4 e 1,8% de MCN. Estudos de monitoramento da frequência basal de MCN em ambiente comprovadamente isento de poluentes genotóxicos são escassos, mesmo para os clones KU e BNL de *Tradescantia*, amplamente difundidos em biomonitoramento. Ruiz *et al.* (1992) investigaram poluentes genotóxicos em várias regiões do México e mantiveram, em laboratório com condições experimentais controladas, inflorescências do clone BNL 4430 para monitoramento mensal, por mais de dois anos. Os autores afirmam que a média de frequência de MCN nessas inflorescências foi de 0,8 %. Klumpp *et al.* (2006) determinaram que, nas condições climáticas européias, a frequência de MCN de clones BNL 4430 cultivados em casa de vegetação variou entre 0,6 e 2,9%. Assim, a frequência basal de MCN em *T. pallida* 'Purpurea' se alinha àquelas observadas para o clone BNL, propostas nos estudos citados.

Porém, em relação a *T. pallida* 'Purpurea', o presente estudo é o primeiro registro conhecido de frequência de MCN em plantas cultivadas em ambiente reconhecidamente isento de poluentes genotóxicos. Estudos realizados com essa cultivar utilizam plantas já estabelecidas em localidades consideradas livres ou com menor concentração de contaminantes atmosféricos. Alves *et al.* (2003) encontraram uma faixa de frequência entre 1,9 e 5,3% em inflorescências expostas em sítio-controle. Já Guimarães *et al.* (2000) constataram uma média de 2,3% de MCN em inflorescências cultivadas em uma localidade distante daquelas investigadas no estudo. Todos esses valores, aliás, estiveram acima dos registrados nesta pesquisa. Essas diferenças são possíveis visto a formação de

MCN ser um evento não específico, isto é, a clastogênese pode ser condicionada por vários agentes, como poluentes do solo, ar e água, radiação ionizante, radiação UV, pesticidas, etc, como demonstra Ma *et al.* (1982), que testou a genotoxicidade de vários agentes em clones de *Tradescantia*. Assim, pode-se dizer que mesmo em condições supostamente livres de contaminantes atmosféricos, um considerável conjunto de fatores condicionantes podem ter imposto clastogênese à *T. pallida* 'Purpurea' tomadas como controle nos referidos estudos.

Nas condições experimentais do presente estudo, análises estatísticas não revelaram ligação significativa com umidade relativa do ar, o que está de acordo com o observado por Klumpp *et al.* (2004), ao investigarem o efeito de diferentes faixas de temperatura e umidade relativa do ar para a frequência de MCN em plantas do clone BNL 4430 expostas a condições experimentais controladas. Esses autores não encontraram relação significativa entre frequência de MCN e esse fator climático.

Não foi encontrada relação significativa entre MCN e radiação solar para *T. pallida* 'Purpurea'. Não há registros de monitoramento de clastogênese imposta por radiação solar nessa cultivar. No entanto, para o clone BNL 03, por exemplo, há o estudo desenvolvido por Wang & Wang (1999), que expuseram inflorescências a radiação solar acrescida de radiação UVB, artificialmente produzida. Os autores afirmam que inflorescências mantidas como controle, que foram submetidas a um pico de radiação solar, sem adição de UVB, apresentaram uma taxa anormalmente alta de MCN (7,1%). Os autores concluíram que o aumento de MCN foi estimulado pela intensidade da radiação solar.

A temperatura foi apontada como o fator climático mais influente na frequência basal de MCN observada em *T. pallida* 'Purpurea'. Análises estatísticas indicaram que declínio de temperatura ou grandes oscilações térmicas levaram à formação de MCN 72 horas depois. Tal constatação está de acordo com estudos desenvolvidos com clones BNL e

KU. Kumpp *et al.*. (2004) constataram que aumento de clastogenicidade no clone BNL 4430 está condicionado a temperaturas mais baixas no período de recuperação, quando inflorescências são mantidas em ambiente livre de agentes genotóxicos para a continuidade do ciclo meiótico. Ichikawa *et al.*. (1996) também reportam o aumento de mutações em células somáticas de pêlo estaminal nos clones KU a temperaturas mais baixas.

No presente estudo, concluiu-se que a frequência de MCN em *T. pallida* 'Purpurea' em ambiente isento de contaminantes atmosféricos oscilou pouco ao longo do estudo, em média entre 0,4 e 1,8%. Não houve comprovação estatística da relação entre essas frequências basais e variáveis climáticas, como umidade relativa do ar e radiação solar global.

Entretanto, episódios mais amenos de temperatura máxima diária (entre 22 e 28°C) e menores oscilações térmicas (amplitude entre 4 e 8 °C) foram determinantes para picos de MCN ao longo do experimento. Conforme será mostrado no próximo capítulo, as respostas clastogênicas observadas em inflorescências de *T. pallida* expostas ao ozônio foram mais intensas nessas condições.

2.6. Literatura citada

Alves, E. S., Pedroso, A. N. V., Domingos, M., Guimarães, E. T. & Saldiva, P. H. N.
2003. Biomonitoramento *indoor* do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. *Hoehnea* 30(2): 89-94

Bulbovas, P. 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras de resistência da espécie à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 108 p.

Chiarello, N.R. & Gulmon, S.L. 1991. Stress effects on plant reproduction. In: Response of plants to multiple stresses, H. Mooney, AA. William, E. Winner & E. J. Pell (eds). Academic Press Inc. pp. 161 – 187

Corrêa, M.G.S., Viégas, J., Silva, J. B., Ávila, P. F. V., Busato, G. R., Lemes, J. S. 2005. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Botanica Brasilica* 19(2): 295-303

Golubovskaya, I. N. 1979. Genetic control of meiosis. *International Review of Cytology*. 58:247-290

Guimarães, E. T., Domingos, M., Alves, E. S., Caldini Jr., N., Lobo, D. J. A., Lichtenfels, A. J. F. C. & Saldiva, P. H. N. 2000. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia* – micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environmental and Experimental Botany* 44: 1-8

Ichikawa, S. 1992. *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its responses to ionizing radiations and chemical mutagens, and some synergistic effects found. *Mutation Research* 270: 3-22

Ichikawa, S., Nakano, A., Kenmochi, M., Yamamoto, I., Murai, M., Takahashi, E., Yamaguchi, A., Watanabe, K., Tomiyama, M., Sugiyama, K., Yogo, A., Yazaki, T., Okumura, M., Shima, N., Satoh, M., Yoshimoto, M., Xiao, L. Z. 1996. Yearly variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of *Tradescantia* clone KU 9 grown outdoors, which showed a significant increase after the Chernobyl accident. *Mutation Research* 349: 249-259

Klumpp, A., Ansel, W., Fomin, A., Schnirring, S. & Pickl, C. 2004. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. *Hereditas* 141: 142-148

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Calatayud, V., Garrec, J. P., He, S., Peñuelas, J., Ribas, A., Ro-Poulsen, H., Rasmussen, S., Sanz, M. J. & Vergne, P. 2006. *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in Europe cities. *Environmental Pollution* 139: 515-522

Ma, T. H. 1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. *Environmental Health Perspective* 37: 85-90

Ma, T. H., Cabrera, G. L., Cebulska-Wasilewska, A., Chen, R., Loarca, F., Vandenberg, A. L. & Salamone, M. F. 1994. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutation Research* 310: 211-220

- Misik, M., Micieta, K., Solenska, M., Misikova, K., Pisarcikova, H. & Knasmuller, S.** 2007. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia micronucleus* and pollen abortion tests with wild life plants: demonstration of the efficacy of emission controls in a eastern European city. *Environmental Pollution* 145: 459-466
- Raghavan, V.** 1997. *Molecular embriology of flowering plants*. Cambridge University Press. 690 p
- Roth, I.** 1964. *Microtécnica vegetal*. Editora Facultad de Ciencias Universidad Central de Venezuela, Caracas. 87 p.
- Ruiz, E. F., Rabago, V. M. E., Lecona, S. U., Perez, A. B. & Ma, T. H.** 1992. *Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring*. *Mutation Research* 270: 45-51
- Silva, M. D.** 2005. *Delimitação do potencial de plantas de Tradescantia pallida cv. Pupurea cultivadas na cidade de São Paulo par indicadores de riscos clastogênicos impostos pela poluiçã aérea*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 69 p.
- Singh, R.** 2003. *Plant cytogenetics*. C R C Press, USA. 463 p.

Souza, M. M., Martins, E. R., Pereira, T. N . S. & Oliveira, L. O. 2006. Reproductive studies on Ipeac (*Cephaelis ipecacuanha* (BROT.) A. Rich; Rubiaceae): Meiotic behaviour and pollen viability. *Brazillian Journal of Biology* 66(1A): 151-159

Wang, S. & Wang, X. 1999. The *Tradescantia* – micronucleus test on the genotoxicity of UV-B radiation. *Mutation Research* 426: 151-153

Grau de sensibilidade de *Tradescantia pallida* 'Purpurea' ao ozônio por meio de respostas clastogênicas

3.1. Resumo

O presente estudo investiga a correlação entre formação de micronúcleos (MCN) e fatores condicionantes, como concentração de ácido ascórbico (AA), um reconhecido antioxidante, e temperatura do ar durante a realização dos bioensaios, em inflorescências de *T. pallida* 'Purpurea' expostas a ozônio. Propõe-se também investigar se o tempo de recuperação para visualização de micronúcleos (MCN) é diferente do estabelecido no protocolo TRAD-MCN. Inflorescências retiradas de indivíduos cultivados exclusivamente em casa de vegetação foram distribuídas em duas câmaras fechadas de fumigação, uma com aporte de ar filtrado e outra com ar filtrado enriquecido com 60 ou 80 ppb de ozônio,

fumigados durante três horas de um único dia. Subgrupos dessas inflorescências começaram a ser retirados a cada 24 horas após fumigação, até completar 120 horas. Em cada subgrupo, foram analisadas a formação de micronúcleos em células-mães de grãos de pólen (bioensaio TRAD-MCN) e, por meio de análises de regressão, a influência da concentração de AA total em brácteas dessas inflorescências e da temperatura diária durante o bioensaio sobre as respostas clastogênicas. Análises estatísticas mostram que há, predominantemente, significativo aumento da frequência de MCN a 72 horas após fumigação com ozônio. A concentração de AA variou nos dois tratamentos em função do tempo de recuperação e da amplitude térmica desse período, não apresentando correlação positiva com ozônio. Entretanto, há nítida relação entre declínio da concentração de AA e conseqüente aumento da frequência de MCN 24 horas depois. A intensidade de formação de micronúcleos também dependeu da amplitude térmica ou das temperaturas máximas. Nas condições de realização do presente estudo, a fim de obter respostas clastogênicas mais evidentes, pode-se recomendar que os bioensaios, da exposição ao ozônio ao período de recuperação, sejam realizados sob a menor amplitude diária possível entre temperaturas máxima e mínima ($< 8^{\circ}\text{C}$) e sob temperaturas máximas entre 20 e 26°C . Contudo, ainda não é possível determinar a eficiência de *T. pallida* para indicar riscos clastogênicos impostos por ozônio, sob condições naturais, uma vez que não foi possível estabelecer modelo de curva dose x resposta entre concentrações de ozônio e frequência de micronúcleos.

Palavras-chave: ácido ascórbico, ecotoxicologia, micronúcleo

3.2. Introdução

Ozônio é um dos mais oxidativos constituintes do *smog* fotoquímico (Heath 1975). Esse poluente reage com a superfície aquosa de membranas e espaços intercelulares e forma espécies ativas de oxigênio (EAO), que reagem indiscriminadamente com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos nos seres vivos, levando à degradação e rompimento de membranas, peroxidação lipídica e mutagênese (Perchorowicz & Ting 1974, Victorin 1992, Rodrigues *et al.* 1996, Bray *et al.* 2000, Baier *et al.* 2005, Foyer & Noctor 2005).

Há décadas atrás, vários estudos já relacionavam o potencial fitotóxico desse poluente e formação de injúrias em plantas (Treshow & Anderson 1989). Desde então, variados efeitos sobre as plantas têm sido apontados na literatura, como os relacionados na tabela 1.2 (capítulo 1).

Além disso, uma miríade de estudos aponta a variação da sensibilidade a ozônio entre as espécies vegetais (Castillo & Greppin 1988, Kangasjarvi *et al.* 1994, Luwe & Heber 1995, Torsethaugen *et al.* 1997, Lyons *et al.* 1999, Burkey & Eason 2002, Langebartels *et al.* 2002, Song *et al.* 2005, Moraes *et al.* 2006, entre muitos outros). Esses estudos convergem para o fato de que plantas apresentam um complexo sistema de defesas antioxidativas, formado por várias substâncias enzimáticas e não-enzimáticas, entre as quais ácido ascórbico, que são mobilizadas para atenuar os efeitos das EAO e manter o equilíbrio oxidante /antioxidante.

Ácido ascórbico é, reconhecidamente, um antioxidante não-enzimático protetor contra os efeitos deletérios das EAO (Smirnoff 1995, Horemans *et al.* 2000). Em plantas expostas a concentrações de ozônio, genótipos sensíveis são justamente aqueles que

sintetizam ácido ascórbico em menor quantidade, indicando que concentrações mais altas desse antioxidante conferem maior tolerância ao poluente (Menser 1964, Turcsányi *et al.* 2000, Chen & Gallie 2005).

As injúrias deverão ocorrer somente após superada a capacidade de detoxificação e reparo. (Calatayud & Barreno 2001, Burkey & Eason 2002, Long & Naidu 2003). A eficiência do sistema antioxidativo contra EAO é, portanto, um indicativo da sensibilidade de plantas às condições de estresse impostas por ozônio.

Plantas com genótipos sensíveis a ozônio, por geralmente serem ineficientes em minimizar o estresse oxidativo, são recomendadas para estudos de biomonitoramento, desde que rapidamente indiquem a presença desse poluente no ambiente pela formação de injúrias características e detectáveis por métodos de fácil aplicação. Assim, muitas dessas espécies vegetais têm sido utilizadas como bioindicadoras de ozônio, baseadas, sobretudo, na formação de típicas necroses foliares (Heggstad 1991, Krupa *et al.* 1993, Orendovici *et al.* 2003).

Tais respostas visíveis, no entanto, são menos apropriadas para indicar riscos genotóxicos impostos por ozônio do que bioensaios baseados em efeitos sobre o DNA. Essa aplicação adicional seria possível, considerando que danos citogenéticos em plantas sensíveis ao ozônio, como clastogênese (formação de fragmentos cromossômicos ou micronúcleos {MCN}) e expressão de genes mutantes já foram observados, como demonstraram Fetner (1958) e Rajeshwari & Harney (1976), expondo indivíduos de *Vicia faba* a fumigações com ozônio e correlacionando esse tratamento a clastogênese. Porém, isso ainda não é consencioso, pois Girchner *et al.* (1992), com procedimentos semelhantes, não detectou mutações somáticas em *Tradescantia* (clone BNL 4430). Já Rodrigues *et al.* (1996), também utilizando BNL 4430, observaram aumento da frequência, porém apenas após três dias de

tratamento com 100 ppb de ozônio por 6 horas/dia.

Tais resultados contrastantes indicam, portanto, que o grau de sensibilidade da espécie vegetal ao poluente não é o único aspecto a ser considerado na procura de plantas bioindicadoras sensíveis ao ozônio.

A intensidade de necroses foliares ou mesmo de respostas clastogênicas mostradas por essas espécies, na realidade, pode ser condicionada tanto por fatores do meio em que vivem as plantas, como por suas características fisiológicas e metabólicas. Além disso, vários estudos apontam características anatômicas como espessura da epiderme e mesofilo, densidade estomática, espaços intercelulares, proporção entre parênquima paliçádico/ lacunoso e alterações estruturais nos elementos condutores como condicionantes adicionais de sensibilidade a poluentes atmosféricos (Alves 1995, Evans *et al.* 1996, Ferdinand *et al.* 2000, Pedroso 2006). Fatores climáticos, especialmente temperatura e umidade relativa do ar, estão entre os condicionantes do meio físico capazes de interferir na sensibilidade de plantas a estresse. Isidori *et al.* apontam a sazonalidade das estações climáticas como fator adicional para a formação de MCN, além da exposição à poluição atmosférica em clones BNL 4430 de *Tradescantia*. Ainda, Klumpp *et al.* (2004) observaram nítida influência da temperatura na formação de MCN para o mesmo clone BNL 4430. Desse modo, a utilização de plantas sensíveis ao ozônio para biomonitoramento pode ser inviabilizada por tais interferências.

Alguns estudos demonstraram que os clones de *Tradescantia* parecem não se adaptar às condições climáticas da região metropolitana de São Paulo (Sant'anna 2003, Ferreira 2004), cuja densidade populacional e grande frota de veículos sublinha a importância de estudos de biomonitoramento da poluição atmosférica na região. Com isso, estudos recentes têm procurado utilizar uma espécie do mesmo gênero, mas comprovadamente melhor adaptada às condições climáticas da região: *Tradescantia pallida* 'Purpurea'. Essa espécie, nativa da

América Central e amplamente utilizada em paisagismo, já demonstrou ser sensível à radiação ionizante, agente reconhecidamente clastogênico, tanto quanto o clone BNL 4430 (Suyama *et al.* 2002). Outros estudos correlacionam constituintes da poluição atmosférica com aumento da frequência de micronúcleos em *T. pallida* 'Purpurea', retificando sua sensibilidade à poluição do ar (Batalha *et al.* 1999, Guimarães *et al.* 2000, Savóia 2007, Silva 2007). Contudo, não foi investigada, ainda, a sensibilidade dessa cultivar a ozônio, que, conforme hipótese levantada no capítulo anterior, pode ser alta, e tão pouco os fatores que a condicionam. Além disso, Falistocco *et al.* (2000), investigando a duração do ciclo meiótico em micrósoros do clone BNL 4430, demonstraram que, em plantas tratadas com agente clastogênico, o aumento de micronúcleos mais intenso é observado a partir de 72 horas após a exposição. Estudos dessa natureza com *T. pallida* 'Purpurea' não são conhecidos.

Portanto, com base nessas considerações, o presente estudo propõe investigar o grau de sensibilidade de *T. pallida* 'Purpurea' ao ozônio, sob condições experimentais e se o potencial clastogênico de ozônio para a cultivar é modulado pelas variações nas concentrações de ácido ascórbico foliar e/ou nas condições de temperatura durante as etapas de execução do bioensaio Trad-MCN. Além disso, propõe-se delimitar o período de recuperação ideal para visualizar as injúrias citogenéticas provocadas pela exposição ao poluente.

3.3. Material e Métodos

3.3.1) Cultivo

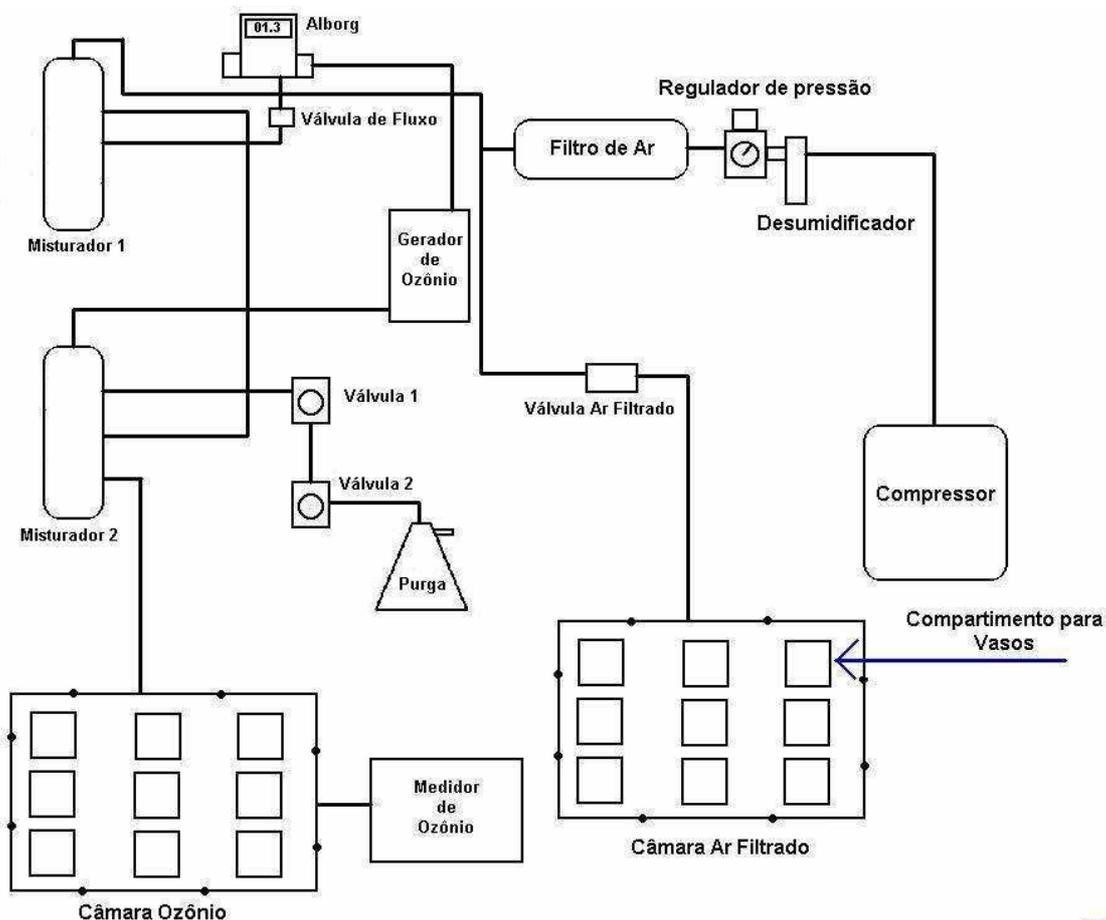
Os ramos florais utilizados nos bioensaios foram provenientes de plantas cultivadas exclusivamente em casa de vegetação climatizada e sob ar filtrado, com manejo descrito no ítem *Cultivo* do capítulo dois.

3.3.2) Sistema de fumigação de ozônio

O presente estudo foi desenvolvido sob condições experimentais, em sistema de fumigação com ozônio (figura 3.1). Este é composto por duas câmaras fechadas (figura 3.2.A), de um metro cúbico cada, construídas com estrutura de aço inoxidável e revestidas com filme Teflon®, conectadas a compressor, filtro de ar, válvula de controle de fluxo de ar (Alborg®), desumidificador, cilindros de mistura de poluentes (misturadores 1 e 2), gerador de ozônio (Ozontechnik®) e equipamento de monitoramento contínuo da concentração de ozônio (Ecotech ® 9810B), em destaque na figura 3.2.B.

No laboratório que abriga as câmaras, foram instaladas lâmpadas de vapor metálico de 400 W e lâmpadas fluorescentes de 30 W (figura 3.2.C). Os ramos florais de *T. pallida* permaneceram sob essa iluminação artificial (aproximadamente $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$),

por, aproximadamente, dez horas diárias, durante a fumigação e durante os períodos de recuperação.



YHS 2006

Figura 3.1. Sistema de fumigação de poluentes do laboratório de fumigação da Seção de Ecologia/ IBT. Ilustração: Yukio Hayashi da Silva

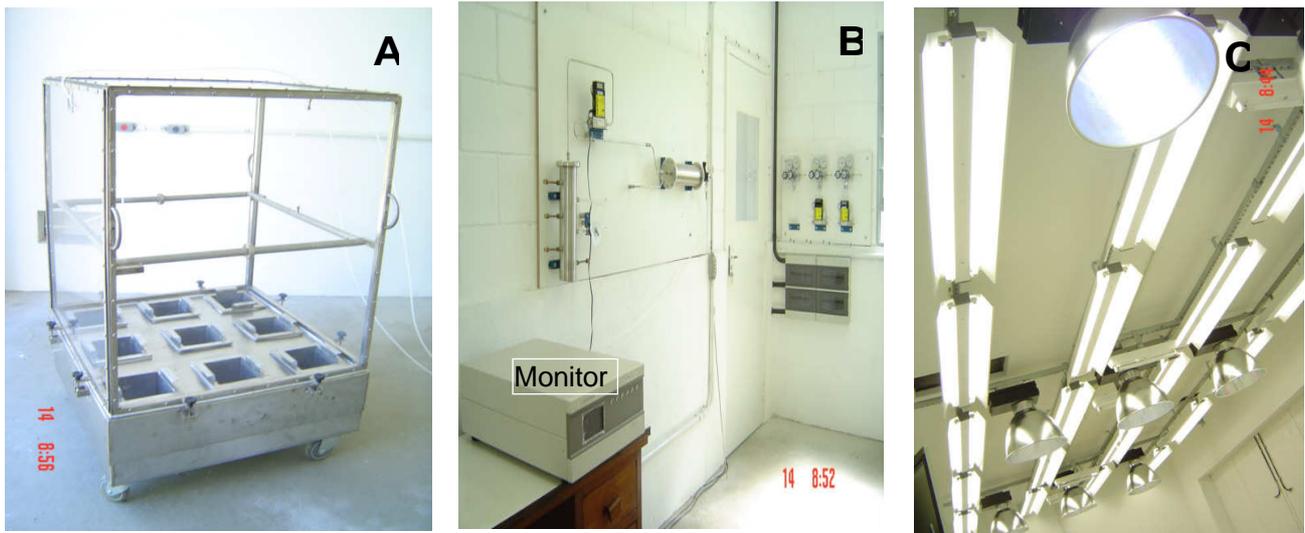


Figura 3.2. Componentes do sistema de fumigação de ozônio. **A:** Câmara de fumigação; **B:** Monitor de concentração de ozônio, filtro e um dos misturadores; **C:** Lâmpadas do laboratório de fumigação. Fotos: S.M.R. Sant'Anna.

3.3.3) Fumigação

Como mencionado anteriormente, foram utilizadas duas câmaras fechadas de fumigação. Uma delas recebeu um aporte de ar filtrado isento de partículas e de gases (tratamento denominado AF) e a outra câmara, ar filtrado enriquecido com ozônio (AF + O₃), em concentração média de 60 ou 80 ppb, em um único dia por três horas. Foram realizados quatro experimentos de fumigação com 60 ppb, um em cada estação do ano. As fumigações com 80 ppb de ozônio, em número de duas, foram conduzidas apenas na primavera, período em que se supunha observar maior intensidade de respostas clastogênicas. Em todos os casos, as concentrações desejadas de ozônio foram obtidas por meio da mistura proporcional de ar

filtrado e de ozônio gerado pelo ozonizador (figura 3.1) e checadas continuamente por meio do monitor de ozônio.

Cinco grupos distintos com 10 a 15 ramos florais de *T. pallida* 'Purpurea' foram distribuídos em béqueres contendo água ultra-pura (3.3.A) e acondicionadas entre as duas câmaras (figura 3.3.B). Durante três horas, enquanto a câmara AF recebia ar filtrado, a câmara AF + O₃ recebia o ar enriquecido de ozônio, na concentração estipulada. Ao fim desse prazo, o fluxo de ozônio foi interrompido nesta última, a qual passou a receber apenas ar filtrado por mais três horas. Ao fim desse processo, os cinco grupos de inflorescências provenientes do tratamento AF + O₃ foram transferidos para a câmara AF, onde permaneceram até o final do período de recuperação (de 24 a 120 h). Quando possível, um sexto grupo adicional de ramos florais foi introduzido em cada câmara, os quais representaram a situação antes do início da recuperação (indicada com 0h nas figuras de resultados).

Os registros diários de temperatura máxima e mínima na câmara de ar filtrado, na qual as inflorescências permaneceram durante todo o período de recuperação foram obtidos por termohigrógrafo (TZ-18td, Zootechnikh, Poland), que ficou instalado, durante todo o experimento, dentro da referida câmara. Foi calculado, ainda, por subtração o valor máximo e mínimo, a amplitude diária de temperatura.

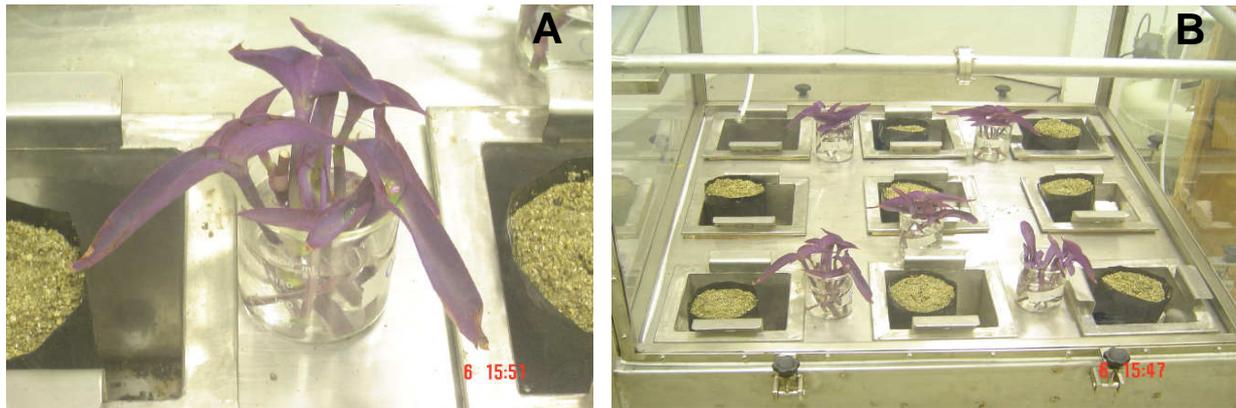


Figura 3.3. Exposição de inflorescências de *T. pallida* 'Purpurea' a fumigação. **A:** Grupo de inflorescências em béquer; **B:** Disposição dos cinco grupos de béqueres com inflorescências no interior de uma câmara.

3.3.4) Períodos de recuperação e obtenção de amostras para os ensaios

Imediatamente após a transferência dos ramos florais da câmara AF + O₃ para a AF, foram retirado, sempre que possível, o sexto grupo de inflorescências submetido a cada um dos tratamentos, representando a situação inicial do período de recuperação (0h). A partir de então, a cada 24 h, um grupo de ramos de cada tratamento, nos quatro experimentos com 60 ppb, foi sendo retirado e levado para análises de concentração de ácido ascórbico nas brácteas e da frequência de micronúcleos nas inflorescências até o prazo máximo de 120 h, em que o último lote foi retirado. Cada lote retirado foi denominado de acordo com o período em que permaneceu em recuperação na câmara AF (indicados como 24h, 48h, 72h, 96h e 120h nas figuras de resultados). Nos experimentos com 80 ppb, somente a frequência de MCN nas inflorescências foi obtida.

3.3.5) Bioensaio TRAD-MCN

Os procedimentos utilizados nesse experimento seguem o protocolo estabelecido por Ma (1981), descritos no item *Material e Métodos* do capítulo dois.

3.3.6) Análise da concentração de ácido ascórbico

Ácido ascórbico total foi determinado em brácteas frescas (0,5 g), homogenizados com 12 mL de EDTA- Na_2 (0,07%) e ácido oxálico (0,5%). A mistura foi centrifugada em 18.000 rpm por 30 minutos a 2°C. A uma alíquota do supernadante foram adicionados 2,5 mL de diclorofenol-indofenol PA (DCPiP) (0,02%) e a absorvância do extrato foi mensurada espectofotometricamente em 520 nm (primeira leitura). Depois da adição de 0,05 mL de ácido ascórbico (1%), uma segunda absorvância foi medida. Ambas as medidas de absorvância foram utilizadas para estimar a concentração de ácido ascórbico, a qual foi expressa em mg g^{-1} de massa seca (Keller & Schwager 1977).

3.3.7) *Análises estatísticas*

As diferenças entre as concentrações de ácido ascórbico e entre as frequências de MCN observadas nos dois tratamentos, câmara de ar filtrado (AF) e câmara de ar filtrado enriquecida com 60 ppb de ozônio (AF+O₃) e ao longo do tempo de recuperação, foram determinadas por análise de variância com dois fatores: primeiro fator – Fumigação com AF ou AF + O₃ e segundo fator – tempos de recuperação. Quando a análise de variância indicou diferença significativa, foi usado teste de comparação múltipla (método de Student-Newman-Keuls) para localizar as diferenças significativas. Em todos os casos, analisou-se se os dados apresentavam distribuição normal e igualdade de variâncias.

Análises não paramétricas (teste de Kruskal-Wallis, seguidas do mesmo teste de comparações múltiplas ou teste de Mann-Whitney, que compara dois tratamentos), identificaram diferenças significativas em cada um dos tratamentos (AF e AF + O₃) entre os experimentos realizados. Os resultados, nessas situações, foram apresentados por gráficos do tipo *box-plot*. Em tal representação, a mediana dos dados foi indicada pela linha que divide cada retângulo; estes, por sua vez, delimitaram os 25% de dados acima e abaixo da mediana, ou seja, os percentis de 25 e 75. Considerando ainda a distribuição dos dados separados pela mediana, as barras de erro mostraram os valores situados entre os percentis de 10 e 25 ou entre os de 75 e 90 e os símbolos (o) os valores extremos (abaixo do percentil de 5 ou acima do de 95).

Análises de regressão linear foram empregadas para estabelecer a relação entre temperatura e as variáveis biológicas (frequência de MCN e concentração de ácido ascórbico), assim como entre concentrações de ácido ascórbico e frequência de MCN.

3.4.Resultados

3.4.1) Temperatura média registrada durante os experimentos

Os valores máximos, mínimos, bem como a amplitude de temperatura a cada tempo de recuperação são ilustrados na figura 3.4. Sempre que possível, foi considerada também a temperatura registrada imediatamente após o término da fumigação. Ressalta-se que esses valores referem-se apenas à câmara de ar filtrado, sítio de recuperação das inflorescências. Por ser formado por peças de liga metálica, não foi instalado um termohigrógrafo na câmara de ar com ozônio, pois havia a possibilidade das peças sofrerem oxidação. Porém, diante da semelhança entre as câmaras e do fato de ambas terem estado no mesmo recinto, pôde-se admitir que os ramos florais inseridos em ambas as câmaras foram submetidos às mesmas variações de temperatura durante a fumigação e a recuperação.

Nota-se maior estabilidade térmica no experimento de fumigação realizado no inverno, quando as inflorescências foram submetidas a 60 ppb de ozônio. Essa estabilidade é corroborada pela menor amplitude entre todos os tratamentos, bem como valores de temperatura máxima e mínima bem próximos. Nos demais experimentos, a amplitude entre temperaturas máxima e mínima em cada dia de recuperação foi maior (entre 10 e 20°C). Verifica-se, ainda, a semelhança nas condições térmicas entre os três experimentos realizados na primavera.

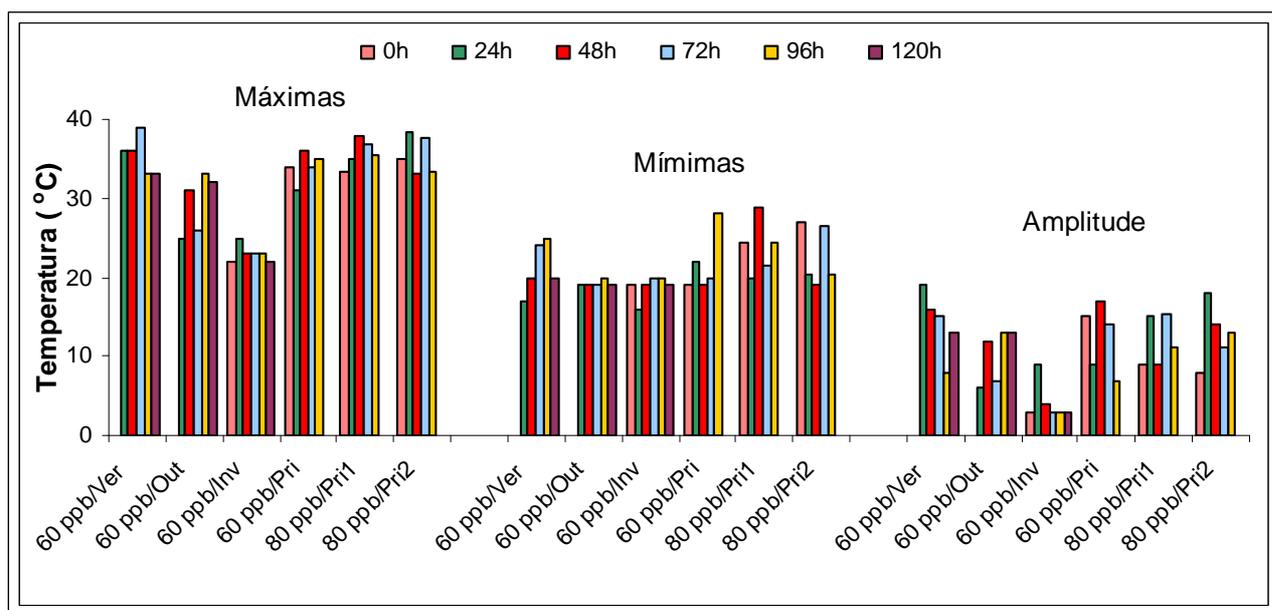


Figura 3.4. Temperaturas máximas, mínimas e amplitude térmica registrada em cada tempo de recuperação nos experimentos de 60 e 80 ppb.

Ver: verão; Out: outono; Inv: inverno; Pri: primavera; Pri1: primeira fumigação com 80 ppb realizada na primavera; Pri2: segunda fumigação com 80 ppb realizada na primavera.

3.4.2) *Frequência de micronúcleos e concentrações de ácido ascórbico após fumigação com 60 ppb de ozônio*

A frequência de micronúcleos em *T. pallida* 'Purpurea' submetida à fumigação com ar filtrado (AF) e fumigação com ar filtrado enriquecido com 60 ppb de ozônio (AF + O₃), cujos experimentos foram realizados em diferentes estações climáticas, é apresentada na figura 3.5. A frequência de MCN entre os períodos de recuperação foi bastante variada entre os tempos de recuperação. No verão, no tratamento AF + O₃, houve aumento significativo na

formação de micronúcleos, em comparação aos valores observados sob ar filtrado, em todos os tempos de recuperação. No inverno, isso ocorreu após 24h, 48h e 120h de recuperação. Nota-se, também, o aumento da frequência de micronúcleos observada a 72 horas após fumigação nos experimentos da primavera, do verão e do outono, em ambas as câmaras. No inverno, enquanto as frequências foram equivalentes ao longo da recuperação nas inflorescências submetidas ao ar filtrado, valores máximos foram obtidos após 24h e 120h de recuperação, seguidos pelos obtidos após 48 e 72h, comparados à frequência inicial (0h), naquelas fumigadas com 60 ppb de ozônio

As análises estatísticas indicaram também diferenças significativas entre as campanhas efetuadas nas quatro estações climáticas, para ambos os tratamentos de fumigação, como mostra a figura 3.6. Nas fumigações com ar filtrado somente e com ar filtrado enriquecido com ozônio, observa-se frequência significativamente maior na campanha realizada no inverno, em relação às outras estações climáticas (figuras 3.6A e B).

Comparando-se os dois tratamentos de fumigação, verificou-se que a fumigação com 60 ppb de ozônio promoveu aumento significativo da frequência de micronúcleos (figura 3.6C).

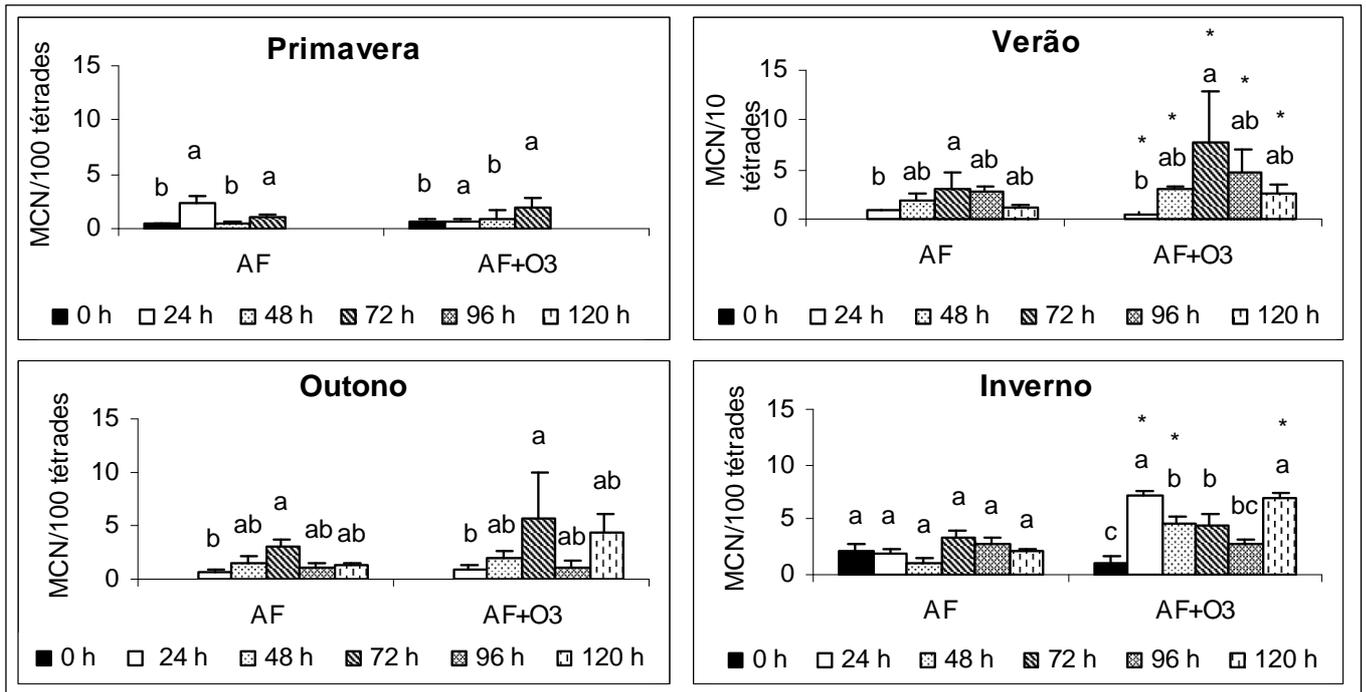


Figura 3.5: Freqüência média de MCN e respectivos erros-padrão (barras) observada em cada tempo de recuperação nos tratamentos de fumigação efetuados nas quatro estações climáticas.

AF: fumigação com ar filtrado; AF + O₃: fumigação com ar filtrado enriquecido com 60 ppb de ozônio. Em cada tratamento de fumigação, freqüências médias indicadas com letras distintas diferem entre si significativamente. Asteriscos indicam freqüências médias significativamente maiores do que as observadas no tempo de recuperação correspondente no tratamento AF.

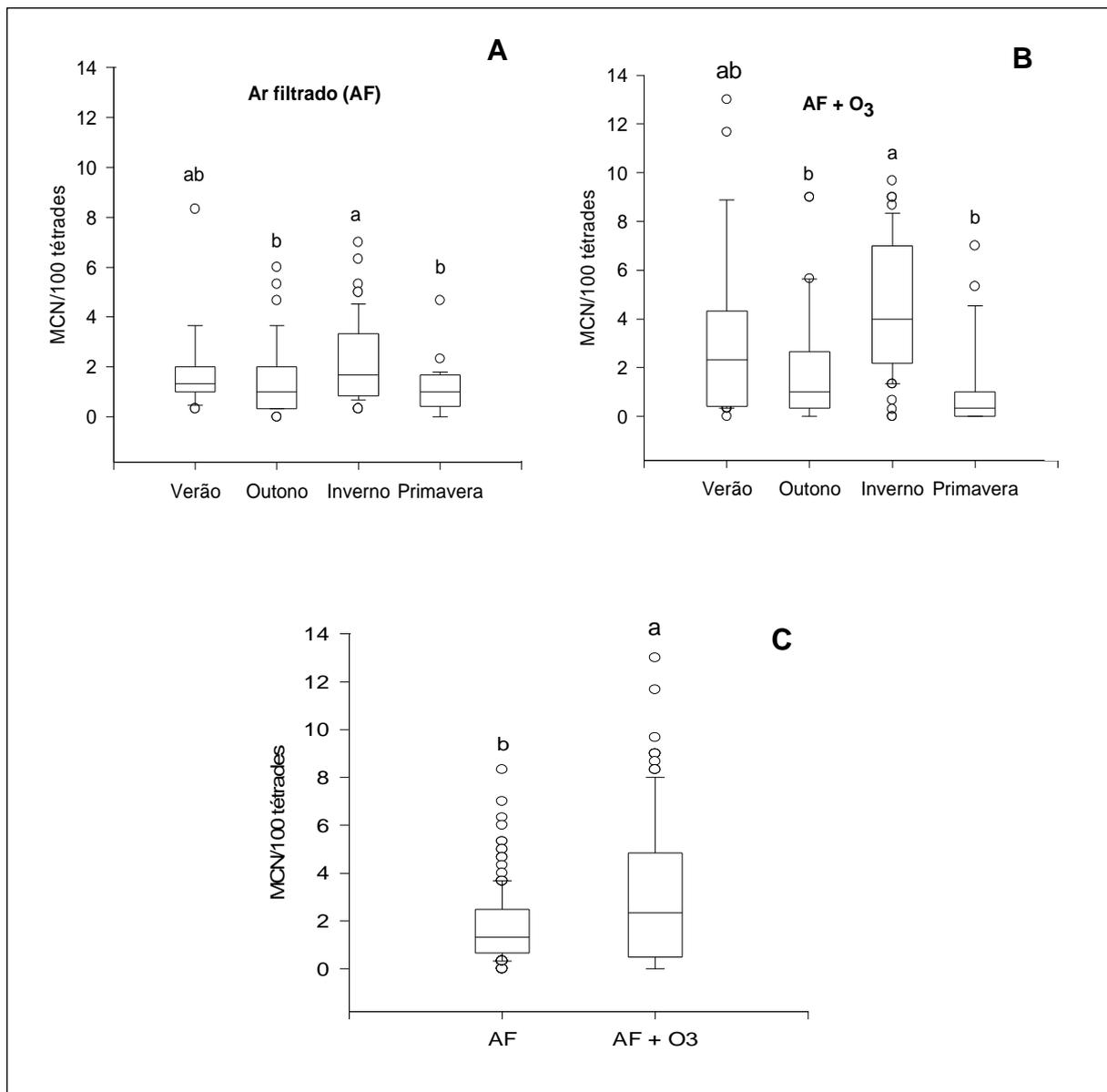


Figura 3.6: Comparações entre as campanhas de um mesmo tratamento de fumigação (AF ou AF + O₃) e entre os tratamentos de fumigação. **A:** Comparação entre as campanhas de ar filtrado; **B:** Comparação entre as campanhas de ar filtrado com 60 ppb de ozônio. **C:** Comparação entre os dois tratamentos de fumigação.

Em cada gráfico, freqüências médias indicadas com letras distintas diferem entre si significativamente.

A figura 3.7 mostra a concentração de ácido ascórbico em brácteas de ramos florais de *T. pallida* 'Purpurea' expostas à fumigação com AF e AF + O₃ (60 ppb), em campanhas realizadas em diferentes estações climáticas, mas nenhuma tendência clara a respeito da ocorrência de picos de concentração em determinados tempos de recuperação. Geralmente, as maiores concentrações foram observadas entre 24h e 72h de recuperação. Raramente o tratamento com 60 ppb de ozônio causou uma mudança significativa nos níveis de ácido ascórbico, em comparação com resultados obtidos no tratamento AF. Isto foi observado apenas 24h e 96h após a fumigação, respectivamente nas campanhas de verão e inverno.

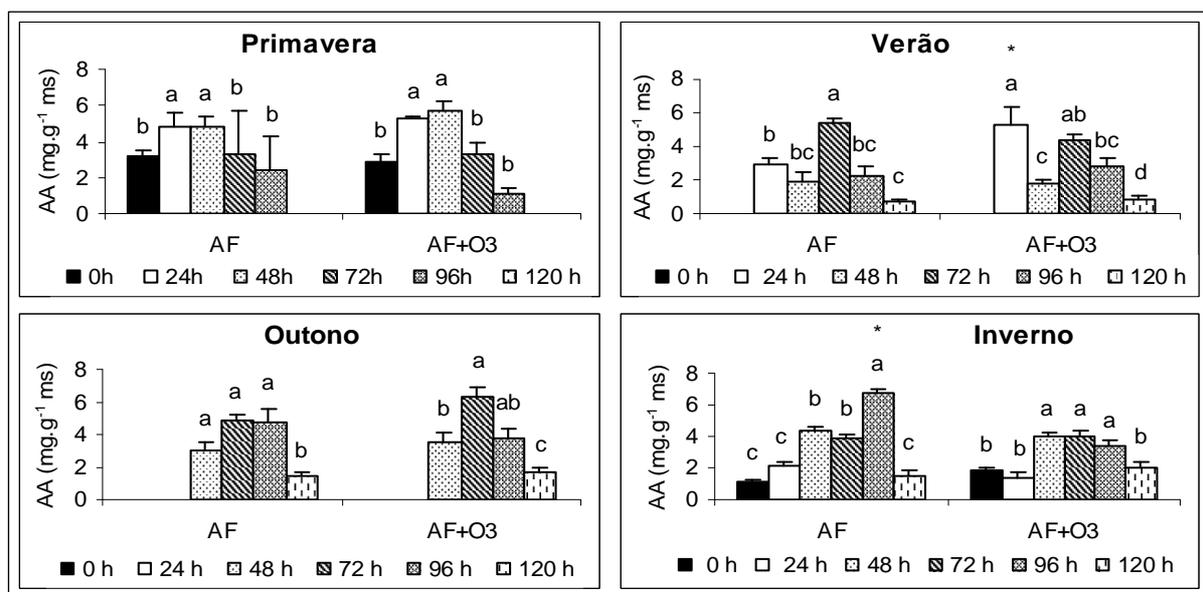


Figura 3.7: Concentrações médias de ácido ascórbico (AA) e respectivos erros-padrão (barras) determinadas em cada tempo de recuperação nos tratamentos de fumigação efetuados nas quatro estações climáticas.

AF: fumigação com ar filtrado; AF + O₃: fumigação com ar filtrado enriquecido com 60 ppb de ozônio. Em cada tratamento de fumigação, freqüências médias indicadas com letras distintas diferem entre si significativamente. Asteriscos indicam freqüências médias significativamente maiores do que as observadas no tempo de recuperação correspondente no tratamento contrastante.

Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre as campanhas, ilustradas na figura 3.8.A, para fumigação com ar filtrado e 3.8.B para ar filtrado com 60 ppb de ozônio, assim como entre os tratamentos de fumigação (figura 3.8C).

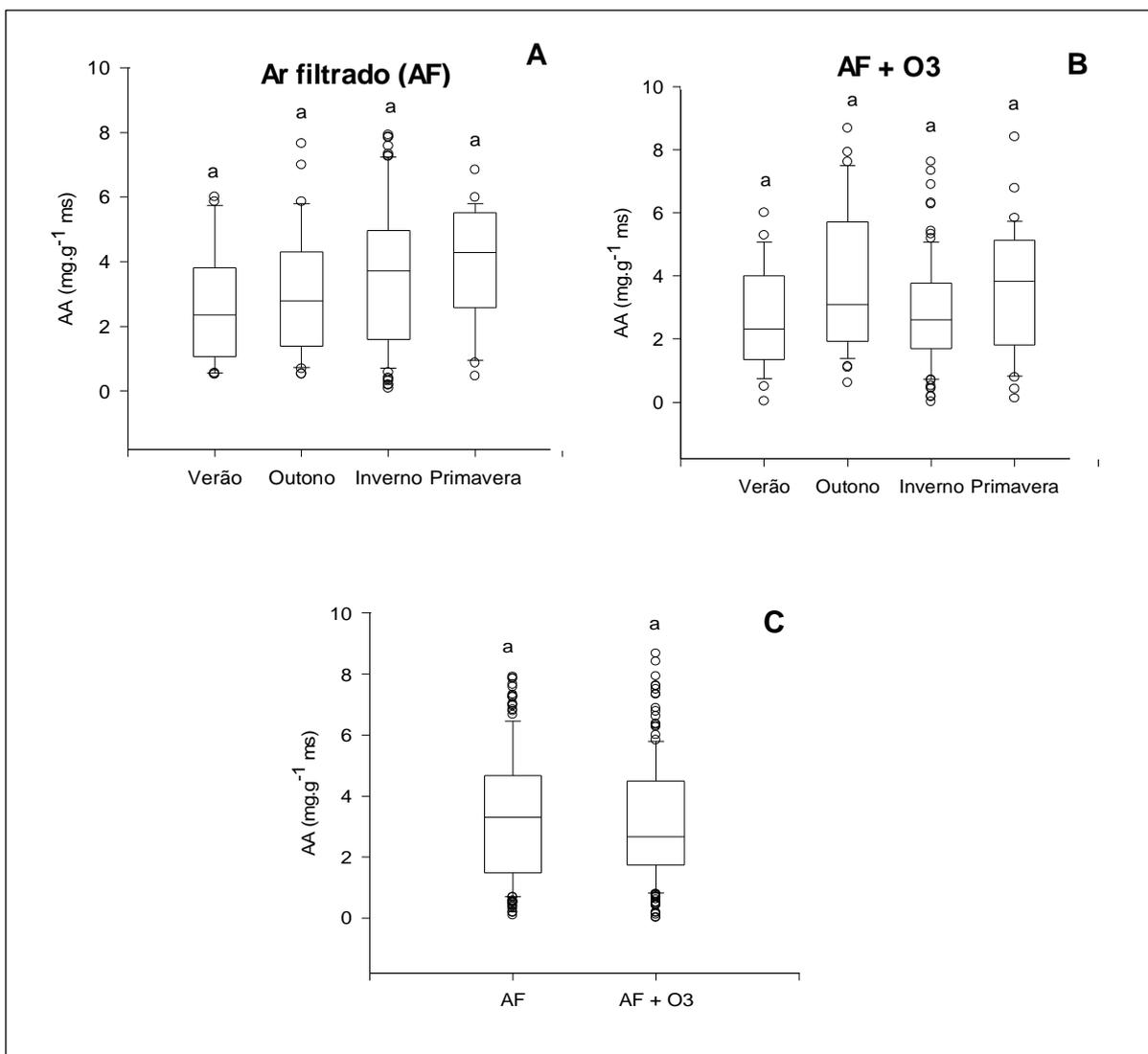


Figura 3.8: Comparações entre as campanhas de um mesmo tratamento de fumigação (AF ou AF + O3) e entre os tratamentos de fumigação. A: Comparação entre as campanhas de ar filtrado; B: Comparação entre as campanhas de ar filtrado com 60 ppb de ozônio. C: Comparação entre os dois tratamentos de fumigação.

Em cada gráfico, frequências médias indicadas com letras iguais não diferem entre si significativamente.

Contudo, análises de regressão linear demonstram que a concentração de AA é influenciada significativamente e positivamente pela amplitude térmica diária e máximas de temperatura registrada durante os períodos de recuperação (figura 3.9). Quanto menor amplitude térmica (figura 3.9A) ou as temperaturas máximas (figura 3.9B) menor será a concentração de ácido ascórbico.

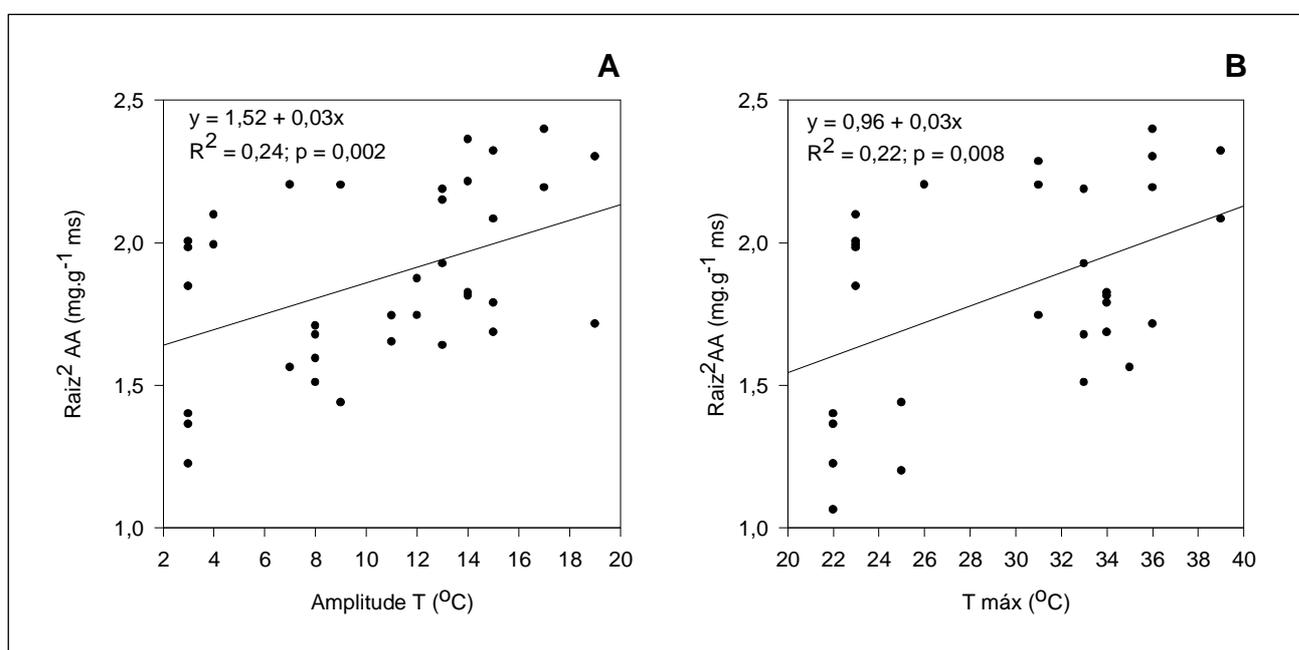


Figura 3.9: Relação entre ácido ascórbico e variáveis de temperatura registradas durante tempos de recuperação. **A:** ácido ascórbico e amplitude térmica; **B:** ácido ascórbico e máximas de temperatura.

Dados obtidos em todos os tempos de recuperação e em ambos os tratamentos de fumigação agrupados.

Análises de regressão linear também indicaram que a formação de micronúcleos é explicada significativamente pela concentração de ácido ascórbico (figura 3.10A), assim como pela amplitude de temperatura e temperaturas máximas durante os dias de recuperação. As menores concentrações de ácido ascórbico determinam maiores

freqüências de MCN 24 horas depois ($r^2 = 0,35$), como mostra a figura 3.10A. A freqüência de micronúcleos também foi inversamente proporcional à amplitude térmica ($r^2 = 0,29$), registrada durante os tempos de recuperação (figura 3.10B) e às máximas de temperatura ($r^2 = 0,19$) (figura 3.10C).

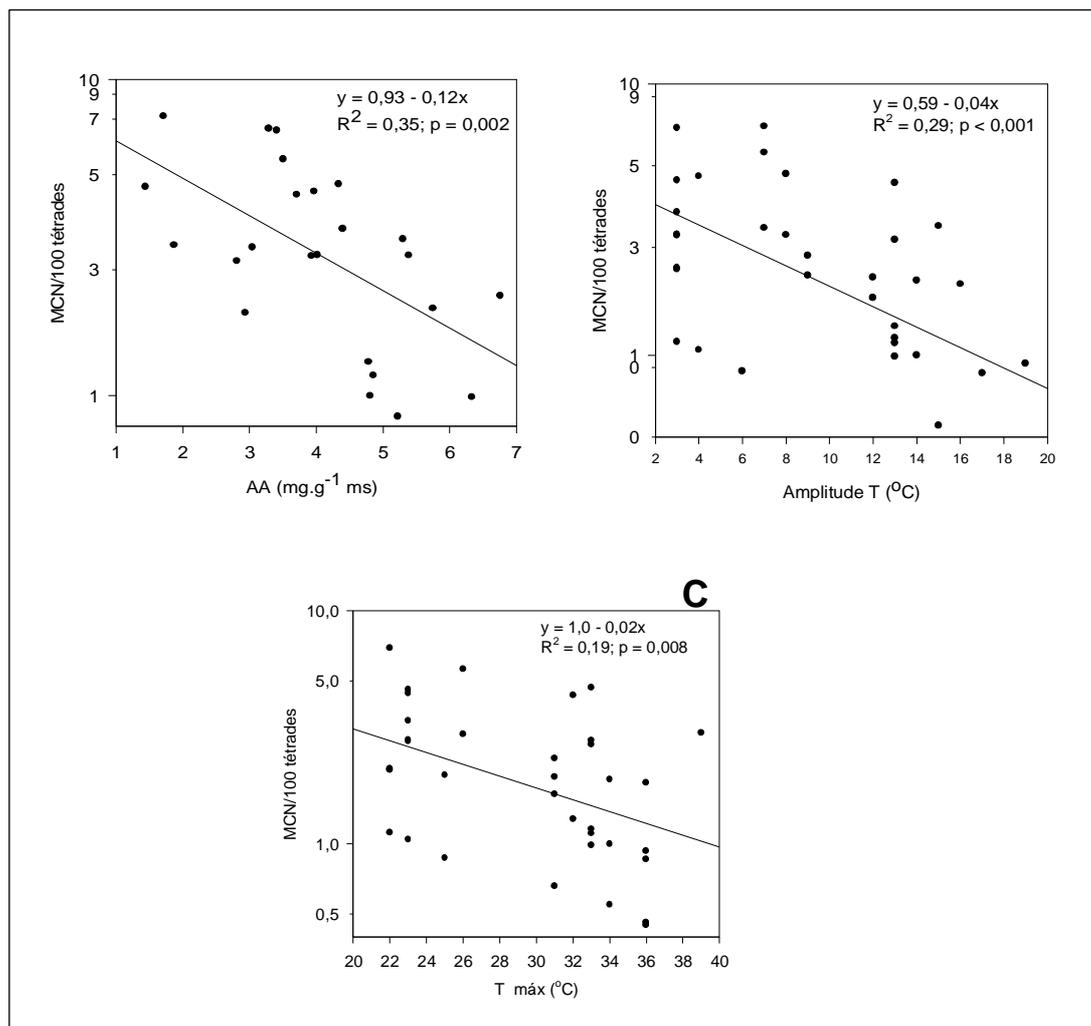


Figura 3.10: Relação entre freqüência de micronúcleos (MCN) e concentração de ácido ascórbico (AA) 24 horas antes e variáveis temperatura durante os tempos de recuperação. **A:** MCN *versus* concentração de AA 24 horas antes; **B:** MCN *versus* amplitude térmica; **C:** MCN *versus* máximas de temperatura.

Dados obtidos em todos os tempos de recuperação e em ambos os tratamentos de fumigação agrupados.

3.4.3) Freqüência de micronúcleos após fumigação com 80 ppb de ozônio

A figura 3.11 ilustra as freqüências de MCN nos dois experimentos, realizados na primavera, com fumigação de 80 ppb de ozônio. No experimento 1, a freqüência de MCN variou significativamente, nos diferentes tempos de recuperação nos dois tratamentos de fumigação, sendo observados valores máximos após 72 horas. Porém, o tratamento com ozônio não promoveu aumento significativo em qualquer um dos tempos de recuperação.

Entretanto, no experimento 2, nota-se que, apesar de não ter havido variação entre os tempos de recuperação, nos dois tratamentos de fumigação, a freqüência de MCN observada no tratamento de fumigação com ozônio foi significativamente maior do que a observada no tratamento com ar filtrado, a partir de 48 horas de recuperação

Não houve diferença significativa na freqüência de micronúcleos observada entre os dois experimentos, dentro de cada tratamento de fumigação. Além disso, fumigação com 80 ppb de ozônio causou um aumento no número de micronúcleos/100 tétrades, em comparação com o observado nas inflorescências mantidas sob ar filtrado, apenas no experimento 2 (figura 3.12).

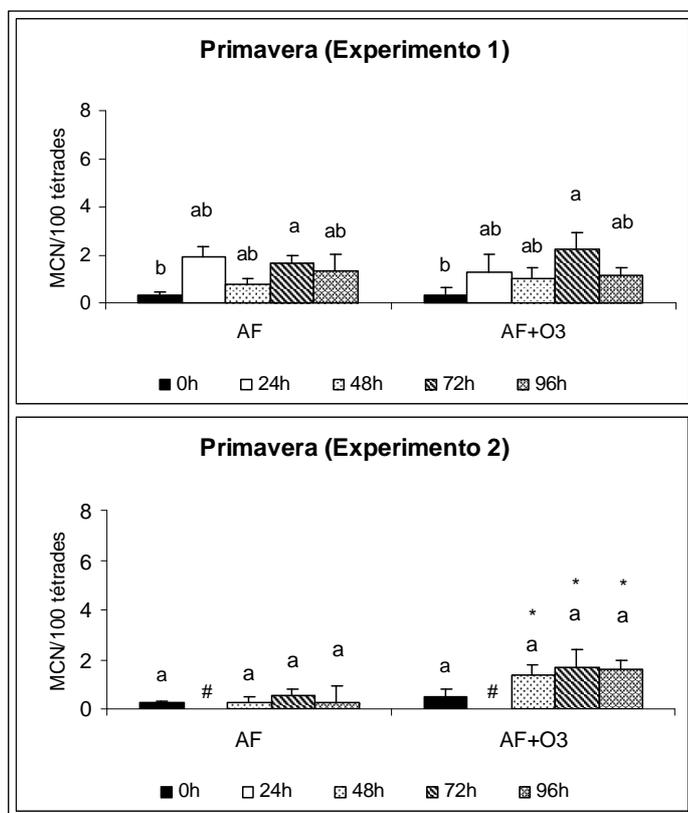


Figura 3.11. Frequência de micronúcleos e concentração de ácido ascórbico em diferentes tempos de recuperação observados nos dois experimentos de primavera, com fumigação de 80 ppb.

MCN: micronúcleos; AF: ar filtrado; AF + O3: ar filtrado enriquecido com 80 ppb de ozônio.

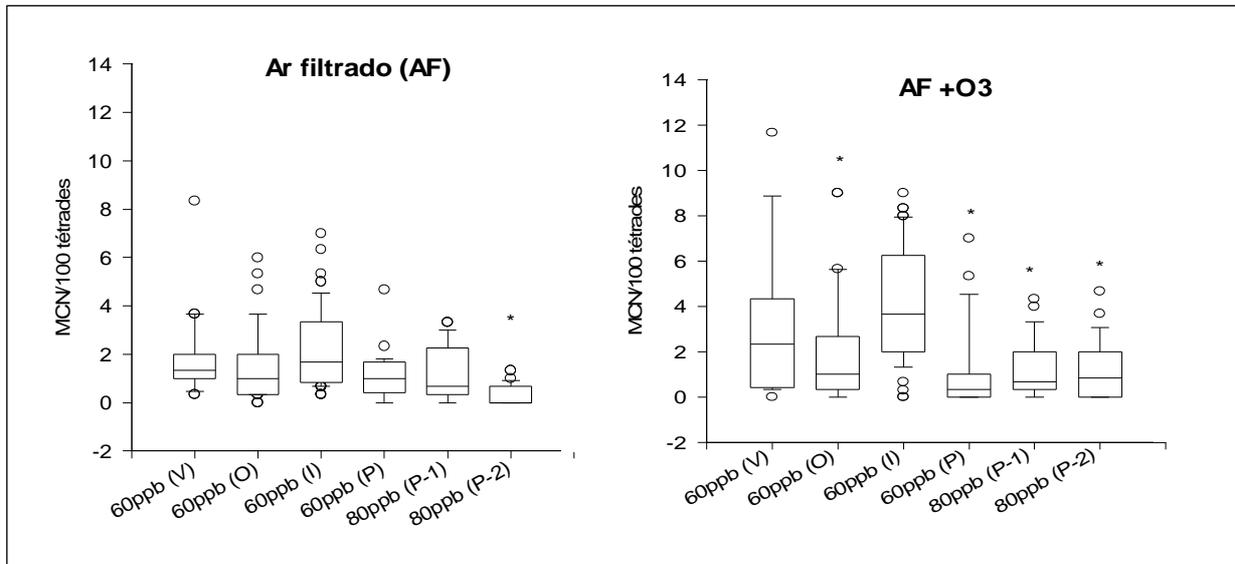


Figura 3.12. Comparações entre as frequências de MCN, dentro de um mesmo tratamento de fumigação (AF ou AF + O3), considerando todos os experimentos realizados.

MCN: micronúcleos; AF: ar filtrado; AF + O3: ar filtrado enriquecido com 60 ppb ou 80 ppb de ozônio. V: verão; O: outono; I: inverno; P: primavera. (1) primeiro experimento realizado na primavera – 80 ppb; (2) segundo experimento realizado na primavera – 80 ppb. * Significativamente menor do que nos experimentos não marcados, em cada tratamento de fumigação.

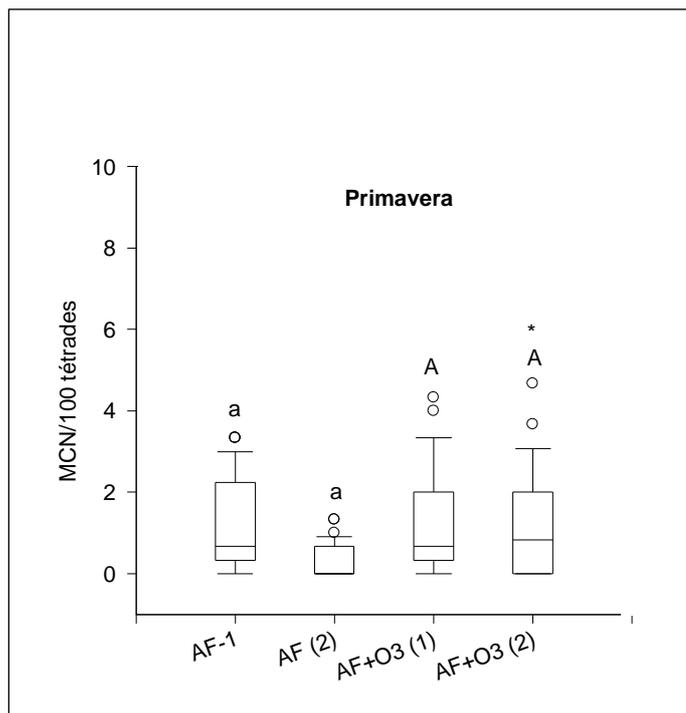


Figura 3.13. Comparações entre as campanhas de um mesmo tratamento de fumigação (AF ou AF + O₃) e entre os tratamentos de fumigação (80 ppb).

MCN: micronúcleos; AF: ar filtrado; AF + O₃: ar filtrado enriquecido com 80 ppb de ozônio. (1) primeiro experimento; (2) segundo experimento. Letras minúsculas e maiúsculas comparam respectivamente as freqüências de micronúcleos nos tratamentos AF e AF+O₃. * Freqüência significativamente maior no tratamento AF+O₃ do que no AF (no experimento 2).

Finalmente, verificou-se que a freqüência de micronúcleos nas inflorescências submetidas ao ar filtrado, em todos os experimentos foi semelhante (figura 3.13). A única exceção ocorreu no tratamento controle do segundo experimento de fumigação (80 ppb), realizado na primavera, quando se estimou freqüência significativamente menor de MCN no tratamento controle de qualquer outro experimento. Sob fumigação com ozônio, a formação de micronúcleos nos experimentos realizados na primavera, quer sob 60 ppb ou sob 80 ppb, e

no experimento do outono (sob 60 ppb) foi significativamente menor do que nos realizados no verão e primavera (sob 60 ppb).

3.5. Discussão

Nas condições experimentais deste estudo, ozônio demonstrou ser genotóxico para *T. pallida* 'Purpurea' nas fumigações com 60 ppb ou 80 ppb, mesmo sendo a planta exposta em um único dia, por três horas, a concentrações frequentemente observadas no ambiente urbano da cidade de São Paulo (CETESB 2007). Tal constatação corrobora estudos anteriores, que apontam injúrias citogenéticas em diferentes organismos, mesmo após exposições agudas. O potencial genotóxico do ozônio, aliás, está bem documentado na literatura científica. Fetner (1962) expôs culturas de linfócitos humanos a 0,8 ppm (80 ppb) de ozônio e, em curtas exposições de cinco a dez minutos, verificou clastogênese. Merz *et al.* (1975) também atestaram aumento da frequência de MCN em linfócitos de voluntários expostos a 0,5 ppm (50 ppb) por seis e dez horas.

Ressalta-se a alta sensibilidade de *T. pallida* 'Purpurea' a ozônio, quando se comparam os resultados obtidos no presente estudo com os poucos estudos realizados com plantas. Fetner (1958) submeteu plântulas de *Vicia faba* à fumigação com ozônio em aparato de fumigação fechada e observou até 42% de “anáfases anormais” em células meristemáticas de ápice radicular expostas durante 60 minutos a um fluxo de 2 litros/min de ozônio. Girchner *et al.* (1992) não encontraram aumento na frequência de mutações somáticas em células de pêlos estaminais (bioensio TRAD-STH) em clones BNL 4430 submetidos a ozônio. Ma *et al.*

(1982) também não encontraram aumento significativo de MCN em tétrades de inflorescências do mesmo clone submetidas a 5000 ppb (Ma *et al.* 1982 *apud* Rodrigues *et al.* 1996).

Em valores mais realistas, Rodrigues *et al.* (1996) expuseram inflorescências do clone 4430 a 50 e 100 ppb por seis horas diárias por um período de um a três dias. Esse estudo mostrou que apenas amostras expostas durante três dias consecutivos a 100 ppb mostraram um aumento significativo de MCN, indicando uma relação temporal com a detecção de genotoxicidade. Essa relação temporal foi verificada no presente estudo, já que um aumento significativo de micronúcleos foi verificado a partir de um período de recuperação de 48 e, principalmente, 72 horas após fumigação. Ressalta-se que esse acréscimo de genotoxicidade foi verificado, também, em fumigação com ar filtrado no presente estudo, indicando que o microclima da câmara de ar filtrado, considerada como sítio-controle, também impôs estresse às amostras vegetais, embora em menor escala, se comparado à fumigação com ozônio. Com isso, pode-se considerar que a clastogênese verificada em células-mães de grão de pólen nas inflorescências tratadas com o poluente parte de uma frequência basal de MCN mais alta que a verificada em inflorescências não manipuladas (ver capítulo 2).

A despeito da massificação do uso de clones de *Tradescantia* para biomonitoramento, há poucos estudos que investigam a relação entre tempos de recuperação e detecção de clastogenicidade, o que é crucial para a eficiência do bioensaio TRAD-MCN. Steinitz (1944) observou que inflorescências de *T. paludosa* submetidas a um meio anóxico por até 24 horas, apresentaram um maior aumento de MCN, de 8%, a 72 horas após tratamento. O autor relacionou esse fato a maior sensibilidade ao tratamento em células em prófase I da meiose. Falistocco *et al.* (2000) investigaram a duração do ciclo meiótico em

clones BNL 4430 e determinaram que a duração completa desse ciclo está em torno de 80 horas. Os autores afirmam que a duração da profase I naqueles clones chega a 60 horas, e, então, mais 20 horas para a formação de tétrades, e, enfim, a visualização de micronúcleos. Expondo inflorescências do clone a conhecidos agentes de genotoxicidade durante seis horas, os autores investigaram períodos de recuperação de 24 a 72 horas e constataram aumento significativo de MCN a 72 horas, enquanto que, em 24 horas, clastogenicidade não foi detectada. Assim sendo, segundo Falistocco *et al.* (2000), o tempo de recuperação de 24 horas, há bastante tempo estabelecido (Ma 1982), é insuficiente para detectar clastogenicidade devido à duração da profase I, até para o clone BNL 4430 de *Tradescantia*. Por fim, os autores recomendam um período de recuperação de 72 horas, como mais eficiente para diagnosticar a genotoxicidade de um agente utilizando o bioensaio TRAD-MCN. No presente estudo, a frequência de MCN observada nos tempos de recuperação investigados vai de encontro às constatações de Falistocco *et al.* (2000) e permite inferir que 72 horas após exposição foi o período mais indicado para atestar a genotoxicidade de ozônio para *T. pallida* 'Purpurea'.

A resposta de *T. pallida* 'Purpurea' em função do tempo de recuperação e do tratamento com ozônio, observada claramente em termos de frequência de MCN, não foi verificada para os valores de concentração de ácido ascórbico (AA) obtidos. Não foram apontadas relações significativas entre o antioxidante e o poluente em nenhuma das campanhas realizadas e nem foi identificado um período de recuperação em que uma mudança no perfil deste antioxidante fosse evidente. Entretanto, análises de regressão propuseram modelo em que a frequência de MCN está relacionada com a variação da concentração de ácido ascórbico verificada 24 horas antes. Assim, concentrações mais altas do antioxidante resultaram, depois de um período de 24 horas, em menos MCN. O inverso foi

verificado quando a concentração de ácido ascórbico diminuiu nesse intervalo.

Esses dados são consistentes com vários estudos que atestam o potencial de AA para diminuição do estresse oxidativo e, conseqüentemente, para atenuar ou impedir a formação de injúrias. Turcsányi *et al.* (2000), por exemplo, expuseram plântulas de *Vicia faba* a 75 nmol mol⁻¹ por até 28 dias a sete horas por dia, não encontrando injúrias foliares após esse período, mesmo atestando o decréscimo da concentração de AA em folhas das amostras tratadas com o poluente. Os autores sugerem que outros mecanismos de defesa devem agir sinergisticamente com AA para detoxificar o ozônio e impedir a formação de injúrias. Menser (1964) também creditou o decréscimo de injúrias foliares em *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' ao aumento da concentração de AA em suas folhas.

A capacidade preventiva de AA contra injúrias citogenéticas está estabelecida através de vários estudos envolvendo, principalmente, culturas de células humanas e experimentos *in vivo* com cobaias. Giri *et al.* (1998), por exemplo, investigaram micronúcleos em células da medula óssea e em espermatozóides de cobaias tratadas com cisplatina, um reconhecido agente genotóxico. Os autores verificaram que cobaias que receberam doses de ácido ascórbico junto com o agente genotóxico apresentaram menos clastogênese do que aquelas que não receberam doses do antioxidante. Estudos da mesma natureza com plantas são pouco conhecidos. Entretanto, pode-se inferir que, assim como injúrias foliares, micronúcleos só serão formados quando exaurida a capacidade de detoxificação do ozônio por AA, entre outros antioxidantes, o que deve ocorrer após um dado período de tempo. O intervalo de tempo requerido para a ocorrência de clastogênese, no caso de ramos florais de *Tradescantia pallida* 'Purpurea' analisados no presente estudo, foi de 24 horas, conforme modelo proposto por análises estatísticas.

Há que se considerar que a variação observada na concentração de AA em

inflorescências de *T. pallida* 'Purpurea' foi relacionada às máximas de temperatura e à maior oscilação térmica diária (amplitude), independente do tratamento de fumigação a que foram submetidas. Assim, concentrações mais altas do antioxidante foram encontradas em temperaturas mais altas e sob maior variação térmica (amplitude) registradas durante o experimento, o que se refletiu sobre a intensidade de respostas clastogênicas das inflorescências.

Tais relações entre a dinâmica do sistema antioxidativo ao longo das estações climáticas do ano são freqüentemente apontadas na literatura para outras plantas. Bulbovas (2005) expuseram indivíduos de *Caesalpinia echinata* a vários pontos com diferentes perfis de poluição do ar da cidade de São Paulo. Os autores observaram que as variações nos antioxidantes não pareceram estar relacionadas ao crescente tempo de exposição a poluentes, mas a mudanças sazonais de fatores do ambiente. Burkey *et al.* (2006), ao estudarem a concentração de AA em espécies herbáceas nativas de um parque florestal dos EUA, encontraram variações de acordo com as estações climáticas e concluíram que essas variações influenciaram a capacidade de defesa daquelas espécies contra a ação oxidativa do ozônio, presente em concentrações moderadas na região. Turcsányi *et al.* (2000) constataram que plântulas de *Vicia faba* submetidas à fumigação de 75 nmol mol⁻¹ de ozônio durante 28 dias não apresentaram injúrias foliares, embora os níveis de ácido ascórbico tenham diminuído ao longo do experimento. Os autores argumentam que outros antioxidantes podem ter atuado de maneira sinérgica para atenuar os efeitos deletérios do poluente. Ainda, Yamaguchi *et al.* (2005) afirmaram que biflavonóides, uma outra categoria de antioxidantes vegetais, extraídos de acículas de *Araucaria angustifolia* protegem um plasmídeo contra clivagem do DNA, imposta por EAO. Tais autores sugerem que os biflavonóides também são importantes antioxidantes contra os efeitos das EAO sobre biomoléculas, notadamente ácidos nucleicos.

Assim, pode-se supor que outros antioxidantes, além de AA, presentes em *T. pallida* 'Purpurea', podem variar ao longo das estações climáticas e promover proteção contra EAO juntamente com ácido ascórbico. Se confirmada, tal variação pode comprometer a análise de dados sobre genotoxicidade de um poluente em uma determinada estação climática. Entretanto, é preciso, a princípio, investigar mais amplamente os antioxidantes presentes nas células de *T. pallida* 'Purpurea' e a influência da sazonalidade sobre essa espécie.

Além da influência do sistema antioxidativo na intensidade de respostas clastogênicas de *T. pallida* 'Purpurea', a sazonalidade climática ao longo das estações do ano, notadamente na temperatura do ar durante os experimentos, pareceu ser outro fator importante para as diferenças observadas na intensidade de formação de MCN após fumigação com ozônio. Nas campanhas experimentais realizadas na primavera, tanto na campanha de 60 ppb, quanto nas duas campanhas de 80 ppb realizadas na primavera, frequências foram as mais baixas entre todas as campanhas realizadas. Surpreendentemente, fumigações com 80 ppb, que, teoricamente, deveriam resultar em maior clastogênese do que a fumigação com 60 ppb, apresentaram valores pouco acima do basal verificado em inflorescências não submetidas a qualquer tratamento (ver capítulo 2). Ainda que a campanha 2 de 80 ppb tenha mostrado diferenças entre fumigação com ar filtrado e ar filtrado com ozônio, a frequência de MCN ficou aquém das observadas em fumigação com 60 ppb do poluente nas campanhas de verão e, principalmente, inverno. Esses dados convergem para os observados por Alves *et al.* (2003), que utilizaram inflorescências de *T. pallida* 'Purpurea' para monitorar o potencial clastogênico do ar em laboratórios do Instituto de Botânica de São Paulo. As autoras afirmam que houve variação de 1,9 a 5,3% no controle negativo ao longo de nove meses de experimento e que tal variação pode ser atribuída a fatores climáticos ao longo do período. Isidori *et al.* (2003) e Ichikawa *et al.* (1996) também observam aumento da frequência de

mutações em estações de temperatura mais amena. No estudo desenvolvido por Isidori *et al.* (2003), exposições de inflorescências do clone BNL 4430 no inverno mostraram maior frequência de MCN do controle negativo nessa estação. Ichikawa e colaboradores verificaram aumento de mutações em células somáticas do mesmo clone nos dias em que a temperatura registrada foi mais baixa. Klumpp *et al.* (2004) creditaram o aumento de MCN à ocorrência de temperaturas mais baixas ($> 16^{\circ}\text{C}$) durante o tempo de recuperação no bioensaio TRAD-MCN.

Nas condições de realização do presente estudo, a fim de obter respostas clatogênicas mais evidentes, pode-se recomendar que os bioensaios, da exposição ao ozônio ao período de recuperação, sejam realizados sob a menor amplitude diária possível entre temperaturas máxima e mínima ($< 8^{\circ}\text{C}$) e sob temperaturas máximas entre 20 e 26°C . Nessas condições, as concentrações de ácido ascórbico tenderão a ser menores, assim como os danos clastogênicos tenderão a ser maiores. Atenção deve ser dada, para as condições climáticas durante o cultivo das plantas, conforme discutido no capítulo anterior.

Portanto, o presente estudo demonstrou a alta sensibilidade de *T. pallida* 'Purpurea' ao ozônio, por meio de respostas clastogênicas. Tais respostas foram predominantemente mais evidentes após 72 horas de exposição ao poluente. Contudo, a intensidade de formação de micronúcleos nas inflorescências foi condicionada pelos níveis de ácido ascórbico nas brácteas dos ramos florais, determinados principalmente por sazonalidade em fatores climáticos como a temperatura do ar, e por variações nas próprias condições ambientais, especialmente na temperatura, no local de realização dos bioensaios.

Finalmente, com base nos resultados apresentados, ainda não é possível determinar a eficiência de *T. pallida* 'Purpurea' para indicar riscos clastogênicos impostos por ozônio, sob condições naturais, uma vez que não foi possível estabelecer modelo de curva

dose x resposta entre concentrações de ozônio e frequência de micronúcleos.

3.6. Literatura citada

Alves, E. S. 1995. The effects of the pollution on wood of *Cecropia glazioui* (Cecropiaceae).
IAWA Journal 16: 69-80

Alves, E. S., Pedroso, A. N. V., Domingos, M., Guimarães, E. T. & Saldiva, P. H. N.
2003. Biomonitoramento *indoor* do potencial mutagênico do ar em laboratórios e
herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. Hoehnea 30(2):
89-94

**Batalha, J. R. F., Guimarães, E.T., Lobo, D. J. A., Lichtenfels, A. J. F. C., Deur, T.,
Carvalho, H. A., Alves, E. S., Domingos, M., Rodrigues, G. S., Saldiva, P. H. N. .**
1999. Exploring the clastogenicity effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using
Tradescantia micronuclei assay. Mutation Research 426: 229-232

Baier, M., Kandlbider, A., Gollack, D. & Josef-Dietz, K. 2005. Oxidative stress and
ozone: perception, signaling and response. Plant, Cell and Environment 28: 1012-1020

Bray. E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In:
Buchanan, B. B., Gruissen, W., Jones, R. L. (Eds) Biochemistry & Molecular Biology

of Plants. American Society of Plant Physiologists (USA), New York. 1158-1203 pp

Bulbovas, P. 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras de resistência da espécie à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 108 p.

Burkey, K.O., Eason, G., 2002. Ozone tolerance in snap bean is associated with elevated ascorbic acid in the leaf apoplast. *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 on ozone-sensitive wildflowers. *Environmental Pollution* 143: 427-434

Carvalho-Oliveira, R., Pozo, R.M.K., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Martins-Junior, H.A., Bustilho, J.O.W.V., Saiki, M., Sato, I.M., Saldiva P.H.N. 2005. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. *Environmental Research* 98: 1-7.

Calatayud, A., Barreno, E., 2001. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. *Environmental Pollution* 115: 283-289.

Castillo, F. J., Greppin, H. 1988. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to

ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. Leaves after ozone exposure. Environmental and Experimental Botany 28(3): 231-238

CETESB.- Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

2007. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo – 2006. Série *Relatórios/* Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

Chen, Z. & Gallie, D. R. 2005. Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. Plant Physiology 138: 1673-1689

Conklin, P.L. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. Plant, Cell and Environment 24: 383-394.

Evans, L. S., Albury, K. & Jennings, N. 1996. Relationships between anatomical characteristics and ozone sensitivity of leaves of several herbaceous dicotyledonous plant species at Great Smoky Mountains National Park. Environmental and Experimental Botany 36(4): 413-420

Falisticco, E., Torricelli, R., Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C. & Monarca, S. 2000. Enhancement of micronuclei frequency in the *Tradescantia*/ micronuclei test using a long recovery time. Hereditas 133: 171-174

Ferdinand, J. A., Fredericksen, T. S., Kouterick, K. B. & Skelly, J. M. 2000. Leaf

morphology and ozone sensitivity of two open pollinated genotypes of black cherry (*Prunus serotina*) seedlings. *Environmental Pollution* 108: 297-302

Ferreira, M. I. 2004. Avaliação do potencial genotóxico da poluição atmosférica no Parque do Ibirapuera, São Paulo, com o bioensaio TRAD-STH de clones da *Tradescantia*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. 96 p.

Fetner, R. H. 1958. Chromosome breakage in *Vicia faba* by ozone. *Nature* 181: 504-505

Fetner, R. H. 1962. Ozone-induced chromosome breakage in human cell cultures. *Nature* 194: 793-794

Foyer, C.H., Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28: 1056-1071.

Gichner, T., Langebartels, C., Sandermann Jr., H. 1992. Ozone is not mutagenic in the *Tradescantia* and tobacco mutagenicity assays. *Mutation Research* 2819: 203-206.

Giri, A., Khyriam, D. & Prasad, S. B. 1998. Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. *Mutation Research* 421: 139-148.

Grant, W.F., 1998. Higher plant assays for the detection of genotoxicity in air polluted

environments. *Ecosystem Health* 4: 210-229.

Guimarães, E.T., Domingos, M., Alves, E.S., Caldini Jr, N., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Saldiva, P.H.N. 2000. Detection of the genotoxic potential of air pollution in the city of São Paulo (Brazil) with *Tradescantia pallida* using *Tradescantia* micronucleus assay (Trad-MCN). *Environmental and Experimental Botany* 44: 1-8.

Heath, R. L. 1975. Ozone. In: Mudd, J. B. & Kozlowski, T. T. (eds). 1975. Responses of plants to air pollution. Academic Press, Inc., USA. 23-55 pp

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.

Horemans, N., Foyer, C. H., Potters, G. & Asard, H. 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 531-540

Ichikawa, S., Nakano, A., Kenmochi, M., Yamamoto, I., Murai, M., Takahashi, E., Yamaguchi, A., Watanabe, K., Tomiyama, M., Sugiyama, K., Yogo, A., Yazaki, T., Okumura, M., Shima, N., Satoh, M., Yoshimoto, M., Xiao, L. Z. 1996. Yearly variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of *Tradescantia* clone KU 9 grown outdoors, which showed a significant increase after the Chernobyl accident. *Mutation Research* 349: 249-259

Isidori, M., Ferrara, M., Lavorgna, M., Nardelli, AA. & Parrella, AA. 2003. In situ

monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere* 52: 121-126

Kangasjarvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. & Karjalainen, R. 1994. Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* 17: 783-794

Keller, T., Schwager, H. 1977. Air pollution and ascorbate. *European Journal of Forest Pathology* 7: 338-350.

Klumpp, A., Ansel, E., Fomin, A., Schnirring, S., Pickl, C., 2004. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. *Hereditas* 141: 142-148.

Krupa, S.V., Manning, W.J., Nosal, M. 1993. Use of tobacco cultivars as biological indicators of ambient ozone pollution: an analysis of exposure-response relationships. *Environmental Pollution* 81: 137-148.

Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grun, S. & Sanderman, H. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 567-575

Long S.P., Naidu S.L. 2003. Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone. In: Bell, J.N.B, Treshow, M. (Eds.), *Air Pollution and Plant Life*. John Wiley & Sons Ltd., London, 69-88 pp

- Luwe, M. & Heber, U.** 1995. Ozone detoxification in the apoplast and symplast of spinach, broad bean and beech leaves at ambient and elevated concentrations of ozone in air. *Planta* 197: 448-455
- Lyons, T., Ollerenshaw, J. H. & Barnes, J. D.** 1999. Impacts of ozone on *Plantago major*: apoplastic and symplastic antioxidant status. *New Phytologist* 141: 253-263
- Ma, T. H.** 1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. *Environmental Health Perspective* 37: 85-90
- Ma, T. H., Anderson, V. A. & Ahmed, I.** 1982. Environmental clastogens detected by meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. Pages 141-157 *In* R. R. Tice, D. L. Costa & K. M. Schaich (eds). *Genotoxic effects of airborne agents*. Plenum Press, New York
- Ma, T.H.(a)** 1982. *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiose). A report of the U.S. Environmental Protection Agency. *Mutation Research* 99: 293-302.
- Mansfield, T. .A. & Pearson, M.** 1993. Physiological basis of stress imposed by ozone pollution. *In*: Fowden, L., Mansfield, T. & Stoddart, J. (eds) 1993. *Plant Adaptation to Environmental Stress*. Chapman & Hall, UK. 155-170 pp

- Menser, H. A.** 1964. Responses of plants to air pollutants III – a relation between ascorbic acid levels and ozone susceptibility of light – preconditioned plants. *Plant Physiology* 39: 564-567
- Merz, T., Bender, M. A., Kerr, H. D. & Kulle, T. J.** 1975. Observations of aberrations in chromossomes of lymphocytes from human subjects exposed to ozone at a concentration of 0,5 ppm for 6 and 10 hours. *Mutation Research* 31: 299-302
- Moraes, R. M., Bulbovas, P., Furlan, C. M., Domingos, M., Meirelles, S. T., Delitti, W. B. C., Sanz, M. J.** 2006. Physiological responses of saplings of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, under ozone fumigation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 306-312
- Orendovici, T., Skelly, J.M., Ferdinand, J.A., Savage J.E., Sanz M.J, Smith, G.C.** 2003. Response of native plants of northeastern United States and southern Spain to ozone exposures; determining exposure/response relationships. *Environmental Pollution* 125: 31-40.
- Pedroso, A. N. V.** 2006. Avaliação estrutural de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' sob diferentes níveis de contaminação atmosférica. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo – Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 68 p.
- Perchorowicz, J. T. & Ting, I. P.** 1974. Ozone effects on plant cell permeability. *American Journal of Botany* 61(7): 787-793

- Rajeshwari, J. & Harney, P. M.** 1976. Effects of ozone on meiotic chromosomes of *Vicia faba*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 18: 727-730
- Rodrigues, G.S., Madkour, S.A., Weinstein, L.H.**, 1996. Genotoxic activity of ozone in *Tradescantia*. Environmental and Experimental Botany 36: 45-50.
- Rodrigues, G.S., Ma, T.H., Pimentel, D., Weinstein L.H.**, 1997. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: A review. Critical Reviews in Plant Sciences 16: 325-359.
- Sant'Anna, E. T. G.** 2003; Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação dos riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero *Tradescantia*. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo. 102 p
- Savóia, E. J. L.** 2007. Potencial de *Tradescantia pallida* cv 'Purpurea' para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André – São Paulo – por meio do bioensaio Trad – MCN e do acúmulo foliar de elementos tóxicos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo. 102 p.
- Silva, F. L. A.** 2007. Uso de bioindicadores vegetais para avaliação de poluentes atmosféricos em microescala vertical. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 127 p.

- Smirnoff, N.** 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff, N. (ed). 1995. Environmental and Plant Metabolism – flexibility and acclimation. BIOS Scientific Publisher Limited, UK. 217-243 pp.
- Song, X. S., Hu, W. H., Mao, W. H., Ogwen, J. O., Zhou, Y. H. & Yu, J. Q.** 2005. response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. Plant Physiology and Biochemistry 43: 1082-1088
- Steinitz, L. M.** 1944. The effect of lack of oxygen on meiosis in *Tradescantia*. American Journal of Botany 31: 428-443
- Suyama, F., Guimarães, E. T., Lobo, D. J. .A., Rodrigues, G. S., Domingos, M. Alves, E. S., Carvalho, H. A. & Saldiva, P. H. N.** 2002. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *Purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 35: 127-129
- Torsethaugen, G., Pitcher, L. H., Zilinskas, B. A., Pell, E. J.** 1997. Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. Plant Physiology 114: 529-537
- Treshow, M. & Anderson, F. K.** 1989. Plant stress from air pollution. John Wiley & Sons, UK. 283 p.

Turcsányi, E., Lyons, T., Plochl, M. & Barnes, J. 2000. Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone ? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Experimental Botany* 51: 901-910

Victorin, K. 1992. Review of the genotoxicity of ozone. *Mutation Research* 227: 221-238

Yamaguchi, L. F., Vassão, D. G., Kato, M. J. & Di Mascio, P. 2005. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucária angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry* 66: 2238-2247

Discussão geral

A frequência basal de micronúcleos (MCN) em indivíduos de *T. pallida* 'Purpurea', cultivados em ambiente sabidamente isento de poluentes clastogênicos, foi influenciada pela sazonalidade climática ao longo de 17 meses de monitoramento.

A não influência de umidade relativa do ar na formação de MCN, no presente estudo, está de acordo com Klumpp *et al.* (2004), que constatou tal fato analisando inflorescências do clone BNL 4430 expostas a diferentes faixas dessa variável climática.

Embora a radiação solar não tenha também promovido alterações na frequência de MCN neste estudo, Wang & Wang (1999) verificaram aumento de clastogênese em picos de irradiância artificialmente produzidos.

A temperatura do ar observada na casa de vegetação foi mensurada durante todo o monitoramento e, com base em análises estatísticas realizadas, foi o fator climático mais influente na formação de MCN. Modelos propostos estatisticamente mostram que o declínio ou grandes oscilações da temperatura levaram à formação de MCN 72 horas depois

desses eventos climáticos. Mesmo nos experimentos de fumigação, a temperatura do ar (valores máximos diários e de amplitude térmica) também foi um fator determinante da intensidade de respostas clastogênicas nas inflorescências expostas a 60 ppb de ozônio, por 3 horas. Esses resultados alinham-se aos obtidos por Klumpp *et al.* (2004), que expuseram inflorescências do clone BNL 4430 em diferentes gradientes de temperatura, e, aplicando o bioensaio TRAD-MCN, verificaram interferências nos níveis basais de MCN.

Estudos que relacionam a influência da temperatura à formação de grãos de pólen em *Tradescantia* e conseqüente influência sobre o bioensaio TRAD-MCN são escassos. Xiao & Mascarenhas (1985) analisaram a formação de *heat shock proteins* (hsp), sintetizadas em condições de estresse térmico para oferecer termoproteção a células e tecidos. Em experimentos conduzidos em tubos polínicos e grãos de pólen de *Tradescantia paludosa*, os autores verificaram que nos tubos polínicos submetidos a exposições agudas a 37 ou 41°C ou incremento gradual de 29 a 41°C, não foram sintetizadas as hsp. Grãos de pólen não germinados retirados de anteras submetidas ao mesmo tratamento térmico também não continham hsp, embora essas proteínas fossem encontradas em tecidos vegetativos em condições normais de temperatura do ar. Os autores concluem que o desenvolvimento de termotolerância em *T. paludosa* pode ocorrer sem a síntese de hsp.

No presente estudo, tanto nas condições experimentais do monitoramento quanto nas condições experimentais das exposições a ozônio, foi verificada maior clastogênese em *T. pallida* 'Purpurea', submetida à temperatura mais amena. Amostras submetidas a até, aproximadamente, 40°C, observada no monitoramento, não apresentaram clastogênese significativa. Embora Xiao e colaboradores não tenham analisado quebras cromossômicas em grãos de pólen, pode-se supor que, assim como em *T. paludosa*, *T. pallida* 'Purpurea' parece também desenvolver mecanismos que minimizam os efeitos de estresse

térmico por temperaturas elevadas oferecendo maior proteção aos seus tecidos reprodutivos e, conseqüentemente, ocorrendo menor clastogênese em temperaturas altas, mesmo após a fumigação com ozônio. Entretanto, faz-se necessário investigar a síntese de hsps sob condições de estresse térmico na cultivar *T. pallida* 'Purpurea' para corroborar tal hipótese.

Mecanismos fisiológicos que conferem termotolerância não são os únicos atributos do gênero *Tradescantia* para minimizar efeitos deletérios de estresse abiótico. Em um amplo estudo, Martínez & Martínez (1993) apontam a presença de diversos grupos de flavonóides em 42 espécies de *Tradescantia* distribuídas ao longo do continente americano. Essas substâncias, derivadas do metabolismo secundário de plantas, têm importantes atribuições como sinalização de hormônios, participação ativa na germinação do tubo polínico, proteção de tecidos contra radiação UV-B e também como compostos alelopáticos e fitoalexinas (Taylor & Grotewold 2005). Além disso, a capacidade de flavonóides de detoxificar EAO's também é amplamente reconhecida (Husain *et al.* 1987, Larson 1988).

Entre os flavonóides identificados em *Tradescantia*, destacam-se as antocianinas, pigmentos, cuja função mais destacada é promover coloração a tecidos vegetativos e reprodutivos, o que confere maior atração de polinizadores e dispersão de sementes (Kong *et al.* 2003). Chalker-Scott (1999) também afirma que alta irradiância e temperaturas extremas favorecem o incremento de antocianinas em tecidos vegetativos. Outros estudos apontam a importância de antocianinas, especialmente a cianidina, como antioxidante, reduzindo a formação de malondialdeído a partir de peroxidação lipídica e também prevenindo a oxidação do ácido ascórbico por EAO's. Ainda, cianidina forma com DNA um complexo que protege ambas as moléculas contra injúria oxidativa (Sharma & Sharma 1999, Kong *et al.* 2003).

A presença de antocianinas em *T. pallida* 'Purpurea' é atestada por estudos

desenvolvidos por Baublis & Berber-Jiménez (1995) e Paiva *et al.* (2003). Os primeiros conduziram estudos de aprimoramento de técnicas de extração desses pigmentos para uso comercial. Os autores afirmam que extratos de antocianinas extraídas da cultivar 'Purpurea' mostram excelente estabilidade química para usos industriais.

Paiva *et al.* submeteram indivíduos de *T. pallida* 'Purpurea' a diferentes gradientes de luminosidade artificialmente produzidos e constataram que a porcentagem de antocianina por massa seca diminui com a redução da luminosidade. Plantas cultivadas sob alta irradiância apresentaram até mesmo o dobro de porcentagem do pigmento se comparada àquelas cultivadas sob sombreamento. Com base na forte correlação linear positiva entre valores de intensidade luminosa e teores de antocianinas, os autores concluem que o incremento desses pigmentos deve proteger o aparato fotossintético contra fotoinibição em *T. pallida* 'Purpurea'.

Embora teores de antocianinas não tenham sido mensurados no presente estudo, as evidências da presença desses pigmentos na cultivar analisada, bem como a contribuição na detoxificação de EAO's permitem inferir que tais substâncias podem ter sido importantes para a baixa frequência de MCN ao longo do experimento de monitoramento e também em experimentos de exposição a ozônio em algumas estações climáticas. É possível, supor, assim, que as respostas clastogênicas menos intensas em inflorescências de *T. pallida* 'Purpurea' expostas em dias quentes ou com amplitudes térmicas maiores, podem estar associadas ao maior conteúdo desses pigmentos com função antioxidante e não somente com o conteúdo de ácido ascórbico, identificado no presente estudo no estudo de fumigação com ozônio. Contudo, estudos de quantificação da concentração de antocianinas e a sinergia entre esses e outros antioxidantes, especialmente, ácido ascórbico, devem ser conduzidos para delinear a ação do sistema antioxidativo de *T. pallida* 'Purpurea' e seu reflexo sobre a

aplicabilidade da cultivar em ensaios de toxicidade ambiental.

Por fim, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que, nas condições experimentais das exposições, o período requerido para diagnosticar a formação de MCN excedeu o intervalo recomendado em protocolo amplamente difundido (Ma 1983). Os resultados obtidos com *T. pallida* 'Purpurea' apontam o prazo de 72 horas após exposição preponderante para observação de clastogênese máxima, tanto em tratamento com ozônio quanto após picos de temperatura observados no monitoramento. O período de recuperação de 72 horas alinha-se aos resultados obtidos por Falistocco *et al.* (2000) que investigaram a duração do ciclo meótico em clones BNL 4430 para determinar a fase de maior sensibilidade para a aplicação do bioensaio. Os autores concluíram que o período necessário para a meiose em micrósporos do clone BNL 4430 foi de 80 horas e que períodos de recuperação superiores a 24 horas foram determinantes para o aumento da frequência de MCN. Sobretudo, em amostras vegetais tratadas com reconhecido agente clastogênico mostraram significativo aumento de MCN 72 horas após exposição, em comparação ao período de 24 horas, tal como observado no presente estudo.

Com base nas constatações desse estudo, propõe-se recomendar que:

- A temperatura máxima do ar ambiente e oscilações ao longo do dia nessa variável climática devem ser consideradas como fatores que potencializam ou não a formação de micronúcleos. Assim, recomenda-se que a temperatura do ambiente seja mantida entre 20 e 26°C e que a amplitude térmica diária não ultrapasse uma variação de 8°C.
- Deve ser considerada a possibilidade de um tempo de recuperação mais longo que

24 horas para diagnosticar clastogênese. Entretanto, estudos sobre o ciclo meiótico em *T. pallida* 'Purpurea' devem ser conduzidos para confirmar tal hipótese.

- Indivíduos de *T. pallida* 'Purpurea' selecionados para determinar a frequência basal (controle) em um experimento devem ser, sempre que possível, cultivados em um ambiente isento de fatores de confusão, como presença de poluentes gasosos e partículas, que ocorrem mesmo em sítios considerados livres de poluição. Nessas condições, conforme dados apresentados e, considerando as condições experimentais desse estudo, a frequência basal de clastogênese espontânea não chega a 2% por 100 tétrades analisadas.
- Mecanismos de reação a estresse imposto por ozônio parecem ser influenciados por sazonalidade de estações climáticas. Estudos similares conduzidos em diferentes estações climáticas devem ser conduzidos para corroborar essa constatação.

4.1. Literatura citada

Baublis, A. J. & Berber-Jiménez, M. D. 1995. Structural and conformational characterization of a stable anthocyanin from *Tradescantia pallida*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43: 640-646.

- Chalker-Scott, L.** 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Phytochemistry and Photobiology* 70 (1): 1-9.
- Falisto, E., Torricelli, R., Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C. & Monarca, S.** 2000. Enhancement of micronuclei frequency in the *Tradescantia*/ micronuclei test using a long recovery time. *Hereditas* 133: 171-174
- Husain, S. R., Cillard, J. & Cillard, P.** 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26 (9): 2489-2491.
- Klumpp, A., Ansel, E., Fomin, A., Schnirring, S., Pickl, C.,** 2004. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. *Hereditas* 141: 142-148.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F. & Brouillard, R.** 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- Larson, R. A.** 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27 (4): 969-978.
- Ma, T. H.** 1983. *Tradescantia*-micronucleus (Trade-MCN) test for environmental clastogenesis. In: A. R. Klober, T. K. Wong, L. D. Grant, R. S. Dewoskin & T. J. Huges (eds). *In vivo* toxicity testing of environmental agents. Plenum Press, New York, pp. 191-214.

- Martínez, M. A. D. P. & Martínez, A. J.** 1993. Flavonoid distribution in *Tradescantia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 21 (2): 255-265.
- Paiva, E.A.S., Isaias, R.M.S., Vale, F.H.A., Queiroz & C.G.S.** 2003. The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea Boom* (Commelinaceae) leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 617-624.
- Sarma, A. D. & Sharma, R.** 1999. Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochemistry* 52: 1313-1318.
- Taylor, L. P. & Grotewold, E.** 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 317-323.
- Xiao, C. M. & Mascarenhas, J. P.** 1985. High temperature-induced thermotolerance in pollen tubes of *Tradescantia* and heat-shock proteins. *Plant Physiology* 78: 887-890.
- Wang, S. & Wang, X.** 1999. The *Tradescantia* – micronucleus test on the genotoxicity of UV-B radiation. *Mutation Research* 426: 151-153

Bibliografia

- Alloway, B. J. & Ayres, D. C.** 1993. Chemical Principles of Environmental Pollution. Blackie Academic & Professional, UK.
- Alves, E. S.** 1995. The effects of the pollution on wood of *Cecropia glazioui* (Cecropiaceae). IAWA Journal 16: 69-80
- Alves, E. S., Pedroso, A. N. V., Domingos, M., Guimarães, E. T. & Saldiva, P. H. N.** 2003. Biomonitoramento *indoor* do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. Hoehnea 30(2): 89-94
- Ashmore, M. R.** 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. Plant, Cell and Environment 28: 949-964
- Batalha, J. R. F., Guimarães, E.T., Lobo, D. J. A., Lichtenfels, A. J. F. C., Deur, T., Carvalho, H. A., Alves, E. S., Domingos, M., Rodrigues, G. S., Saldiva, P. H. N. .** 1999. Exploring the clastogenicity effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using *Tradescantia* micronuclei assay. Mutation Research 426: 229-232

- Baier, M., Kandlbider, A., Gollack, D. & Josef-Dietz, K.** 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signaling and response. *Plant, Cell and Environment* 28: 1012-1020
- Baublis, A. J. & Berber-Jiménez, M. D.** 1995. Structural and conformational characterization of a stable anthocyanin from *Tradescantia pallida*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43: 640-646.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B. B., Gruissen, W., Jones, R. L. (Eds) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists (USA), New York. 1158-1203 pp
- Bulbovas, P.** 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras de resistência da espécie à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 108 p.
- Burkey, K.O., Eason, G.,** 2002. Ozone tolerance in snap bean is associated with elevated ascorbic acid in the leaf apoplast. *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 on ozone-sensitive wildflowers. *Environmental Pollution* 143: 427-434
- Calatayud, A., Barreno, E.,** 2001. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid

peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. *Environmental Pollution* 115: 283-289.

Calatayud, A., Iglesias, D. J., Talón, M. & Barreno, E. 2003. Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 839-845

Castillo, F. J., Penel, C. & Greppin, H. 1984. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves. *Plant Physiology* 74: 846-851

Castillo, F. J., Greppin, H. 1988. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. Leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany* 28(3): 231-238

Carvalho-Oliveira, R., Pozo, R.M.K., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Martins-Junior, H.A., Bustilho, J.O.W.V., Saiki, M., Sato, I.M., Saldiva P.H.N. 2005. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. *Environmental Research* 98: 1-7.

CETESB.- Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo 2007. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo – 2006. Série *Relatórios*/ Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

Chalker-Scott, L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses.

Phytochemistry and Photobiology 70 (1): 1-9.

Chen, Z. & Gallie, D. R. 2005. Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiology* 138: 1673-1689

Chernikova, T., Robinson, J. M., Lee, E. H. & Mulchi, C. 2000. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynthesis Research* 64: 15-26

Chiarello, N.R. & Gulmon, S.L. 1991. Stress effects on plant reproduction. In: Response of plants to multiple stresses, H. Mooney, AA. William, E. Winner & E. J. Pell (eds). Academic Press Inc. pp. 161 – 187

Clapp, L. J. & Jenkin, M. E. 2001. Analysis of the relation between ambient levels of O₃, NO₂ and NO as a function of NO_x in the UK. *Atmosphere Environment* 35: 6391-6405

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. 1990. Resolução nº 03, de 28/09/1990. Ministério do Meio Ambiente. [Http://www.conama.gov.br/port/conama/res/res90/res0390.html](http://www.conama.gov.br/port/conama/res/res90/res0390.html) (acesso em 11/10/2006)

Conklin, P.L. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment* 24: 383-394.

- Conklin, P. L. & Barth, C.** 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment* 27: 959-970
- Constantin, M. J. & Owens, A.** 1982. Plant genetic systems with potential for the detection of atmospheric mutagens. *In: R. R. Tice, D. L. Costa, K. M. Schaich.* (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Plenum Press, New York. Pp 159-177.
- Corrêa, M.G.S., Viégas, J., Silva, J. B., Ávila, P. F. V., Busato, G. R., Lemes, J. S.** 2005. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Botanica Brasilica* 19(2): 295-303
- Cotelle, S., Masfaraud, J. F. & Féraud, J. F.** 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/ Vicia* – micronucleus and the *Tradescantia* – micronucleus assays. *Mutation Research* 426: 167-171
- Darral, N. M.** 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell and Environment* 12: 1-30
- De Temmerman, L., Bell, J. N. B., Garrec, J. P., Klumpp, A., Krause, G. H. M., Tonneijck, A. E. G.** 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. *In: A. Klumpp, W. Ansel, & G. Klumpp.* (eds). 2004. *Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness*. Cuvillier Verlag, Gottingen. pp. 337-373

- Emerit, I.** 1984. Active oxygen species at the origin of sister chromatid exchanges. In: Hollaender, A. (ed). 1984. Basic Life Sciences – Sister Chromatid Exchanges – part A Plenum Press, USA. 127-139 pp
- Evans, L. S., Albury, K. & Jennings, N.** 1996. Relationships between anatomical characteristics and ozone sensitivity of leaves of several herbaceous dicotyledonous plant species at Great Smoky Mountains National Park. *Environmental and Experimental Botany* 36(4): 413-420
- Falisticco, E., Torricelli, R., Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C. & Monarca, S.** 2000. Enhancement of micronuclei frequency in the *Tradescantia*/ micronuclei test using a long recovery time. *Hereditas* 133: 171-174
- Ferdinand, J. A, Fredericksen, T. S., Kouterick, K. B. & Skelly, J. M.** 2000. Leaf morphology and ozone sensitivity of two open pollinated genotypes of black cherry (*Prunus serotina*) seedlings. *Environmental Pollution* 108: 297-302
- Ferreira, M. I.** 2004. Avaliação do potencial genotóxico da poluição atmosférica no Parque do Ibirapuera, São Paulo, com o bioensaio TRAD-STH de clones da *Tradescantia* . Dissertação de Mestrado. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ferreira, M. I., Domingos, M., Gomes, H. A, Saldiva, P. H. N. & Assunção, J. V.** 2007.

- Evaluation of mutagenic potential of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, São Paulo – SP, Brazil, using the *Tradescantia* stamen hair assay. *Environmental Pollution* 145: 219-224
- Fetner, R. H.** 1958. Chromosome breakage in *Vicia faba* by ozone. *Nature* 181: 504-505
- Fetner, R. H.** 1962. Ozone-induced chromosome breakage in human cell cultures. *Nature* 194: 793-794
- Finlayson-Pitts, B. & Pitts Jr., J. N.** 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* 276: 1045-1052
- Fiskesjo, G.** 1997. Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. *In: G. Fiskesjo (ed). Plants for Environment Studies. CRC Press, USA. 308-333 pp*
- Foyer, C.H., Noctor, G.** 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28: 1056-1071.
- Gardner, D. E. & Gardner, S. C. M.** 1994. Toxicology of air pollution. *In: L. G. Cockerham, & B. S. Shane (eds) 1994. Basic Environmental Toxicology, CRC Press, USA. pp 287-319*
- Gichner, T., Langebartels, C., Sandermann Jr., H.** 1992. Ozone is not mutagenic in the

Tradescantia and tobacco mutagenicity assays. *Mutation Research* 2819: 203-206.

Gill, B. S. & Sandhu, S. S. 1992. application of the *Tradescantia* micronucleus assay for the genetic evaluation of chemical mixtures in soil and aqueous media. *Mutation Research* 270: 65-69.

Giri, A., Khynriam, D. & Prasad, S. B. 1998. Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. *Mutation Research* 421: 139-148.

Goldsmith, J. R., Friger, M. D. & Abramson, M. 1996. Associations between health and air pollution in time-series analyses. *Archives of Environmental Health* 51: 359-367.

Golubovskaya, I. N. 1979. Genetic control of meiosis. *International Review of Cytology*. 58:247-290

Grant, W. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research* 310: 175-185.

Grant, W.F., 1998. Higher plant assays for the detection of genotoxicity in air polluted environments. *Ecosystem Health* 4: 210-229.

Grant, W. 1999. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research* 426: 107-112.

- Guimarães, E. T., Domingos, M., Alves, E. S., Caldini Jr. , N., Lobo, D. J. A., Lichtenfels, A. J. F. C. & Saldiva, P. H. N.** 2000. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brasil) with the *Tradescantia* – micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environmental and Experimental Botany* 44: 1-8.
- Heath, R. L.** 1975. Ozone. In: Mudd, J. B. & Kozlowski, T. T. (eds). 1975. Responses of plants to air pollution. Academic Press, Inc., USA. 23-55 pp
- 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.
- Horemans, N., Foyer, C. H., Potters, G. & Asard, H.** 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 531-540
- Husain, S. R., Cillard, J. & Cillard, P.** 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26 (9): 2489-2491.
- Ichikawa, S.** 1992. *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its responses to ionizing radiations and chemical mutagens, and some synergistic effects found. *Mutation Research* 270: 3-22.
- Ichikawa, S., Nakano, A., Kenmochi, M., Yamamoto, I., Murai, M., Takahashi, E., Yamaguchi, A., Watanabe, K., Tomiyama, M., Sugiyama, K., Yogo, A., Yazaki, T., Okumura, M., Shima, N., Satoh, M., Yoshimoto, M., Xiao, L. Z.** 1996. Yearly

variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of *Tradescantia* clone KU 9 grown outdoors, which showed a significant increase after the Chernobyl accident. *Mutation Research* 349: 249-259

Iglesias, D. J., Calatayud, A., Barreno, E., Primo-Millo, E., Talon, M. 2006. Responses of citrus plants to ozone: leaf biochemistry, antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 125-131.

Isidori, M., Ferrara, M., Lavorgna, M., Nardelli, AA. & Parrella, AA. 2003. In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the *tradescantia* micronucleus bioassay and semipermeable membrana devices (SPMDs). *Chemosphere* 52: 121-126.

Janakiraman, R. & Harney, P. M. 1976. Effects of ozone on meiotic chromosomes of *Vicia faba*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology* 18: 727-730.

Kangasjarvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. & Karjalainen, R. 1994. Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* 17: 783-794

Keller, T., Schwager, H. 1977. Air pollution and ascorbate. *European Journal of Forest Pathology* 7: 338-350.

Klumpp, A. 2001. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. *In: Maia, N. B., Martos, H. L. & Barrela, W. (eds).* 2001. Indicadores ambientais: conceitos e aplicações. Editora da Pontifícia Universidade Católica –

EDUC, São Paulo, pp. 77-93.

Klumpp, A., Ansel, E., Fomin, A., Schnirring, S., Pickl, C., 2004. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. *Hereditas* 141: 142-148.

Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F. & Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.

Krupa, S. A. & Manning, W. J. 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137

Krupa, S.V., Manning & W.J., Nosal, M. 1993. Use of tobacco cultivars as biological indicators of ambient ozone pollution: an analysis of exposure-response relationships. *Environmental Pollution* 81: 137-148.

Laisk, A., Kull, O. & Moldau, H. 1989. Ozone concentration in the leaf intercellular air space is close to zero. *Plant Physiology* 90: 1163-1167

Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grun, S. & Sanderman, H. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 567-575

Larson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27 (4): 969-978.

Logan, W. P. D. 1953. Mortality in London fog incident. *Lancet* 1: 336-338

Long S.P., Naidu S.L. 2003. Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone. In: Bell, J.N.B, Treshow, M. (Eds.), *Air Pollution and Plant Life*. John Wiley & Sons Ltd., London, 69-88 pp

Luwe, M. & Heber, U. 1995. Ozone detoxification in the apoplast and symplast of spinach, broad bean and beech leaves at ambient and elevated concentrations of ozone in air. *Planta* 197: 448-455

Lyons, T., Ollerenshaw, J. H. & Barnes, J. D. 1999. Impacts of ozone on *Plantago major*: apoplastic and symplastic antioxidant status. *New Phytologist* 141: 253-263

Ma, T. H. 1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. *Environmental Health Perspective* 37: 85-90

Ma, T.H. 1982. *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiose). A report of the U.S. Environmental Protection Agency. *Mutation Research* 99: 293-302.

Ma, T. H., Anderson, V. A. & Ahmed, I. 1982. Environmental clastogens detected by meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. Pages 141-157 In R. R. Tice, D. L. Costa

- & K. M. Schaich (eds). Genotoxic effects of airborne agents. Plenum Press, New York
- Ma, T. H.** 1983. *Tradescantia*-micronucleus (Trade-MCN) test for environmental clastogenesis. In: A. R. Klover, T. K. Wong, L. D. Grant, R. S. Dewoskin & T. J. Huges (eds). *In vivo* toxicity testing of environmental agents. Plenum Press, New York, pp. 191-214.
- Ma, T. H., Cabrera, G. L., Cebulska-Wasilewska, A., Chen, R., Loarca, F., Vandenberg, A. L. & Salamone, M. F.** 1994. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutation Research* 310: 211-220
- Mansfield, T. .A. & Pearson, M.** 1993. Physiological basis of stress imposed by ozone pollution. In: Fowden, L., Mansfield, T. & Stoddart, J. (eds) 1993. *Plant Adaptation to Environmental Stress*. Chapman & Hall, UK. 155-170 pp
- Martínez, M. A. D. P. & Martínez, A. J.** 1993. Flavonoid distribution in *Tradescantia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 21 (2): 255-265.
- Mehlman, M. A. & Borek, C.** 1987. Toxicology and biochemical mechanisms of ozone. *Environmental Research* 42: 36-53
- Menser, H. A.** 1964. Responses of plants to air pollutants III – a relation between ascorbic acid levels and ozone susceptibility of light – preconditioned plants. *Plant Physiology* 39: 564-567

Merz, T., Bender, M. A., Kerr, H. D. & Kulle, T. J. 1975. Observations of aberrations in chromosomes of lymphocytes from human subjects exposed to ozone at a concentration of 0,5 ppm for 6 and 10 hours. *Mutation Research* 31: 299-302

Misik, M., Micieta, K., Solenska, M., Misikova, K., Pisarcikova, H. & Knasmuller, S. 2007. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia micronucleus* and pollen abortion tests with wild life plants: demonstration of the efficacy of emission controls in a eastern European city. *Environmental Pollution* 145: 459-466.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410

Moraes, R. M., Bulbovas, P., Furlan, C. M., Domingos, M., Meirelles, S. T., Delitti, W. B. C., Sanz, M. J. 2006. Physiological responses of saplings of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, under ozone fumigation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 306-312

Moraes, R. M., Furlan, C. M., Bulbovas, P., Domingos, M., Meirelles, S. T., Salatino, A., Delitti, W. B. C. & Sanz, M. J. 2004. Photosynthetic responses of tropical trees to short-term exposure to ozone. *Photosynthetica* 42: 291-293.

Novak, K., Skelly, J. M., Schaub, M., Krauchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuer, P.

2003. ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environmental Pollution* 125: 41-52.

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

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

Paiva, E.A.S., Isaias, R.M.S., Vale, F.H.A., Queiroz & C.G.S. 2003. The influence of light

intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom (Commelinaceae) leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 617-624.

Pedroso, A. N. V. 2006. Avaliação estrutural de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' sob diferentes níveis de contaminação atmosférica. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo – Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 68 p.

Perchorowicz, J. T. & Ting, I. P. 1974. Ozone effects on plant cell permeability. *American Journal of Botany* 61: 787-793.

Percy, K. E., Awmack, C. S., Lindroth, R. L., Kubiske, M. E., Kopper, B. J., Isebrands, J. G., Pregitzer, K. S., Hendrey, G. R., Dickson, R. E., Zak, D. R., Oksanen, E., Sober, Zaak, Harrington, R. & Karnosky, D. 2002. . Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO₂ e O₃. *Nature* 420: 403-407.

Raghavan, V. 1997. Molecular embryology of flowering plants. Cambridge University Press.

690 p

Rajeshwari, J. & Harney, P. M. 1976. Effects of ozone on meiotic chromosomes of *Vicia faba*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 18: 727-730

Rodrigues, G.S., Madkour, S.A. & Weinstein, L.H., 1996. Genotoxic activity of ozone in *Tradescantia*. Environmental and Experimental Botany 36: 45-50.

Rodrigues, G.S., Ma, T.H., Pimentel D. & Weinstein L.H., 1997. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: A review. Critical Reviews in Plant Sciences 16: 325-359.

Roth, I. 1964. Microtécnica vegetal. Editora Facultad de Ciencias Universidad Central de Venezuela, Caracas. 87 p.

Ruiz, E. F., Rabago, V. M. E., Lecona, S. U., Perez, A. B. & Ma, T. H. 1992. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. Mutation Research 270: 45-51

Saldiva, P. H. N., Lichtenfels, A. J. F. C., Paiva, P. S. O., Barone, I. A., Martins, M. A., Massad, E., Pereira, J. C. R., Xavier, V. P., Singer, J. M. & Bohm, G. M. 1994. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children

in São Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environmental Research* 65: 218-225.

Sant'Anna, E. T. G. 2003; Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação dos riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero *Tradescantia*. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo. 102 p

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 doutoramento, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.

Sarma, A. D. & Sharma, R. 1999. Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochemistry* 52: 1313-1318.

Savóia, E. J. L. 2007. Potencial de *Tradescantia pallida* cv 'Purpurea' para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André – São Paulo – por meio do bioensaio Trad – MCN e do acúmulo foliar de elementos tóxicos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7-12.

Schwartz, J. & Dockery, D. W. 1992. Increased mortality in Philadelphia associated with daily air pollution concentrations. *American Review of Respiratory Disease* 145: 600-

- Seinfeld, J.H.** 1989. Urban air Pollution: state of the Science. *Science*. 243: 745-752.
- Silva, F. L. A.** 2007. Uso de bioindicadores vegetais para avaliação de poluentes atmosféricos em microescala vertical. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 127 p.
- Silva, M. D.** 2005. Delimitação do potencial de plantas de *Tradescantia pallida* cv. *Pupurea* cultivadas na cidade de São Paulo por indicadores de riscos clastogênicos impostos pela poluição aérea. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 69 p.
- Singh, R.** 2003. *Plant cytogenetics*. C R C Press, USA. 463 p.
- Smirnoff, N.** 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. *In*: N. Smirnoff (ed). 1995. *Environmental and Plant Metabolism – Flexibility and Acclimation*. BIOS Scientific Publisher Limited, UK, pp. 217-243.
- Smirnoff, N.** 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.
- Song, X. S., Hu, W. H., Mao, W. H., Ogwen, J. O., Zhou, Y. H. & Yu, J. Q.** 2005. response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to

abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. Plant Physiology and Biochemistry 43: 1082-1088

Souza, M. M., Martins, E. R., Pereira, T. N . S. & Oliveira, L. O. 2006. Reproductive studies on Ipeac (*Cephaelis ipecacuanha* (BROT.) A. Rich; Rubiaceae): Meiotic behaviour and pollen viability. Brazillian Journal of Biology 66(1A): 151-159

Spengler, J. D., Koutrakis, P., Dockery, D. W., Raizenne, M. & Speizer, F. E. 1996. Health effects of acid aerosols on North american children: air pollution exposures. Environmental Health Perspectives 104(5): 492-499.

Steinitz, L. M. 1944. The effect of lack of oxygen on meiosis in *Tradescantia*. American Journal of Botany 31: 428-443

Suyama, F., Guimarães, E. T., Lobo, D. J. .A., Rodrigues, G. S., Domingos, M. Alves, E. S., Carvalho, H. A. & Saldiva, P. H. N. 2002. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *Purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 35: 127-129.

Taylor, L. P. & Grotewold, E. 2005. Flavonoids as developmental regulators. Current Opinion in Plant Biology 8: 317-323.

Torsethaugen, G., Pitcher, L. H., Zilinskas, B. A., Pell, E. J. 1997. Overproduction of

ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. *Plant Physiology* 114: 529-537

Treshow, M. & Anderson, F. K. 1989. *Plant stress from air pollution*. John Wiley & Sons, UK.

Turcsányi, E., Lyons, T., Plochl, M. & Barnes, J. 2000. Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone ? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Experimental Botany* 51: 901-910

Uhl, M., Plewa, M. J., Majer, B. J. & Knasmuller, S. 2003. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. *In*: J. Maluszynska, & M. Plewa (eds). *Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and Human Health*. Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego, Katowice, pp. 1-30.

Vant' Hof, J. & Schairer, L. A. 1982. Tradescantia assay system for gaseous mutagens – a report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* 99: 303-315.

Victorin, K. 1992. Review of the genotoxicity of ozone. *Mutation Research* 227: 221-238

Xiao, C. M. & Mascarenhas, J. P. 1985. High temperature-induced thermotolerance in pollen tubes of *Tradescantia* and heat-shock proteins. *Plant Physiology* 78: 887-890.

Wang, S. & Wang, X. 1999. The *Tradescantia* – micronucleus test on the genotoxicity of UV-B radiation. *Mutation Research* 426: 151-153

Yamaguchi, L. F., Vassão, D. G., Kato, M. J. & Di Mascio, P. 2005. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucária angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry* 66: 2238-2247