

JÉSSICA BORDOTTI NOBRE ESPOSITO

**Influência do MnDFB na tolerância ao estresse
oxidativo em plantas de *Glycine max* expostas ao
ozônio e chuva ácida**

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

SÃO PAULO

2012

JÉSSICA BORDOTTI NOBRE ESPOSITO

**Influência do MnDFB na tolerância ao estresse
oxidativo em plantas de *Glycine max* expostas ao
ozônio e chuva ácida**

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

ORIENTADORA: DRA. SILVIA RIBEIRO DE SOUZA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Espósito, Jéssica Bordotti Nobre

E77i Influencia do MnDFB na tolerância ao estresse oxidativo em plantas de *Glycine max* expostas ao ozônio e chuva ácida / Jéssica Bordotti Nobre Espósito -- São Paulo, 2012.

88 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2012

Bibliografia.

1. Leguminosae. 2. Ozônio. 3. Chuva ácida. I. Título

CDU: 582.736

“The beauty of nature lies in detail; the message, in generality.

Optimal appreciation demands both...”

Stephen Jay Gould

Wonderful Life

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Botânica e à Pós-Graduação pelo aprimoramento contínuo do Programa.

À minha orientadora Dra. Silvia Ribeiro de Souza por incentivar a novidade em projetos de pesquisa, onde o estudo árduo de temas complexos aumentou não só o conhecimento, mas a paixão pela Biologia. Agradeço também a paciência e amizade nos momentos de tensão.

À CAPES/PNADB pela bolsa concedida e iniciativa em promover a troca de experiência e conhecimento entre instituições de pesquisa.

À Prof. Luzimar Campos da Silva, pesquisadora da Universidade Federal de Viçosa, por acreditar no trabalho, supervisioná-lo, sugerir experimentos e fornecer toda a estrutura para obtenção dos dados. À Nívea Vieira pela orientação com as técnicas anatômicas e ao Sr. Rogério, funcionário da UCP, pela disponibilização de equipamentos e manutenção do sistema de chuva. Ao aluno Talles Oliveira por dar prosseguimento ao estudo anatômico.

Às Mestras Talita Oliveira, Larisse Freitas e Jaqueline Vasconcelos por estarem presentes em todos momentos da estadia em Viçosa: no plantio, no cuidado com as plantas, na coleta de amostras até altas horas, com os protocolos de anatomia, pela hospitalidade, diversão e ensinar na prática o que é amizade.

Ao Prof. Ricardo Antunes de Azevedo, chefe do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas da E-SALQ-USP, pela cooperação nos experimentos de atividade enzimática e à Dra. Salete Gaziola pela recepção e auxílio no laboratório, e também pelas sugestões valiosas para aprimorar as análises.

Ao Prof. Breno Pannia Esposito, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, por disponibilizar seu laboratório para a análise de metais, pelo fornecimento contínuo do complexo de manganês e acessibilidade para discutir resultados. Agradeço ao seu aluno, Thiago Andrade por sintetizar o complexo sempre tão prontamente.

Aos amigos químicos do IQ-USP, Lucas Vono, Marco Aurélio e Tiago Artur por ensinarem (muitas vezes), passo a passo, como operar o espectro de absorção atômica.

Às pesquisadoras do Núcleo de Ecologia Marisa Domingos, Regina Moraes e Patricia Bulbovas pela contribuição direta neste trabalho.

Às funcionárias Amariles, Marli, Maria Auxiliadora e Valdenice por zelar e organizar o laboratório e tornar o trabalho mais prazeroso.

Aos amigos que sempre contribuíram ajudando nos experimentos, lavando vidraria, discutindo protocolos, abrindo e fechando as câmaras, carregando substrato e/ou alegrando o dia: Ricardo Nakazato, Daiane Teixeira, Ana Paula Dias, Marcelle Dafré, Jéssica Cassimiro, Marisia Esposito, Pedro Lembo, Patricia Giampaoli, Cristiane Aguiar, Andressa Ribeiro, Andrea Pedroso, Paula Carvalho e Leonardo Fujita. À Simone Ferreira por interromper a escrita de sua dissertação para realizar as medidas de fluorescência na soja e à Pryscilla Denise pelo auxílio com a estatística.

Às novas ingressantes ao grupo de pesquisa Marina Zanella, Giselle Pedrosa e Daiana Oliveira por toda a ajuda no laboratório.

Aos meus pais tão queridos, Paulo e Gizelda que sempre acreditaram em mim e incentivaram a vontade de aprender.

Ao meu marido Breno por ajudar ativamente no experimento (muitas vezes durante os finais de semana), estimular as melhores discussões sobre Ciência e ser um amigo tão generoso.

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract	iii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	01
1.1.INTRODUÇÃO GERAL	02
1.2.REVISÃO DE LITERATURA	06
1.2.1. Soja e sua importância	06
1.2.2. Ocorrência de ozônio e chuva ácida nas regiões de cultivo de soja “Sambaíba”	07
1.2.3. Fatores de estresse oxidativo em plantas: ozônio e chuva ácida	08
1.2.4. Antioxidantes	10
<i>Enzimas superóxido dismutase (SOD)</i>	12
<i>Miméticos da SOD</i>	14
1.3.JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	15
1.4.REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE MnDFB NA SUPERÓXIDO DISMUTASE DE <i>Glycine max</i> ‘SAMBAÍBA’	23
2.1. INTRODUÇÃO	24
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.2.1. Síntese do complexo MnDFB	26
2.2.2. Cultivo e exposição da soja	27
2.2.3. Procedimentos e análises	29
Biometria	29
Ensaio bioquímico	30
<i>Extração da ascorbato peroxidase (APX) e SOD total</i>	30
<i>Atividade da APX</i>	30
<i>Atividade da SOD total</i>	30
<i>Atividade das isoenzimas de SOD</i>	31
<i>Peroxidação lipídica</i>	32
Quantificação de metais nas folhas e raízes	33
Análise estatística	33
2.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

2.2.5. CONCLUSÃO	42
2.2.6. REFERÊNCIAS	43

CAPÍTULO 3 – INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DO MnDFB NO AUMENTO DA TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE SOJA SOB ESTRESSE ABIÓTICO:

OZÔNIO E CHUVA ÁCIDA	47
3.1. INTRODUÇÃO	48
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	54
3.2.1. Exposição à atmosfera controlada: fumigação com ar filtrado e ozônio	54
Cultivo e exposição da soja	54
3.2.2. Exposição à chuva simulada	57
Cultivo e exposição da soja	57
3.2.3. Procedimento e análises	61
Avaliação dos danos visíveis e índice de injúria foliar (IIF)	61
Rendimento quântico do fotossistema II (Fv/Fm)	61
Biometria, ensaios enzimáticos, peroxidação lipídica e quantificação de metais	62
Análise anatômica	62
Análise estatística	63
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.4 CONCLUSÃO	79
3.5 REFERÊNCIAS	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
ANEXOS	86

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Plântula de soja e principais estruturas.	06
Figura 2. Ciclo ascorbato-glutationa.	11
Figura 3. Molécula da desferrioxamina B composta por três hidroxamatos.	24
Figura 4. Estrutura do complexo Mn desferrioxamina-B.	25
Figura 5. Cultivo das plantas de <i>Glycine max</i> ‘Sambaíba’.	28
Figura 6. Taxa de crescimento relativo dos órgãos aéreos de <i>Glycine max</i>	36
Figura 7. Concentração de malondialdeído (MDA) nas folhas.	36
Figura 8. Atividade da ascorbato peroxidase (APX) nas folhas.	37
Figura 9. Atividade total das superóxido dismutase (SOD) nas folhas.	37
Figura 10. Atividade de isoenzimas de superóxido dismutase (SOD) em gel de poliacrilamida.	39
Figura 11. Concentração de metais em folhas e raízes	41
Figura 12. Sistema de fumigação ou atmosfera controlada.	56
Figura 13. Casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa.	58
Figura 14. Sistema de simulação de chuva simulada.	59
Figura 15. Plantas de soja na câmara de chuva ácida após evento de chuva.	60
Figura 16. Variação dos indicadores de tolerância em folhas de soja tratadas com MnDFB ou MnSO ₄ e não-tratadas (controle), sob exposição ao ar filtrado e ozônio.	65
Figura 17. Taxa de crescimento relativo dos órgãos aéreos de <i>Glycine max</i> sob diferentes tratamentos e expostas à atmosfera controlada.	66
Figura 18. Atividade de isoenzimas superóxido dismutase em plantas de soja sob diferentes tratamentos e expostas à atmosfera controlada.	68
Figura 19. Concentração de metais em folhas e raízes de plantas de soja expostas à atmosfera controlada.	69
Figura 20. Variação dos indicadores de tolerância em folhas de soja tratadas com MnDFB ou MnSO ₄ e não-tratadas (controle), sob chuva neutra e chuva ácida.	71
Figura 21. Cortes transversais do mesofilo de plantas de soja sob tratamento controle e submetidas à exposição em câmara de chuva simulada.	73
Figura 22. Cortes transversais apresentando a espessura do mesofilo de plantas	

de soja submetidas a diferentes tratamentos e expostas à chuva simulada.....	73
Figura 24. Atividade de isoenzimas superóxido dismutase em plantas de soja submetidas à diferentes tratamentos e expostas à chuva simulada.	76
Figura 25. Concentração de metais em folhas e raízes de plantas de soja expostas à chuva simulada.	77
Figura 26. Revelação diferencial de isoenzimas.	87
Figura 27. Cortes transversais do mesofilo de plantas de soja tratadas com MnDFB e expostas à chuva simulada.	88
Tabela 1. Condições climáticas na casa de vegetação do Instituto de Botânica (nov/2010 a fev/ 2011).	28
Tabela 2. Condições ambientais na casa de vegetação do Instituto de Botânica (set/2011 a fev/2012).	54
Tabela 3. Condições ambientais na casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa (abr/2010 a jun/2010).	57
Tabela 4. Médias e desvio padrão dos parâmetros F_v/F_m , F_0 e F_m medidos nas folhas de soja nas exposições ao ar filtrado e ozônio.	62
Tabela 5. Valores médios das variáveis indicadoras de tolerância em plantas sob diferentes tratamentos e expostas em câmaras de atmosfera controlada e chuva simulada	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido ascórbico
AF – ar filtrado
APX – ascorbato peroxidase
CAT - catalase
CO₂ – dióxido de carbono
COVs – compostos orgânicos voláteis
Cu/ZnSOD – cobre/zinco superóxido dismutase
DFB – desferrioxamina B
ERs – espécies reativas
EROs – espécies reativas de oxigênio
F₀ – fluorescência mínima
F_m – fluorescência máxima
Fv/Fm – rendimento quântico do fotossistema II
FeSOD – ferro superóxido dismutase
GPX – glutathione peroxidase
GR – glutathione reductase
GSH – glutathione reduzida
GSSG – glutathione oxidada
H⁺ - íon hidrogênio
H₂CO₃ – ácido carbônico
HCO₃⁻ - íon carbonato
HNO₃ – ácido nítrico
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
H₃O⁺ - íon hidrônio
H₂S – gás sulfídrico
H₂SO₄ – ácido sulfúrico
KCN – cianeto de potássio
MDA – malondialdeído
MDAR – monodehidroascorbato reductase
MnDFB – manganês(III)-desferrioxamina B
MnSOD – manganês superóxido dismutase
NO – óxido nítrico

NO_3^- - íon nitrato

NO_3^* - radical nitrato

NO_x – óxidos de nitrogênio

O_2 – oxigênio molecular

O_2^{*-} - ânion superóxido

$^1\text{O}_2$ - oxigênio singlete

O_3 – ozônio

OH^* - radical hidroxila

ONOO^- - peroxinitrito

PAN – nitrato de peroxiacetila

PAR – radiação fotossinteticamente ativa

pH – potencial hidrogênionico

PSII – fotossistema II

SO_2 – dióxido de enxofre

SO_4^{2-} – íon sulfato

SO_3^{*-} - radical trióxido de enxofre

SOD – superóxido dismutase

TCR – taxa de crescimento relativo

UR% - umidade relativa

Resumo – O ozônio troposférico e a chuva ácida são poluentes capazes de induzir a formação de espécies reativas (ERs) no meio celular, principalmente nas folhas, levando à senescência prematura e perda de produtividade no caso das espécies agrícolas. No Brasil, a soja *Glycine max* “Sambaíba” é uma espécie de grande importância econômica, porém plantada em regiões impactadas por estes poluentes. Por isso, acredita-se que esta espécie vegetal esteja sob estresse oxidativo causados pela poluição atmosférica dessas regiões. A remoção do excesso de ERs é realizada por diversos antioxidantes moleculares e enzimáticos, os quais podem atuar em conjunto, num ciclo conhecido como ascorbato-glutationa. Este ciclo é iniciado pela remoção da ER ânion superóxido (O_2^{*-}) pela classe de isoenzimas superóxido dismutase (SOD) antes que o radical livre cause danos severos às estruturas celulares. A SOD é uma família de metaloproteínas que, em vegetais, estão inseridas em diversas organelas e compartimentos celulares: manganês SOD (MnSOD), ferroSOD (FeSOD) e cobre/zincoSOD (Cu/ZnSOD). Por sua ação e abrangência é considerada um importante fator de tolerância ao estresse oxidativo. Testes *in vitro* mostraram que o complexo metálico Mn(III)-desferrioxaminaB (MnDFB) exerce sobre o O_2^{*-} a mesma ação da SOD, sendo assim considerado um mimético. Por isso, a hipótese desse estudo é que plantas de soja *Glycine max* “Sambaíba” tratadas com MnDFB poderiam ser mais tolerantes ao estresse causado pela poluição atmosférica. Para tal, determinou-se a dose de MnDFB capaz de promover respostas de tolerância em plantas saudáveis e verificou-se se a dose do complexo aplicada poderia aumentar a resistência de soja mantidas em condições controladas de ozônio ($60\text{ppb}\cdot\text{h}^{-1}/6\text{h}$) ou chuva ácida ($\text{pH}3,0$) e, ainda se uma solução de MnSO_4 teria efeito semelhante. Cada experimento teve duração de três dias e ao final foram avaliados a taxa de crescimento relativo (TCR) de caule e folhas, índice de injúria foliar, (I-IF) concentração de malondialdedído (MDA), atividade total de SOD e ascorbato peroxidase (APX), atividade de isoenzimas SOD por eletroforese, concentração de metais (ferro, manganês e cobre) em folhas e raízes, anatomia foliar e eficiência quântica da fotossíntese (F_v/F_m). Evidenciou-se que as diferentes doses de MnDFB (2, 4, e 8 μM) foram capazes de promover aumento da atividade de Cu/ZnSOD, MnSOD e FeSOD de plantas de soja e foi observado alteração na concentração de Fe, Mn e Cu em folhas e raízes tratadas com 8 μM , de forma que pode-se concluir que o MnDFB apresenta potencial para aumentar a tolerância ao estresse oxidativo, ativando as isoenzimas de SOD e alterando a disponibilidade de metais co-fatores dessas isoenzimas. Sob ozônio e chuva ácida, os resultados das respostas de defesa antioxidativas mostraram que plantas tratadas com MnDFB foram mais tolerantes que aquelas tratadas com MnSO_4 e controle. O ozônio ocasionou peroxidação lipídica em plantas tratadas com MnSO_4 e controle, sendo o contrário observado com MnDFB. A chuva ácida não promoveu alteração no mesofilo nas plantas tratadas com MnDFB como observado em MnSO_4 e controle. O aumento na atividade das isoenzimas Cu/ZnSOD e MnSOD nas plantas tratadas com MnDFB, sob estresse oxidativo, indicam que o

MnDFB atua sobre as isoenzimas de SOD. Por meio desse estudo, conclui-se que o MnDFB tem potencial para aumentar a tolerância de plantas expostas a 60ppb de ozônio e chuva ácida à pH 3, no período de exposição estudado. Nessas mesmas condições, a adição de MnSO_4 não é efetiva como o complexo, indicando que não basta adicionar Mn^{2+} para o aumento da tolerância.

Abstract – Tropospheric ozone and acid rain are pollutants capable of generate reactive species (RS) in cells, mainly in leaves, leading to early senescence and agriculture productivity loss. In Brazil, soybean *Glycine max* “Sambaíba” is of great economic importance, however planted in areas impacted by those pollutants. Therefore, soybean might be under oxidative stress caused by air pollution of these areas. Removal of RS is carried out by various antioxidants and enzymes, which act together in ascorbate-glutathione cycle. This cycle is initiated with removal of the RS anion superoxide ($O_2^{\bullet -}$) by superoxide dismutase (SOD) isoenzyme class before cell structures damage caused by the free radical. SOD are metalloproteins within various organelles and plant cell compartments: manganese SOD (MnSOD), iron SOD (FeSOD) and copper/zincSOD (Cu/ZnSOD). SOD is considered an important tolerance factor against oxidative stress due to its role and extent in plant cell. *In vitro* assay showed that the metal complex Mn(III)-desferrioxamine B (MnDFB) plays SOD role and therefore it is considered a SOD mimetic. Hence, the hypothesis of this study is that soybean plants treated with MnDFB could be more tolerant to stress induced by air pollutants. So, it has been proposed to determine MnDFB dose (2, 4 and 8 μ M) capable of promote tolerance response in healthy plants and to verify whether the MnDFB dose selected increase the tolerance of soybean plants under ozone (60ppb.h⁻¹/6h) and acid rain (pH 3.0) simulated conditions and if MnSO₄ solution would have a similar effect. Each experiment lasted three days and at the end day were evaluated the relative growth rate of stems and leaves (TCR), leaf injury index (IIF), malondialdehyde concentration (MDA), total SOD and peroxidase (APX) activity, SOD isoenzymes activity by electrophoresis, metals concentration (Fe, Mn and Cu) in leaves and roots, leaf anatomy and photosynthesis quantum efficiency (Fv/Fm). It was observed that the different doses of MnDFB (2, 4 and 8 μ M) were able to promote increase of the activity of Cu/ ZnSOD, MnSOD and FeSOD of soybean plants. Also, changes in the concentration of Fe, Mn and Cu in leaves and roots treated with 8 μ M were observed. These results suggest that the MnDFB has a potential to increase the tolerance to oxidative stress, activating isoenzymes SOD and altering the availability of metal cofactors of these enzymes. Under ozone and acid rain, the results of the antioxidative defense responses showed that plants treated with MnDFB were more tolerant than those treated with MnSO₄ and control. Ozone caused lipid peroxidation in plants treated with MnSO₄ and control, while the opposite was observed to MnDFB. Acid rain does not promote changes in the mesophyll in plants treated with MnDFB as observed in control and MnSO₄. The increased activity of the isoenzymes Cu/ZnSOD and MnSOD in plants treated with MnDFB, under oxidative stress, indicates a MnDFB action on SOD isoenzymes. Hence, the potential of MnDFB to increase the tolerance of plants exposed to 60 ppb of ozone and acid rain at pH 3.0, in the period of exposure studied, is support by this work. Also, under these conditions, the addition of MnSO₄ is not effective as the complex, indicating that Mn^{2+} alone is not a tolerance enhancer.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

As atividades humanas muitas vezes acrescentam matéria ao ambiente em intensidade ou quantidade que alteram as características físico-químicas e biológicas da atmosfera, corpos d'água e solo (vanLoon & Duffy 2005). A esta matéria dá-se o nome de poluente, o qual pode causar prejuízos à saúde e sobrevivência dos seres vivos (Braga *et al.* 2006, CETESB 2010).

Em se tratando de poluição atmosférica, especialmente dos poluentes liberados para troposfera, camada da atmosfera onde os processos biogeoquímicos ocorrem e se estende até 15 Km da superfície terrestre, destacam-se os gases e aerossóis liberados por fontes naturais ou antrópicas (Nebel & Wright 2000, vanLoon & Duffy 2005).

Os poluentes são classificados quanto à fonte de poluição, natural ou antrópica, e sua origem, primária ou secundária (CETESB 2010). As emissões vulcânicas, queimadas naturais, emissões de gases pela vegetação são as fontes naturais predominantes (Brasseur & Chatfield 1991, Nebel & Wright 2000). Já, as fontes antrópicas englobam as indústrias e meios de transporte que utilizam combustíveis fósseis para gerar energia, bem como as queimadas em florestas ou campos de cultivo (Braga *et al.* 2006, Lehndorff & Schwark 2009). Os primários são aqueles emitidos diretamente das fontes como óxido nítrico (NO), dióxido de carbono (CO₂), compostos orgânicos voláteis (COVs), dióxido de enxofre (SO₂), material particulado, gás sulfídrico (H₂S) etc., e os secundários são resultantes de reações entre os poluentes primários ou outros compostos da atmosfera, como ozônio (O₃), nitrato de peroxiacetila (PAN) e ácidos nítrico e sulfúrico, precursores da deposição ácida.

Dentre os poluentes secundários, o O₃ formado na troposfera se destaca por ser altamente oxidante e encontrado em altas concentrações no mundo todo (Vingarzan 2004, Ashmore 2005). O O₃ é formado na atmosfera no processo conhecido como *smog fotoquímico*, que ocorre tipicamente em dias ensolarados e/ou quando há inversão térmica, fenômeno que impede a dispersão de poluentes (Krupa & Manning 1988, CETESB 2010, Wallace *et al.* 2010). O padrão de qualidade do ar estabelecido para o ozônio (Resolução CONAMA N°003/1990), regu-

lamenta que o poluente não deverá ultrapassar 80 ppb no período de 1 hora. As concentrações médias anuais de ozônio em várias regiões do planeta chegam a 40 ppb, mas as concentrações máximas anuais frequentemente ultrapassam o valor regulamentado de 80 ppb (Vingarzan 2004, Cho *et al.*, 2011).

Estudos dos efeitos de altas concentrações de ozônio em plantas de interesse econômico são frequentes e sabe-se que devido às altas concentrações de ozônio globais 3% de todas as culturas plantadas na Europa foram perdidas no ano 2000, devido à diminuição da biomassa causada pela alteração da fotossíntese e bioquímica celular (Mulchi *et al.* 1988, Morgan *et al.* 2003, Booker *et al.* 2009, Van Dingenen *et al.* 2009).

Além do ozônio, a chuva ácida também é considerada um dos grandes fatores de perturbação no equilíbrio natural dos ecossistemas. Gases como o SO₂ e óxidos de nitrogênio (NO_x) alteram drasticamente o pH da chuva devido a formação de ácidos que aumentam a concentração de íons hidrônio (H₃O⁺) no meio e conseqüentemente diminuem o pH da água da chuva (vanLoon & Duffy 2005).

O ozônio e a chuva ácida são extremamente nocivos para os organismos vivos e seus efeitos podem ser sentidos até em comunidades (Larcher 2000, Schulze *et al.* 2005). Nos vegetais, o ozônio causa diminuição da fotossíntese, senescência prematura, perda de biomassa e redução do crescimento. Os efeitos do ozônio nas plantas variam com a concentração do poluente, tempo de exposição e frequência de picos de alta concentração. A chuva ácida causa necrose nos órgãos de fixação, degeneração da parede celular, ruptura do tecido (Silva *et al.* 2005), anomalias cromossômicas nas raízes, modificação da disponibilidade de micronutrientes e desequilíbrio iônico do solo (Larcher 2000).

Tanto o ozônio (Esposito *et al.* 2009, Cho *et al.* 2011) quanto a chuva ácida (Velikova 2000, Liu & Liu 2011) conduzem a alterações fisiológicas, muitas vezes causadas por um desequilíbrio de espécies reativas (ERs) de oxigênio, enxofre e nitrogênio no meio celular, conduzindo ao efeito denominado de estresse oxidativo. As ERs são moléculas altamente oxidantes como peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), radical trióxido de enxofre ($\text{SO}_3^{\bullet-}$), peroxinitrito ($\text{ONOO}^\bullet$) entre outras (Bray *et al.* 2000, Halliwell & Gutteridge 2007). No transporte de elétrons durante a fotossíntese e a respiração também há formação de ERs e as células possuem mecanismos para retirá-las por meio de antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos, sendo o ciclo ascorbato-glutationa um destes mecanismos (Gill & Tuteja *et al.* 2010).

Quando a célula vegetal não é capaz de recuperar os antioxidantes e as ERs permanecem em níveis elevados, há danos oxidativos irreversíveis levando a degradação dos plastídeos e membranas culminando na morte celular.

Todo o processo de detoxificação das ERs é iniciado com a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) considerada por isso a primeira linha de defesa a nível celular. SOD é uma família de metaloenzimas, classificada em três isoformas em vegetais, de acordo com o cofator metálico presente no sítio ativo catalítico, sendo elas manganês SOD (MnSOD), ferro SOD (FeSOD) e cobre/zinco SOD (Cu/ZnSOD) (Culotta 2001, Alscher *et al.* 2002).

Visto a importância das SODs na detoxificação das ERs, estudos mostram que substâncias capazes de compensar e mimetizar a função desta enzima podem ajudar organismos a combater o estresse oxidativo (Batinić-Haberle *et al.* 2010, Horn *et al.* 2010).

O íon Mn^{2+} é capaz de compensar a perda da SOD e por si só prover proteção contra danos oxidativo, além de ser um cofator da SOD (Sanchez 2005, Halliwell & Gutteridge 2007). Experimentos em células eucariontes transgênicas, que não expressam SOD, mostram que a aplicação de manganês em pequenas concentrações tem efeito antioxidante (Reddi *et al.* 2009). Por outro lado, quando adicionado em concentrações maiores, o Mn^{2+} promove aumento de ERs (Dučić & Polle 2005, Lei *et al.* 2007).

Investigações tem indicado o complexo Mn(III)-desferrioxamina B (MnDFB) como um excelente mimético da SOD, por apresentar atividade catalítica sobre ERs quando comparados ao íon metálico (Faulkner *et al.* 1994). Em experimento *ex vivo*, o complexo foi capaz de tornar células sob estresse oxidativo mais tolerantes (Hahn *et al.* 1991).. Devido a sua capacidade de se ligar a

diversos metais, a desferrioxamina (DFB) está também sendo estudada para remediação de locais contaminados (Hernlem *et al.* 1996, Neubauer *et al.* 2002).

Embora haja evidência que o MnDFB diminua o estresse oxidativo em organismos vivos (Hahn *et al.* 1991), não há estudos comprovando sua eficiência em plantas. Dentre várias espécies vegetais que poderiam ser utilizadas para verificar a eficácia do complexo no aumento da resistência ao estresse oxidativo, destaca-se a soja por já ter sido usada em estudos de estresse oxidativo (Chernikova *et al.* 2000, Bulbovas *et al.* 2007), por ser uma espécie de alto poder econômico e por ser cultivada em regiões que historicamente vem sendo afetada por altas concentrações de ozônio (Artaxo *et al.* 2005, Van Dingenen *et al.* 2009) e chuvas mais ácidas (Rummel *et al.* 2007, Honório *et al.* 2010).

Neste trabalho, buscou-se avaliar a influência do complexo MnDFB na atividade da SOD e no aumento da tolerância ao estresse oxidativo em *Glycine max* cv ‘Sambaíba’. Assim, formulou-se a hipótese de que o estresse oxidativo gerado pelo ozônio e chuva ácida em condições controladas seria minimizado pelo incremento das atividades antioxidantes da SOD promovido pela ação do complexo de manganês (MnDFB).

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Soja e sua importância

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma herbácea pertencente à família Fabacea, gênero *Glycine* e subgênero *Soja* (Figura 1) (Wang *et al.* 2012).

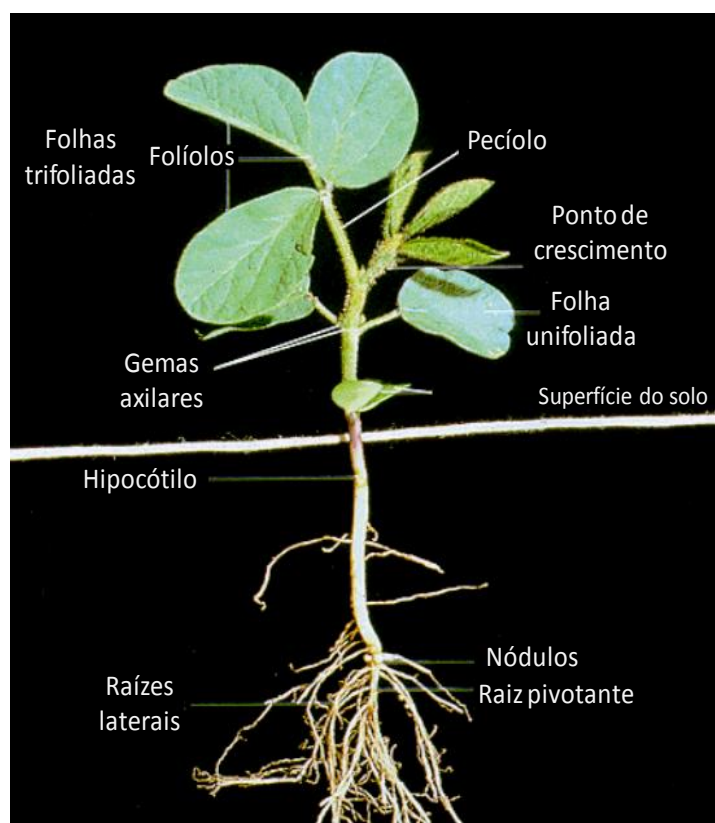


Figura 1. Plântula de soja e principais estruturas (International Plant Nutrition Institute – IPNI Brasil).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization - FAO), a soja representa 60% de todo alimento produzido no mundo, seja de origem animal ou vegetal. Além do consumo do grão, o qual contém em média 40% de proteína e 20% de óleo (Chuang & Singh 2008), seus principais produtos são o óleo refinado e óleo combustível, compondo 35% do total de oleaginosas colhidas no mundo. Também é utilizada na alimentação animal como forrageira e na rotação de cultura para aumentar a fertilidade do solo, já que é simbiote com bactérias fixadoras de nitrogênio.

O cultivo de soja tem se expandindo muito na América do Sul (Martins & Ramos *et al.* 2009). Durante os anos 1960, houve expansão da cultura da soja nas regiões Sul e Sudeste do país. Na década de 1990, a cultura avançou para o Centro-Oeste e, recentemente, o desenvolvimento de cultivares adaptadas para regiões de menor latitude permitiu o avanço da soja para o Norte e Nordeste (Sinclair *et al.* 2005, Martins & Ramos *et al.* 2009).

A soja ‘Sambaíba’ é uma destas cultivares adaptadas e recomendadas para o plantio na região Norte e Nordeste. É uma das principais cultivares plantadas em diversos estados como Pará, Roraima, Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia entre outros de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa 2006, Embrapa 2011). É resistente à infecção por fungos que causam cancro da haste e mancha “olho de rã” nas folhas, mas susceptível aos vírus causadores da necrose da haste e mosaico comum da soja e à nematoides que infestam os grãos.

Ressalta-se que há anos o Brasil é o 2º maior produtor de soja, responsável por 26,8% da safra mundial (Embrapa 2012) e de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção do grão continua em alta, tendo arrecadado onze bilhões de dólares na exportação da safra 2009/2010.

Apesar da alta produção da soja, estima-se que devido a ação do ozônio atmosférico houve perda entre 6 a 16% na produtividade mundial do grão, e no Brasil também há registro de perdas devido ao ozônio, inclusive em regiões remotas da Amazônia (VanDingenen *et al.* 2009). Há indícios que o ozônio nesta região provocou perda de produtividade do grão variando entre 0,1-1 tonelada por Km² (VanDingenen *et al.* 2009).

1.2.2. Ocorrência de ozônio e chuva ácida nas regiões de cultivo de soja “Sambaíba”

A poluição atmosférica no Brasil deixou de ser um problema apenas das metrópoles e tem sido reportada até mesmo em áreas remotas (Artaxo 2004).

O monitoramento do ozônio (O₃) indica que o aumento de seus níveis pode ser devido a intensa emissão dos precursores originados na prática das queimadas (Kirchhoff 1996). Na Amazô-

nia, por exemplo, a concentração de O₃ não ultrapassava 40 ppb até a década de 1990 (Emberson 2003), contudo, atualmente Artaxo *et al.* (2005) e Rummel *et al.* (2007) avaliando a concentração de O₃ em região florestal na estação de seca observaram concentrações entre 50 e 100 ppb, tão altas que são comparáveis às da região metropolitana de São Paulo (CETESB 2010).

Estudos que acompanharam a variação na água de chuva na Amazônia reportaram, na época de seca, pH da chuva entre 4,0 e 4,7 (Williams *et al.* 1997, Germer *et al.* 2007, Honório *et al.* 2010). A fim de comparação, em regiões urbanas, como São Paulo, valores de pH menores que 5,0 são atribuídos aos altos valores de gases nitrogenados e sulfonados que reagem com vapor de água na atmosfera, produzindo ácidos nítrico e sulfúrico (Forti *et al.* 2001, Fornaro & Gutz 2006). Os baixos valores do pH da água da chuva na região amazônica são influenciados pela emissão biogênica de ácidos orgânicos, mas as queimadas e transporte de poluentes de cidades próximas são também responsáveis pelo aumento da poluição (Honório *et al.* 2010).

1.2.3. Fatores de estresse oxidativo em plantas: ozônio e chuva ácida

Levitt (1980) definiu estresse como “qualquer fator ambiental potencialmente desfavorável para os organismos vivos” e adicionou considerações sobre o tempo de exposição e a capacidade de regeneração das plantas. Autores mais recentes, como Larcher (2000) e Lichtenthaler (2006), alteraram a definição do termo no sentido do estresse ser uma condição da planta e as alterações no ambiente que levam à esta condição serem descritas como fatores de estresse. Larcher (2000) propõe que o estresse é um “desvio significativo das condições ótimas para a vida, e induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis no princípio, mas podem se tornar permanentes”.

A resistência ao fator de estresse pode ser categorizada em duas estratégias: tolerar o fator de estresse ou evitá-lo (Levitt 1980, Bray *et al.* 2000). A tolerância implica que o fator de estresse agiu sobre o organismo, mas houve condições de prevenir ou reduzir os danos. Ao evitar o estresse,

a planta utiliza uma barreira (química, física ou metabólica) parcial ou completa à sua entrada. Ambas as estratégias são utilizadas pelas plantas para minimizar os efeitos dos agentes estressores.

Dentre os agentes estressores abióticos, destacam-se o ozônio (O_3) e chuva ácida pela geração de espécies reativas (ERs) que causam danos oxidativos à vegetação. O estresse oxidativo induz extravazamento de líquido celular, diminuição da fotossíntese e alterações hormonais que em conjunto levam à morte celular, colapso do mesofilo (necrose) e senescência foliar (Baier *et al.* 2005). A pressão contínua do fator de estresse sobre a vegetação a torna mais susceptível, de forma que os danos iniciados pelo estresse oxidativo podem ser evidentes até no nível de ecossistema (Bussotti & Ferretti 1998).

A absorção dos poluentes pela vegetação é dependente de suas características físicas e químicas. O O_3 , devido à sua natureza gasosa, alcança o interior da folha através dos estômatos e no ambiente úmido da câmara subestomática ou no mesofilo reage com a água e há formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Bray *et al.* 2000, Halliwell & Gutteridge 2007, Dizengremel *et al.* 2008). Já a chuva ácida, por ser composta de altas concentrações de íons, tais como H^+ , SO_4^{2-} , NO_3^- , adere facilmente no limbo foliar e destrói a cutícula, podendo alcançar até o mesofilo (Santa'Anna-Santos *et al.* 2006, Liu & Liu 2011), levando à formação de espécies reativas (ERs) de oxigênio e também à espécies de enxofre e nitrogênio (Halliwell & Gutteridge 2007).

As ERs, no geral, levam a à formação de $OH^{\bullet}$, o qual reage rapidamente com ácidos graxos insaturados das membranas tornando-os espécies radicalares (Halliwell & Gutteridge, 2007, Gill & Tuteja 2010). Os radicais lipídicos resultantes reagem com moléculas próximas e assim sucessivamente, criando um evento em cadeia. A reação só termina quando radicais lipídicos se encontram e geram dímeros estáveis (Gill & Tuteja 2010). Denomina-se este processo como peroxidação lipídica. A célula não possui mecanismos para retirada do $OH^{\bullet}$, por isso até que as reações da peroxidação lipídica cessem há danos extensos nas membranas celulares, alterando sua permeabilidade e causando extravazamento de líquido citoplasmático. Das reações são formados subprodutos como

alcanos, alcoóis, aldeídos (malondialdeído) os quais podem ser quantificados em ensaios enzimáticos e empregados como indicadores de peroxidação lipídica.

As ERs não são apenas geradas pela presença de poluentes no meio celular, são formadas nos processos fisiológicos normais da célula vegetal; como na fotossíntese e respiração nas cadeias de transporte de elétrons de cloroplastos e mitocôndria (Mittler *et al.* 2004). Baixas concentrações de algumas ERs são sinalizadoras para regulação gênica, fechamento estomático, crescimento da raiz, controle da mitose entre outros (Foyer & Noctor 2005). Em condições normais, sem fatores externos de estresse, a célula consegue reduzir a quantidade de ERs gerados internamente e regenerar o *pool* antioxidativo, há um equilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Por outro lado, o aumento repentino e prolongado de ERs pode causar déficit na regeneração e síntese de espécies antioxidantes.

1.2.4. Antioxidantes

Segundo Halliwell & Gutteridge (2007), antioxidantes são quaisquer substâncias que atrasam, removem ou previnam os danos oxidativos, ou seja, um fator de tolerância. Os antioxidantes moleculares principais em vegetais são ascorbato (AA), tocoferol, carotenoides, glutathiona (GSH); os enzimáticos são superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDAR), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR) entre outros.(Mittler *et al.* 2004, Gill & Tuteja 2010).

A detoxificação das ERs no citosol e organelas ocorre pela atuação conjunta de várias destas moléculas e enzimas, num ciclo conhecido como ascorbato-glutathiona (Figura 2) (Asada 1999, Mittler *et al.* 2004; Gill & Tuteja, 2010). A classe de enzimas SOD atua como primeira linha de defesa, onde o O_2^{*-} é desproporcionado à O_2 e H_2O_2 , o qual é menos reativo que O_2^{*-} .

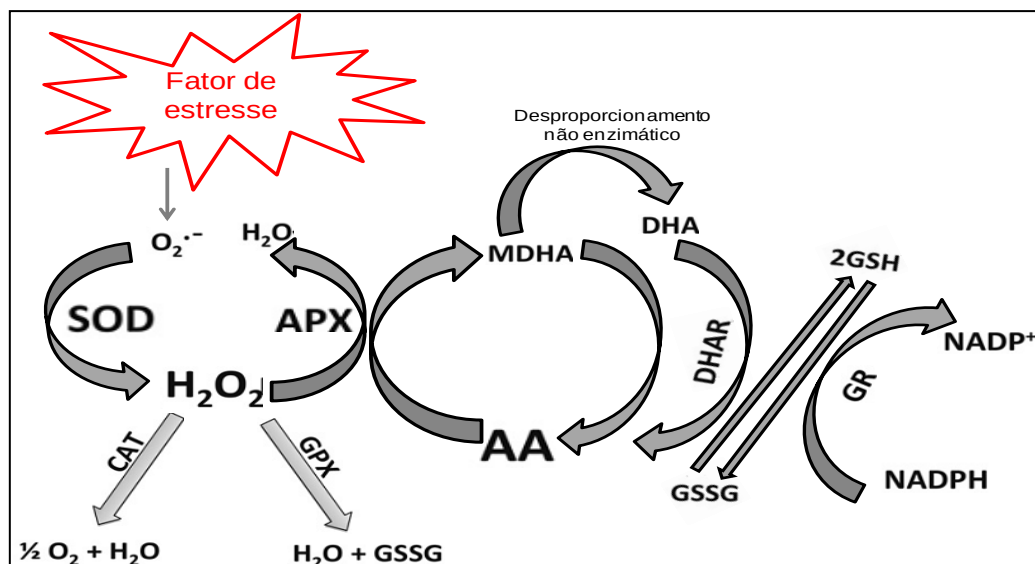


Figura 2. Ciclo ascorbato-glutationa. Adaptado de Gill & Tuteja (2010).

Uma maior gama de antioxidantes estão envolvidos na retirada do H_2O_2 . A catalase (CAT) possui alta taxa de conversão do H_2O_2 que chega à seis milhões de moléculas desproporcionadas por minuto (Gill & Tuteja 2010). A GPX utiliza a GSH como doadora de elétrons na detoxificação do H_2O_2 . A APX é um dos principais antioxidantes celulares por ter alta afinidade com o H_2O_2 e estar presente em diversas organelas (Mittler *et al.* 2004, Gill & Tuteja 2010). A reação de detoxificação resulta em H_2O e exige AA como doador de elétrons.

O ascorbato na forma oxidada (monodehidroascorbato – MDHA) perde sua função antioxidante, mas pode ser regenerado pela dehidroascorbato redutase (DHAR), a qual utiliza a GSH como doadora de elétrons. Por sua vez, a glutatona oxidada (GSSG) é regenerada pela GR utilizando NADPH como redutor (Smirnoff 1996).

O ciclo ascorbato-glutationa é essencial para manter o equilíbrio pro/antioxidante no meio celular. Sob condições adversas, há aumento de ERs em relação à quantidade ou atividade de antioxidantes pré-existente, exigindo um gasto energético maior que o normal para manter o ciclo ascorbato-glutationa em equilíbrio (Dizengremel *et al.* 2008). Se os danos excedem a capacidade fisiológica ocorre o estresse oxidativo e a produção das espécies antioxidantes é estimulada para combater esse estresse. Dentre todas as enzimas antioxidantes já mencionadas, as isoenzimas de SOD são as principais em atuar nas defesas antioxidantes e tem-se relato de que a resistência de muitas espécies

vegetais esteja relacionada com sua atividade (Tsang *et al.* 1991, Chernikova *et al.* 2000, Hwang *et al.* 2003).

Enzimas superóxido dismutase (SOD)

Por meio das reações de Haber-Weiss e Fenton, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) pode ser precursor do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), uma espécie reativa (ER) capaz de danificar biomoléculas e induzir a formação de outros radicais, além de não haver mecanismos celulares para sua detoxificação (Blokhina *et al.* 2003). Portanto, é imprescindível impedir que o $O_2^{\bullet -}$ permaneça muito tempo na região inter ou intracelular.

A classe de enzimas superóxido dismutase (SOD) é capaz de desproporcionar o $O_2^{\bullet -}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma molécula menos reativa, e oxigênio. Esta reação ocorre em velocidade dez vezes maior que em situação não catalisada pela SOD (Gill & Tuteja 2010).

São enzimas bastante conservadas evolutivamente, de modo que são ubíquas entre os seres aeróbicos (Alscher *et al.* 2002). Cada isoenzima possui um cofator metálico no sítio ativo responsável por receber e fornecer elétrons nas reações de desproporcionamento (Whittaker 2010) e são denominadas: ferro-SOD (FeSOD), manganês-SOD (MnSOD) e cobre/zincoSOD (Cu/ZnSOD). Observa-se que na Cu/ZnSOD, o Cu é o cofator e o Zn tem função estrutural.

FeSOD são encontradas em procariotos e eucariotos e é o grupo mais antigo destas isoenzimas, sendo encontradas predominantemente nos cloroplastos. Mudanças na atmosfera diminuíram a disponibilidade de Fe^{+2} e os seres vivos passaram a usar também um metal mais disponível para o sítio ativo: o Mn (Dražkiewics *et al.* 2007, Alscher *et al.* 2002).

As MnSOD provavelmente surgiram de SODs cambialísticas, ou seja, que aceitam Fe ou Mn no sítio ativo, que são encontradas ainda em bactérias. São encontradas em mitocôndrias e peroxissomos (Halliwell & Gutteridge 2007, Alscher *et al.* 2002).

As isoenzimas Cu/ZnSOD são mais recentes evolutivamente, pois apenas com abundância de oxigênio na atmosfera aumentou a concentração de Cu disponível. São encontradas em pero-

xissomos, cloroplastos, citosol e há evidências da presença na parede celular em *Pinus* (Schinkel *et al.* 1998).

Todas as SOD tem sua parte protéica codificada pelo material genético nuclear, após a síntese migram até as organelas de destino com o auxílio de moléculas chaperones, as quais garantem a correta reestruturação da proteína. Os metais cofatores são sequestrados por agentes quelantes e transportados até as organelas e então combinados à apo-proteína (Whittaker 2010). Apesar de algumas semelhanças entre as moléculas de SOD, a incorporação do metal errado no sítio ativo inibe a função antioxidante da molécula, por exemplo, a presença de Fe em uma apo-MnSOD impede que o radical livre chegue até o sítio ativo devido à mudança na coordenação do metal (Whittaker 2010). Alterações nutricionais como deficiência de Mn podem aumentar a permeabilidade da mitocôndria ao Fe, e este competir pelo sítio ativo enzimático, causando estresse oxidativo (Naranuntrar *et al.* 2009)

Uma relação entre a atividade da SOD e a exposição ao ozônio tem sido reportada em vários trabalhos (Chernikova *et al.* 2000, Calatayud *et al.* 2004, Bulbovas *et al.* 2007). Chernikova *et al.* (2000) mostraram que a cultivar de soja ‘Essex’ tolerante ao ozônio apresentou maior atividade de Cu/ZnSOD que a cultivar ‘Forrest’ sensível. Nota-se também que sob estresse, o incremento ou diminuição da atividade de cada isoenzima não é equivalente, ou seja, dependendo do fator de estresse uma organela é mais afetada que a outra e acaba por influenciar a isoenzima presente. Pitcher & Zilinkas (1996) mostraram que plantas de tabaco transgênicas para maior expressão de Cu/ZnSOD citosólica quando expostas ao ozônio aumentaram a atividade desta isoforma e diminuíram a incidência de danos foliares. Já, VanCamp *et al.* (1994) estudando plantas que expressam mais MnSOD ou Cu/ZnSOD e expostas ao ozônio mostraram que independente do tipo da isoenzima, a tolerância ao estresse é aumentada quando a atividade enzimática é maior no cloroplasto.

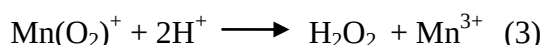
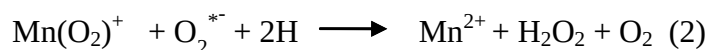
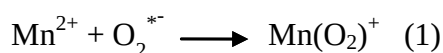
Poucos são os relatos sobre atividade das SOD em plantas sob chuva ácida. Neves *et al.* (2009) mostraram que plantas de *Eugenia uniflora* expostas à chuva ácida simulada diminuíram a atividade de SOD total e aumentaram peroxidases totais (POD). Contudo, aumento da atividade da

SOD em plantas *Cucumis sativus* foi reportado por Yu *et al.* 2002. Ambos os trabalhos mostraram que alterações na atividade da SOD não foram determinantes para a diminuição no surgimento de danos fisiológicos e anatômicos.

Miméticos da SOD

Dada a importância das superóxido dismutase (SOD) na resistência celular, buscou-se formas de utilizá-las no tratamento clínico (Doctrow *et al.* 2005). Porém, dificuldades em sua produção limitaram seu uso, levando às pesquisas para desenvolvimento de substâncias que mimetizam sua ação (Doctrow *et al.* 2005).

Devido ao manganês (Mn^{2+}) fazer parte da estrutura da MnSOD foi usado como uma das substâncias que mimetizam a ação da SOD (reações 1 a 3). Seu potencial mimético foi testado e comprovado em leveduras sob estresse oxidativo e que não expressavam Cu/ZnSOD (Sanchez *et al.* 2005). Este mesmo estudo mostrou que a suplementação com cobre ou ferro não levou à mesma resposta satisfatória do manganês.



Além do Mn^{2+} há relatos de várias moléculas com função mimética da SOD, tais como porfirina ($MnTE-2-PyP^{5+}$), Mn(III) salen (EUK-8), fulereno C_{60} , nitroxide tempol, metaphore (M40403), hidroxamato (MnDFB), entre outros (Benite *et al.* 2002, Munroe *et al.* 2007, Batinić – Haberle *et al.* 2010). Por exemplo, porfirina MnTM-PyP mostrou eficiência em recuperar *Escherichia coli* com apenas 3 μM , mas causou toxicidade quando adicionado 30 μM (Munroe *et al.* 2007), as bactérias *E. coli* foram recuperadas com EUK-8 e EUK-134 em concentrações acima de 100 μM , enquanto o crescimento da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* foi interrompido com 10 μM destes compostos (Munroe *et al.* 2007), já as leveduras *Schizosaccharomyces pombe* foram recuperadas

com EUK-8 e MnTE-2-PyP⁵⁺, mas não com cloreto de manganês (Stoica *et al.* 2011) e células de hamster sob estresse oxidativo foram totalmente recuperada com MnDFB (Hanh *et al.* 1991).

Entre todos os miméticos testados *in vivo*, apenas o MnDFB tem o complexante, a desferrioxamina-B, encontrado na natureza. Por este fato, espera-se que o MnDFB tenha uma melhor absorção e um menor grau de toxicidade em organismos vivos.

1.3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A produção da soja é concentrada no Cerrado e tem avançado rapidamente para regiões da floresta Amazônica impactadas pela poluição atmosférica. Nestas regiões, tem-se observado perdas agrícolas, e conseqüentemente mais desmatamento para compensar tais perdas podem surgir.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou testar o potencial do complexo manganês(III)-desferrioxamina B (MnDFB) como meio de aumentar a tolerância de *Glycine max* cv ‘Sambaíba’ ao estresse causado por poluição atmosférica em condições controladas. Para tal, dividiu-se o trabalho em duas etapas distintas; a) determinar a dose de MnDFB mais atuante nas defesas antioxidativas; b) verificar a ação da dose de MnDFB selecionada em plantas sob estresse oxidativo causado por ozônio e chuva ácida e comparar com a ação do Mn²⁺, o qual também apresenta efeito antioxidativo comprovado.

1.4. REFERÊNCIAS

- Alscher, R.G., Erturk, N. & Heath, L.S.** 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1331-1341.
- Artaxo, P.** 2004. A composição da atmosfera amazônica e suas implicações climáticas. *Boletim do Experimento de Grande Escala da Biosfera-Atmosfera na Amazônia (LBA)* 6(12): 5.
- Artaxo, P., Gatti, L.V., Leal, A.M.C., Longo, K.M., Freitas, S.R., Lara, L.L., Pauliquevis, T.M., Procópio, A.S. & Rizzo, L.V.** 2005. Química atmosférica da Amazônia: a floresta e as emissões de queimadas controlando a composição da atmosfera amazônica. *Acta Amazonica*, 35(2): 185-196.
- Asada, K.** 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 601-639.
- Ashmore, M.R.** 2005. Assessing the future global impacts of ozone in vegetation. *Plant, Cell and Environment*, 28: 949-964.
- Baier, M., Kandlbinder, A., Golldack, D. & Dietz, K-J.** 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signaling and response. *Plant, Cell and Environment*, 28: 1012-1020.
- Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Shanzer, A. & Libman, J.** 1992. Iron uptake by plants from microbial siderophores. *Plant Physiology*, 99: 1329-1335.
- Batinić-Haberle, I., Rebouças, J.S. & Spasojević, I.** 2010. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(6): 877-917.
- Benite, A.M.C.B. & Machado, S.P.** 2002. Sideróforos: “Uma resposta dos microorganismos”. *Química Nova*, 25(6B):1155-1164.
- Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, K.V.** 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91:179-194.
- Booker, F., Muntifering, R., McGrath, M., Burkey, K., Decoteau, D., Fiscus, E., Manning, W., Krupa, S., Chappelka, A., Grantz, D.** 2009. The ozone component of global change: potential effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with invasive species. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51 (4): 337-351.
- Braga, B., Hespanhol, I., Conejo, J.G.L., Mierzwa, J.C., Barros, M.T.L., Spencer, M., Porto, M., Nucci, N., Juliano, N. & Eiger, S.** 2006. Introdução à engenharia ambiental. O desafio do desenvolvimento sustentável. 2ed. Pearson Prentice Hall, São Paulo, 318p.
- Brasseur, G.P. & Chatfield, R.B.** 1991. The fate of biogenic trace gases in the atmosphere. In: Sharkey, T.D.; Holland, E.A. & Mooney, H.A. Trace Gas emission by plants. Academic Press, New York. 365p.

- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. In: B.B.Buchanan, W. Gruissen, R.L. Jones (eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, New York, pp.1158-1203.
- Bulbovas, P., Souza, S.R., Moraes, R.M., Luizão, F. & Artaxo, P.** 2007. Plântulas de soja Tracajá' expostas ao ozônio sob condições controladas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(5): 641-646.
- Bussotti, F. & Ferretti, M.** 1998. Air pollution, Forest condition and Forest decline in Southern Europe: an overview. *Environmental Pollution*, 101: 49-65.
- Calatayud, A., Iglesias, D.J., Talon, M. & Barreno, E.** 2004. Response of spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.) to ozone measured by gas exchange, chlorophyll a fluorescence, antioxidant systems, and lipid peroxidation. *Photosynthetica*, 42(1): 23-29.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental).** 2010. Qualidade do ar no Estado de São Paulo 2011. Série relatórios, São Paulo, 234p.
- Chernikova, T., Robinson, J.M., Lee, E.H. & Mulchi, C.L.** 2000. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynthesis Research* 64: 15–26.
- Cho, K., Tiwari, S., Agrawal, S.B., Torres, N.L., Agrawal, M., Sarkar, A., Shibato, J., Agrawal, G.K., Kubo, A. & Rakwal, R.** 2011. Tropospheric ozone and plants: absorption, responses, and consequences. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 212: 61-212.
- Chuang, G. & Singh, R.J.** 2008. Broadening the genetic base of soybean: A multidisciplinary approach. *Critical Reviews in Plant Science*. 27: 295-341.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento).** Levantamentos de safra. Disponível on-line em <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?>> Acesso em jun.2012.
- Culotta, V.C.** 2001. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Current Topics in cellular regulation*, 36: 117- 132.
- Dizengremel, P., Le Thiec, D., Bagard, M. & Jolivet, Y.** 2008. Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution*, 156: 11-15.
- Doctrow, S.R. , Baudry, M., Huffman, K., Malfroy, B., and Melov, S.** 2005. Salen-manganese complexes: multifunctional catalytic antioxidants protective in models for neurodegenerative diseases of aging in *Medicinal Inorganic Chemistry* (J. Sessler, S. R. Doctrow, T. McMurry, and S. Lippard, eds) American Chemical Society Symposium Series 903, ACS and Oxford University Press, pp. 319-347.
- Drażkiewics, M., Skórzyńska-Polit, E. & Krupa, Z.** 2007. The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. *Chemosphere*, 67:188-193.
- Dučić, T. & Polle, A.** 2005. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1): 103-112.

Emberson, L. 2003. Air pollution on crops and forests: an introduction. In: Emberson, L.; Ashmore, M.; Murray, F. (Ed.). Air pollutions on crops and forests, a global assessment. Singapore: Imperial College Press, pp.3-29.

Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) – Embrapa Soja. 2006. XXVII Reunião de pesquisa de soja da Região Central do Brasil. Documentos 275, 253p.

Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) – Embrapa Soja. 2011. Cultivares de soja. Regiões Norte e Nordeste do Brasil. Embrapa, Londrina-PR, 50p. Disponível on-line: < www.cnpso.embrapa.br/download/cultivares/norte_nordeste.pdf.> Acesso em jun.2012.

Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) – A soja no Brasil. Disponível on-line: < <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>> Acesso em jun.2012.

Esposito, M.P., Ferreira, M.L., Sant’Anna, S.M.R., Domingos, M. & Souza, S.R. 2009. Relationship between leaf antioxidants and zone injury in *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ under environmental conditions in São Paulo, SE – Brazil. Environmental Pollution, 43(3): 619-623.

FAO (Food and Agriculture Organization) - FAO Commodities and Trade Division, Basic Foodstuffs Service. The role of soybean in fighting world hunger. Disponível on-line em < http://www.fao.org/es/esc/common/ecg/125/en/The_role_of_soybeans.pdf> Acesso em 25.jun.2012.

Faulkner, K.M.; Stevens, R.D. & Fridovich, I. 1994. Characterization of Mn(III) complexes of linear and cyclic desferrioxamines as mimics of superoxide dismutase activity. Archives of Biochemistry and Biophysics, 310(2): 341-346.

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.

Fornaro, A. & Gutz, I.G.R. 2006. Wet deposition and related atmospheric chemistry in the São Paulo metropolis, Brazil. Part 3: Trends in precipitation chemistry during 1983-2003. Atmospheric Environment, 40: 5893-5901.

Forti, M.C., Carvalho, A., Melfi, A.J. & Montes, C.R. 2001. Deposition patterns of SO_4^{2-} , NO_3^- and H^+ in the Brazilian territory. Water, Air, and Soil Pollution, 130: 1121–1126.

Germer, S.; Neill, C.; Krusche, A.V.; Gouveia Neto, S.C. & Elsenbeer, H. 2007. Seasonal and within-event dynamics of rainfall and throughfall chemistry in an open tropical rainforest in Rondônia, Brazil. Biogeochemistry, 86:155–174.

Gill, S.S. & Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. 4ed. Oxford University Press., New York, pp. 1 – 851.

Hwang, C-S., Baek, Y-U., Yim, H-S. & Kang, S-O. 2003. Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. Yeast, 20: 929-941.

- Hahn, S.M., Krishna, C.M., Samuni, A., Mitchell, J.B. & Russo, A.** 1991. Mn(III)-Desferrioxamine superoxide dismutase-mimic: alternatives modes of action. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(1): 215-219.
- Hernlem, B.J., Vane, L.M. & Sayles, G.D.** 1996. Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations. *Inorganica Chimica Acta*, 244: 179-184.
- Honório, B.A.D., Horbe, A.M.C. & Seyle, P.** 2010. Chemical composition of rainwater in western Amazonia – Brazil. *Atmospheric Research*, 98: 416-425.
- Horn, A.J., Parrilha, G.L., Melo, K.V., Fernandes, C., Horner, M., Visentin, L.C., Santos, J.A.S., Santos, M.S., Eleutherio, E.C.A. & Pereira, M.D.** 2010. An iron-based cytosolic catalase and superoxide dismutase mimic complex. *Inorganic Chemistry*, 49: 1274-1276.
- IPNI (International Plant Nutrition Institute).** Como a planta de soja se desenvolve. Disponível on-line em < <http://www.ipni.net/ppiweb/BRAZIL.NSF> > Acesso em 29.junho.2012.
- Kirchhoff, V.W.J.H.** 1996. Increasing concentrations of CO and O₃. Rising deforestation rates and increasing tropospheric carbon monoxide and ozone in Amazonia. *Environmental Science and Pollution Research*, 3(4): 210-212.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137,
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Rima Artes e Textos, São Carlos, pp.341-478.
- Lehndorff, E. & Schwark, L.** 2009. Biomonitoring airborne parent and alkylated three-ring PAHs in the Greater Cologne Conurbation I: Temporal accumulation patterns. *Environmental Pollution*, 157(4): 1323-1331.
- Lei, Y., Korpelainen, H. & Li, C.** 2007. Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere*, 68: 686-694.
- Levitt, J.** 1980. *Plant responses to environmental stresses*. 2ed. Vol.1 e 2. Academic Press, New York, pp.3-470 e 3-607.
- Lichtenthaler, H.K.** 2006. The stress concept in plants: an introduction. *Annals of New York Academy of Sciences*, 851:187-198.
- Liu, E-U. & Liu, C-P.** 2011. Effects of simulated acid rain on the antioxidative system in *Cinnamomum philippinense* seedlings. *Water, Air and Soil Pollution*, 215: 127-135.
- Martins, P.R., Ramos, S.F., Dulley, R.D., Nogueira, E.A., Assumpção, R., Nogueira Júnior, S., Lacerda, A.L.S. & Barbosa, M.Z.** 2009. Impactos das nanotecnologias na cadeia de produção da soja brasileira. Xamã, São Paulo, 158p.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490-498.

- Morgan, P.B., Ainsworth, E.A. & Long, S.P.** 2003. How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield. *Plant, Cell and Environment*, 26: 1317-1328.
- Mulchi, C.L., Lee, E., Tuthill, K. & Olinick, E.V.** 1988. Influence of ozone stress on growth processes, yields and grain quality characteristics among soybean cultivars. *Environmental Pollution*, 53:151-169.
- Munroe, W., Kingsley, C., Durazo, A., Gralla, E.B., Imlay, J.A., Srinivasan, C. & Valentine, J.S.** 2007. Only one of a wide assortment of manganese-containing SOD mimicking compounds rescues the low aerobic growth phenotypes of both *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking superoxide dismutase enzymes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101: 1875-1882.
- Naranuntarat, A., Jensen, L.T., Pazici, S., Penner-Hahn, J.E. & Culotta, V.C.** 2009. The interaction of mitochondrial iron with manganese superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(34): 22633-22640.
- Nebel, B.J. & Wright, R.T.** 2000. *Environmental Science – Chapter 22 Atmospheric Pollution*. 7ed. Prentice Hall, New Jersey, 2000, 664p.
- Neubauer, U., Furrer, G. & Schulin, R.** 2002. Heavy metal sorption on soil minerals affected by the siderophore desferrioxamine B: the role of Fe(III) (hydroxides and dissolved Fe(III)). *European Journal of Soil Science*, 53: 45-55.
- Neves, N.R., Oliva, M.A., Centeno, D.C., Costa, A.C., Ribas, R.F. & Pereira, E.G.** 2009. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: potential use in environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 407: 3740-3745.
- Pitcher, L.H. & Zilinskas, B.A.** 1996. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiology*, 110: 583-588.
- Reddi, A.R., Jensen, L.T., Naranuntarat, A., Rosenfeld, L., Leung, E., Shah, R. & Culotta, V.C.** 2009. The overlapping roles of manganese and Cu/Zn SOD in oxidative stress protection. *Free Radical Biology & Medicine*, 46: 154–162.
- Resolução CONAMA nº 3 de 1990.** Publicada no DOU, de 22 de agosto de 1990, Seção 1, páginas 15937-15939. Disponível on line < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res90/res0390.html>.> Acesso em 20 novembro.2011.
- Rummel, U., Ammann, C., Kirkman, G.A., Moura, M.A.L., Foken, T., Andreae, M.O. & Meixner, F.X.** 2007. Seasonal variation of ozone deposition to a tropical rain forest in southwest Amazonia. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7: 5415-5435.
- Sanchez, R.J., Srinivasan, C., Munroe, W.H., Wallace, M.A., Martins, J., Kao, T.Y., Le, K., Gralla, E. B. & Valentine, J.S.** 2005. Exogenous manganous ion at millimolar levels rescues all known dioxygen-sensitive phenotypes of yeast lacking CuZnSOD. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10: 913-923.

- Sant'Anna-Santos, B.F., Silva, L.C., Azevedo, A.A. & Aguiar, R.** 2006. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(2): 313-321.
- Schinkel, H., Streller, S. & Wingsle, G.** 1998. Multiple forms of extracellular superoxide dismutase in needles, stem tissues and seedlings of Scots pine. *Journal of Experimental Botany*, 49(323): 931-936.
- Schulze, E.-D.; Beck, E. & Müller-Hohenstein, K.** 2005. *Plant Ecology*. Springer, Germany, 702p.
- Silva, L.C., Azevedo, A.A., Silva, E.A.M. & Oliva, M.A.** 2005. Effects simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Australian Journal of Botany*, 53: 789-796.
- Sinclair, T.R., Neumaier, N., Farias, J.R.B. & Nepumuceno, A.L.** 2005. Comparison of vegetative development in soybean cultivars for low-latitude environments. *Field Crops Research*, 92: 53-59.
- Smirnoff, N.** 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, United Kingdom, 78: 661-669.
- Srivastava, S. & Dubey, R.S.** 2011. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 64:1-16.
- Stoica, B.A., Rusu, M., Petreus, T. & Nechifor, M.** 2011. Manganese SOD mimics are effective against heat stress in a mutant fission yeast deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Biological Trace Element Research*, 144: 1344-1350.
- Tsang, W.T., Bowler, C., Herouart, D., Van Camp, W., Villarroel, R., Genetello, C., Van Montagu, M. & Inze, D.** 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell*, 3: 783-792.
- Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C. Van Montagu, M., Inzé, D., Reupold-Popp, P. Sandermann Jr., H. & Langebartels, C.** 1994. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Nature Biotechnology*, 12: 165-168.
- Van Dingenen, R., Dentener, F.J., Raes, F., Krol, M.C., Emberson, L. & Cofala, J.** 2009. The global impact of ozone on agricultural crop yields under current and future air quality legislation. *Atmospheric Environment*, 43:604-618.
- vanLoon, G.W. & Duffy, S.J.** 2005. *Environmental Chemistry: A global perspective*. 2ed. Oxford University Press, New York, 515p.
- Vingarzan, R.** 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment*, 38: 3431-3442.
- Wallace, J., Nair, P. & Kanaroglou, P.** 2010. Atmospheric remote sensing to detect effects of temperature inversions on sputum cell counts in airway diseases. *Environmental Research*, 110: 624-632.

- Wang, K-J., Li, X-H. & Liu, Y.** 2012. Fine-scale phylogenetic structure and major events in the history of the current wild soybean (*Glycine soja*) and taxonomic assignment of semi-wild type (*Glycine gracilis* Skvortz.) within the Chinese subgenus *Soja*. *Journal of Heredity*, 103(1): 13–27.
- Williams, M.R., Fisher, T.R. & Melack, J.M.** 1997. Chemical compositions and deposition of rain in the Central Amazon, Brasil. *Atmospheric Environment*, 31(2): 207-217.
- Whittaker, J.W.** 2010. Metal uptake by manganese superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 298–307.
- Yu, J-Q. & Ye, S-F. & Huang, L-F.** 2002. Effects of simulated acid precipitation on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzymes in *Cucumis sativus* L. *Photosynthetica*, 40(3): 331-335.

CAPÍTULO 2

Avaliação do efeito de diferentes doses de MnDFB na superóxido dismutase de *Glycine max* ‘Sambaíba’

2.1. INTRODUÇÃO

A desferrioxamina B (DFB) é uma substância natural que está presente no solo, secretada naturalmente por microorganismos como *Micromonospora*, *Nocardia* e *Streptomyces*, (Benite & Machado 2002) e tem a finalidade de capturar metais da rizosfera, facilitando a absorção de nutrientes para microorganismos e/ou para as raízes de plantas por meio da disponibilização de metais na forma insolúvel em formas solúveis, tais como íons livres e complexos metálicos (Boulkhalfa & Crumbliss *et al.* 2002, Benite & Machado 2002; Rajkumar *et al.* 2010). Caracteriza-se por ser um hidroxamato hexadentado e é considerado um poderoso agente complexante (Figura 3). Devido a sua alta afinidade por ferro, é denominado como sideróforo (Benite & Machado. 2002).

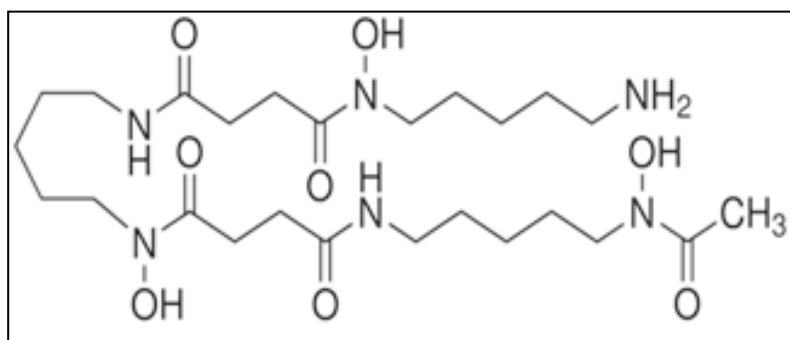


Figura 3. Molécula da desferrioxamina B composta por três hidroxamatos ($\text{O}=\text{C}-\text{NOH}$). Cada hidroxamato é capaz de formar duas ligações com o metal.

A DFB também tem alta afinidade por Mn, formando o complexo metálico (MnDFB) (Figura 4). O metal é ligado à molécula por três grupos hidroxamatos e é muito estável em soluções com pH variando entre 7 e 11,3 (Duckworth & Sposito 2005).

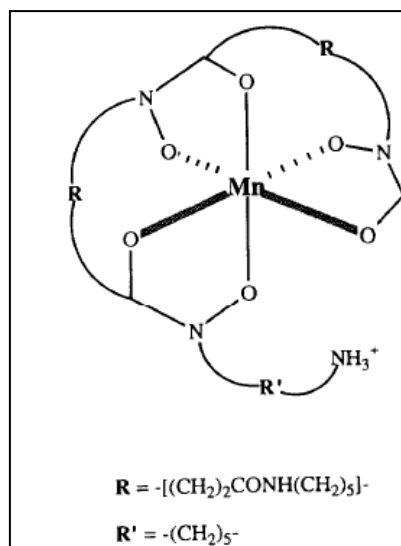


Figura 4. Estrutura do complexo Mn desferrioxamina-B (Faulkner *et al.* 1994).

Em meio ácido, o complexo se dissocia e tanto o Mn^{2+} quanto o DFB podem interferir, positiva ou negativamente, nos processos biológicos envolvidos no sistema pró-oxidante/antioxidante (Hanh *et al.* 1991, Hoyer & Porter 1993, Yoon *et al.* 2006, Lei *et al.* 2007).

O Mn^{2+} pode dismutar o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) assim como as enzimas de defesa, atuando como antioxidante (Halliwell & Gutteridge 2007). Em excesso é capaz de alterar a estrutura de cloroplastos (Lavres Junior *et al.* 2010), acarretar aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a um estresse oxidativo (Srivastava & Dubey 2011). Já o DFB, em condições naturais, pode se tornar um agente oxidante, aumentando as EROs e dificultando a divisão mitocondrial (Yoon *et al.* 2006). O DFB também impede que EROs sejam formados ao sequestrar metais livres em excesso (Souza-Santos *et al.* 2001).

Ao contrário do Mn^{2+} e DFB, não há estudos em seres vivos sobre efeito oxidante do MnDFB. Sua ação antioxidante foi comprovada em células de mamífero *ex vivo* submetidas à estresse oxidativo, em que a taxa de sobrevivência das células aumentou na presença de 500 μM do complexo (Hahn *et al.* 1991). Seu efeito antioxidante foi também observado *in vitro* devido ao consumo de $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Faulkner *et al.* 1994).

Em organismos vivos, o mecanismo pelo qual o MnDFB age como antioxidante ainda não é bem conhecido. Porém, sua ação pode ser devida à captação ou reoxidação dos metais atuantes nos processos redox ou agindo como facilitador de transporte/absorção de Mn. Contudo, acredita-se que sua principal ação seja por via direta no ciclo ascorbato-glutationa, o qual regula as EROs por meio de substâncias não-enzimáticas e enzimáticas (SOD, GR, APX; maiores detalhes no item 1.2.4). Neste ciclo, o MnDFB atuaria como mimético da SOD (Hahn *et al.* 1991) e poderia ativar as metaloenzimas SOD, as quais estão em organelas específicas: FeSOD nos cloroplastos, MnSOD nas mitocôndria e peroxissomos e Cu/ZnSOD no citosol, mitocôndria, cloroplastos, peroxissomos e parede celular (Gill & Tuteja 2010).

O efeito benéfico do MnDFB tem sido reportado em mamíferos sob estresse oxidativo, porém não há relatos de sua ação em espécies vegetais, tornando-se relevante investigar o seu potencial nestas espécies. Assim, nesse estudo o objetivo foi avaliar se o MnDFB influencia na atividade da SOD em plantas de *Glycine max* cv. ‘Sambaíba’ e verificar se dentre as doses de MnDFB aplicadas há alguma com maior potencial para aumentar a tolerância de soja, a qual será utilizada para testar a eficácia do complexo em plantas sob estresse.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Síntese do complexo MnDFB

O complexo MnDFB foi obtido através da reação entre MnCl_2 com o oxigênio atmosférico por 1h30min na presença de mesilato de desferrioxamina (DFB) (Novartis) em quantidades equimolares em água destilada. O pH da solução foi ajustado até 7,0-8,0 com hidróxido de sódio (NaOH) (constantes de dissociação do DFB a 25°C: $\text{pK}_1 = 8,30$, $\text{pK}_2 = 9,00$ e $\text{pK}_3 = 9,46$) (Faulkner *et al.* 1994; Farkas *et al.* 1997).

A síntese do complexo foi realizada pelo aluno de mestrado Thiago Andrade, o qual é orientado pelo Prof. Dr. Breno Pannia Esposito, chefe do Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).

2.2.2. Cultivo e exposição da soja

Os estudos foram conduzidos em casa de vegetação situada no Instituto de Botânica de São Paulo (IBt-SP/SMA) (23°38'28.8" S; 46°37'15.8" W; 805 m acima do nível do mar), durante o verão de 2010/2011. A casa de vegetação possui ar filtrado (filtros de carvão ativado, lã de vidro e papel) e temperatura controlada por meio de ar condicionado (Figura 5A).

As sementes de *Glycine max* cv. 'Sambaíba', doadas pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), foram germinadas em casa de vegetação. As plântulas foram transplantadas para vasos plásticos de 3L contendo substrato vegetal Tropstrato HT Hortaliças® (Viva Verde) e vermiculita média (Brasil Minérios), na proporção 3:1, umedecido com água destilada.

Os vasos foram apoiados em telas revestidas com plástico, sob as quais foram inseridos reservatórios de água de torneira (Figura 5B). Cordões de náilon comunicando o substrato ao reservatório garantiram irrigação constante (Arndt & Schweiger 1991). Após uma semana do transplante, à cada vaso foi adicionado 50 mL de solução de Hoagland.



Figura 5.. Cultivo das plantas de *Glycine max* ‘Sambaíba’. **A:** Casa de vegetação no Instituto de Botânica; **B:** Plantas de soja cultivadas dentro da casa de vegetação, apoiadas sobre tela e reservatório de água.

Durante todo o período de crescimento, foram medidas a temperatura, umidade relativa e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (Tabela 1). As medidas foram realizadas pela manhã, meio-dia e fim da tarde.

Tabela 1. Condições climáticas na casa de vegetação do Instituto de Botânica. Média e desvio-padrão dos dados em cada período.

Período de cultivo	Exposição	Temperatura (°C)			UR (%)			PAR ($\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$)		
		Manhã	Meio-dia	Tarde	Manhã	Meio-dia	Tarde	Manhã	Meio-dia	Tarde
15/11/2010-17/01/2011	1	22,9 ±1,1	27 ±3,8	26,3 ±4,0	71,7 ±8,7	61,1 ±12,0	57,7 ±12,1	148,1 ±77,2	443,2 ±340,8	315,6 ±259,7
23/12/2010 - 04/02/2011	2	22,7 ±1,7	26,6 ±2,9	34,0 ±6,4	80,8 ±11,7	58,9 ±10,9	47,3 ±2,7	106,3 ±67,9	494,3 ±340,6	531,3 ±479,3
30/12/2010 - 14/02/2011	3	22,6 ±1,6	28,4 ±3,6	34,3 ±6,0	80,1 ±11,9	55,1 ±9,2	45,9 ±3,7	114,8 ±76,1	495,1 ±306,5	481,8 ±411,6

A faixa de concentração de MnDFB a ser testada foi definida baseado em estudos de toxicidade e deficiência devido ao manganês. Ao observar a morfologia da folha, anatomia, crescimento e biomassa foi visto que adição de concentrações de solução de manganês abaixo de 2 μM levam à deficiência, acima de 8 μM à leve toxicidade e acima de 200 μM sintomas severos na planta (Lavres Junior *et al.* 2007, Lavres Junior *et al.* 2008, Lavres Junior *et al.* 2010). Portanto, a dose de MnDFB adicionada não pode exceder os limites de toxicidade para o metal.

Plantas foram tratadas com 2, 4 ou 8 μM de MnDFB, e receberam uma única dose de 50 mL de MnDFB (número amostral de 4 por tratamento). As plantas controle receberam 50 mL de água deionizada. As soluções foram aplicadas no estágio vegetativo da soja (V7-V9), baseado na escala de Fehr *et al.* 1971, onde considera a fase vegetativa (V) seguida pela indicação numérica do último nó, contados a partir da folha unifoliada (maiores detalhes no item 1.2.1).

Desde o acréscimo da solução de MnDFB, foi monitorado diariamente o aparecimento de clorose, necrose, senescência etc. Após três dias, foram realizadas medidas biométricas, coleta de folhas para análise de peroxidação lipídica e antioxidantes. Também foram coletadas folhas e raízes para quantificação de metais e medidas de biomassa.

O experimento foi repetido três vezes no período entre o novembro/2011 e fevereiro/2012.

2.2.3. Procedimentos e Análises

Biometria

Foram medidos a altura do caule considerando desde o solo até a gema apical e o diâmetro na região do primeiro entre-nó, e contados o número de folíolos expandidos antes da aplicação do MnDFB. Terminado o período de exposição, estes parâmetros foram novamente avaliados.

A diferença destes parâmetros entre o início e término do experimento foi calculada pela taxa de crescimento relativo (TCR), assim as plantas poderiam ser comparadas independentemente do tamanho inicial.

A taxa de crescimento relativo foi calculada pela fórmula (Benincasa 2003):

$$TCR = [Ln(Tf) - Ln(Ti)] / \Delta T$$

Onde, Tf representa a medida final, Ti a medida inicial e ΔT representa o intervalo de tempo em horas.

Ensaio bioquímicos

Extração da ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) total

APX e SOD foram extraídas na mesma solução de extração de acordo com o método descrito em Dias *et al.* 2011. Partes de folhas de toda a planta (0,3 g) foram homogeneizadas com o tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0), Triton (0,05%), polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) e ácido ascórbico (1 mM). Após a centrifugação, a amostra foi dividida em duas alíquotas para determinação de atividade de SOD e APX em espectrofotômetro.

Atividade da APX

A atividade da APX foi analisada por espectrofotometria em 290nm seguindo um decréscimo da absorbância, de acordo com método de Reddy *et al.*(2004) com modificações.

A oxidação do ácido ascórbico foi medida por 120s, a cada 5s, e sua taxa de consumo foi determinada durante a fase linear da reação.

A mistura de reação foi composta por tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,0), EDTA (1 mM), ácido ascórbico (5 mM), peróxido de hidrogênio (2 mM) e 300 µL de extrato foliar. A mistura do tampão com o EDTA foi mantida em 30 °C e apenas no momento da leitura foram adicionados os outros reagentes.

Atividade da SOD total

A solução para o ensaio enzimático foi preparada com tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,0), EDTA (0,4 mM), metionina (1 mM), extrato foliar (100 µL), nitroblue tetrazolium (NBT) (5 mM), e riboflavina (1 mM). A reação ocorreu sob fonte luminosa fluorescente de 80 W por 30min. Concomitantemente à reação sob fonte luminosa, um conjunto de tubos contendo toda a solução de reação e amostra foi mantida no escuro. A atividade da enzima foi lida em espectrofotômetro a 560 nm (Shimadzu UV-1800), por meio de comparação da mudança de cor da mistura de reação entre as amostras iluminadas e não iluminadas.

A riboflavina utilizada nesta reação é rapidamente reduzida quando iluminada na presença de metionina, reage com o oxigênio (O_2) para gerar ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O $O_2^{\bullet-}$ reduz o NBT, o qual é amarelo, originando o formazan, que possui coloração azul, resultando em uma solução de coloração esverdeada. Por outro lado, a SOD proveniente da amostra vegetal interrompe a formação do formazan quando reage com $O_2^{\bullet-}$ (Fridovich 1972, Halliwell & Gutteridge 2007) mantendo a coloração da solução inicial.

Ainda, misturas preparadas sem o extrato foliar, expostas e não expostas à luz, serviram como branco. Foi considerada 1 unidade de SOD a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do NBT.

Atividade das isoenzimas da SOD

Para quantificação de proteína e atividade de SOD em gel, a extração foi realizada em tampão fosfato de potássio 100 mM na proporção de 1 g de material vegetal para 3 mL de tampão, mais aproximadamente 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVPP). O homogeneizado é centrifugado à 10000 rpm por 30min a 4°C.

A concentração de proteína foi determinada segundo método de Bradford (1976), utilizando kit da BioRad, e soro de albumina bovina como padrão, em espectrofotômetro (595 nm).

A atividade da SOD foi analisada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante (PAGE) 12%, utilizando sistema de mini-gel (BioRad). A concentração de proteína em cada poço foi de 0,045 mg. Como controle positivo do teste foi adicionado ao gel 1 unidade de SOD hepática bovina. A eletroforese foi conduzida a 4°C e foi aplicada uma corrente constante de 20 mA/gel. Após a saída completa do tampão de amostra do sistema, a eletroforese foi conduzida por mais 40 min. O princípio da reação para determinação da atividade em gel é o mesmo descrito para atividade em espectrofotômetro. O tetrametil diaminoetileno (TEMED) adicionado à mistura de reação do gel catalisa a redução da riboflavina (Brune *et al.* 2006).

Todo o gel foi exposto à luz e na presença de SOD, ocorre menor formação de formazan e o gel fica claro. Na ausência de SOD, ou menor atividade, há redução do NBT à formazan e o gel fica escuro. A variação de cores gera bandas claras onde há SOD, e é possível avaliar diferença na atividade em decorrência de maior ou menor brilho de cada banda.

O gel foi lavado em água deionizada e incubado na mistura de reação por 30 min, contendo 0,1 mM NBT, 1 mM EDTA, 3% TEMED, 70 ml tampão fosfato de potássio pH 7,8 e 0,05 mM riboflavina. Após lavagem, o gel mergulhado em água foi exposto a luz até que as bandas de SOD ficassem evidentes por revelação negativa. A reação foi interrompida com uma solução 6% de ácido acético.

Para determinação das isoenzimas de SOD, utilizou-se o método de inibição com KCN e H₂O₂. MnSOD é resistente a ambos inibidores, FeSOD é resistente ao KCN e inibida por H₂O₂, e Cu/ZnSOD é inibida por ambos. Assim, através de exclusão de bandas foi possível diferenciar as isoenzimas de SOD (Ferreira *et al.* 2002).

O gel contendo apenas uma amostra foi dividido em três partes, onde a primeira foi revelada com a mistura de reação contendo riboflavina e NBT. Cada uma das partes restantes foi incubada em solução de KCN ou H₂O₂ por 20 min, depois lavadas, incubadas na mistura de reação por 30 min e expostas à luz.

Os experimentos para averiguar a atividade das isoenzimas em gel foram realizados no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas, chefiado pelo Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, no Departamento de Genética da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

Peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada através da concentração do malondialdeído (MDA) complexado com o ácido tiobarbitúrico. O material vegetal (300 g) foi macerado em 1,3 mL de ácido tricloroacético (0,1%), contendo aproximadamente 20% de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado, digerido com uma mistura de ácido tiobarbitúrico e tricloroacético a 95°C

por 30 min, após foi colocado em banho de gelo, a fim de clarear a amostra, e o sobrenadante foi novamente centrifugado (Heath & Packer 1968, com modificações).

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 532 e 600 nm (Hodges *et al.* 1998) e a concentração de MDA estimada segundo Heath & Packer (1968):

$$\text{MDA} = \{ [(A532 - A600) / 155000] 10^6 \} / \text{Massa Fresca}$$

Quantificação de metais nas folhas e raízes

Após secagem em estufa (70°C) e pesagem, as raízes e folhas foram triturados e digeridos em ácido nítrico e perclórico (4:1) até 210°C (Malavolta *et al.* 1997). A digestão foi considerada completa quando surgiu uma fumaça densa e branca proveniente do ácido perclórico e com a obtenção de um líquido translúcido e homogêneo, quando aquecido. O líquido restante foi avolumado para 20 mL com água deionizada (Filtro Sartorius/ Arium®61316 e Ultrapurificador Gehaka), após foi filtrado em Millex GV com membrana em PVDF (0,22 µm de poro, 33 mm de diâmetro) para retirada de silicatos.

Concomitantemente, foram adicionados dois tubos de ensaio apenas com os ácidos, como controle do método para contaminação.

Foi determinada a concentração dos metais ferro (Fe), manganês (Mn) e cobre (Cu) utilizando espectrofotômetro de absorção atômica em chama (Shimadzu AA-6300), nos comprimentos de onda 248,3 nm, 279,5 nm e 324,7 nm, respectivamente para cada metal.

Análise estatística

Diferenças entre os tratamentos foram determinadas pela análise de variância One-way Anova para verificar diferenças significativas entre as médias. Quando os dados não passaram na normalidade, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis Anova on Ranks. Quando houve necessidade, os

dados foram transformados (log10 ou rank). Foram considerados significativos os valores de $P \leq 0,05$. Para estas análises foi utilizado o software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc.).

2.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de soja tratadas com as diferentes concentrações de MnDFB não apresentaram sintomas visíveis característicos de toxicidade de Mn. Este fato já era esperado uma vez que as concentrações aplicadas nesse estudo foram inferiores as comprovadamente tóxicas. De acordo com Lavres Júnior *et al.* (2008) apenas concentrações superiores a 200 μM de Mn são capazes de provocar alterações visíveis no limbo foliar de cultivares de soja.

A taxa de crescimento relativo (TCR) em altura e diâmetro do caule não mostrou diferença significativa entre o tratamento com MnDFB e o controle (Figura 6A e 6B). Por outro lado, a TCR em número de folíolos aumentou nas plantas submetidas ao tratamento com MnDFB em relação ao controle ($P < 0,001$) (Figura 6C), indicando que o MnDFB poderia atuar de alguma forma nos processos destinados ao crescimento. Enquanto o número de folíolos aumentou, os valores de massa foliar fresca e seca não mostraram diferença significativa ($P > 0,05$) na comparação entre todos os tratamentos, portanto, pode-se concluir que as folhas ficaram mais leves. Este resultado pode inferir que houve uma ação do MnDFB no estágio de desenvolvimento foliar. Além do papel catalítico na SOD e outras enzimas, o Mn é requerido no processo de quebra de moléculas de água durante a fotossíntese (Hänsh & Mendel 2009), por isso é possível que o aporte extra de manganês pelo MnDFB interfira no número de folhas devido à própria função fotossintética destes órgãos.

Embora seja de conhecimento que tanto Mn^{2+} (Shi *et al.* 2005, Srivastava & Dubey 2011) quanto o DFB (Yoon *et al.* 2006) livre podem causar estresse oxidativo e, conseqüentemente, aumentar as taxas de malondialdeído (MDA), não há relatos da ação oxidante do MnDFB. Assim como o MDA (Figura 7), nenhuma alteração da atividade da APX (Figura 8) e da SOD total (Figura 9) foi observada entre os tratamentos e o controle, demonstrando que as plantas tratadas com MnDFB nas concentrações avaliadas não elevaram os níveis das ERs de forma a causar estresse oxidativo.

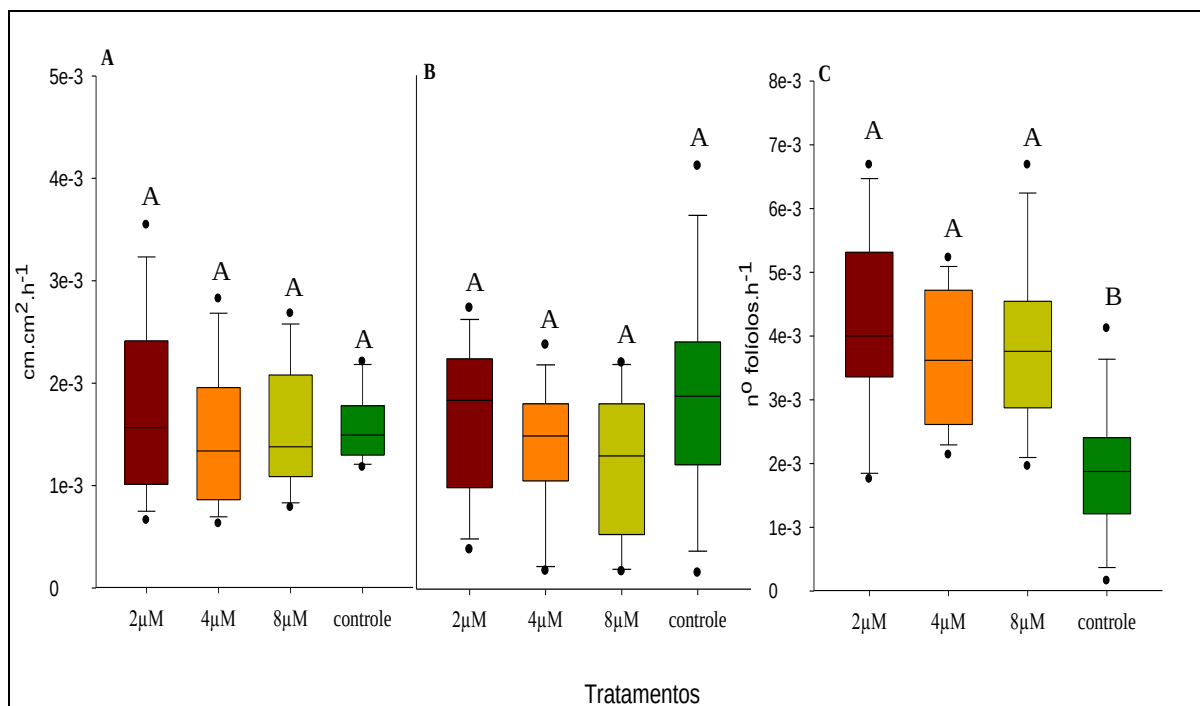


Figura 6. Comparação da taxa de crescimento relativo dos órgãos aéreos de *Glycine max* entre tratamentos com MnDFB e controle . **A:** TCR em altura do caule ($\text{cm.cm}^2.\text{h}^{-1}$). **B:** TCR em diâmetro do caule ($\text{cm.cm}^2.\text{h}^{-1}$). **C:** TCR em número de folíolos ($\text{n}^\circ\text{folíolos.h}^{-1}$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

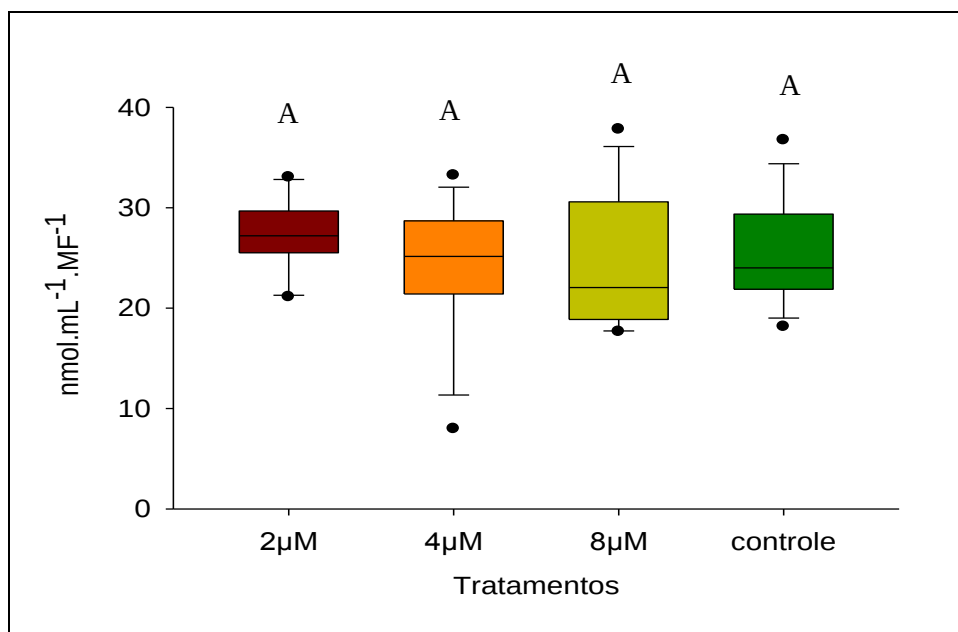


Figura 7. Concentração de malondialdeído (MDA) ($\text{nmol.mL}^{-1}.\text{MF}^{-1}$) nas folhas. As letras maiúsculas distintas representam diferença estatística dentre os tratamentos e com o controle ($P \leq 0,05$).

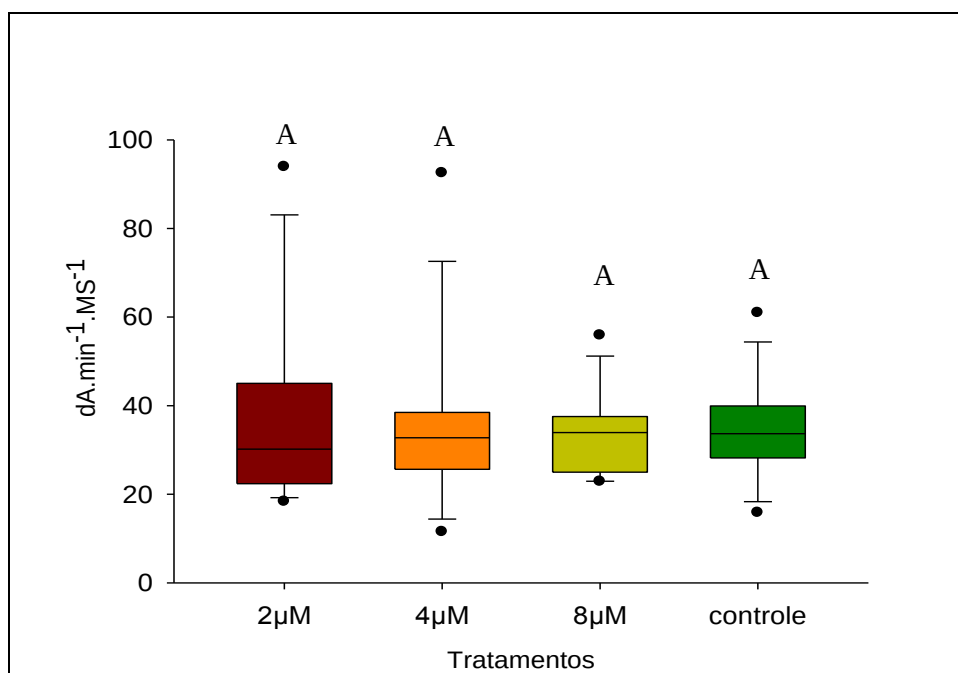


Figura 8. Atividade da ascorbato peroxidase (APX) ($\text{dA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{MS}^{-1}$) nas folhas. As letras maiúsculas distintas representam diferenças dentre os tratamentos e com o controle ($P \leq 0,05$).

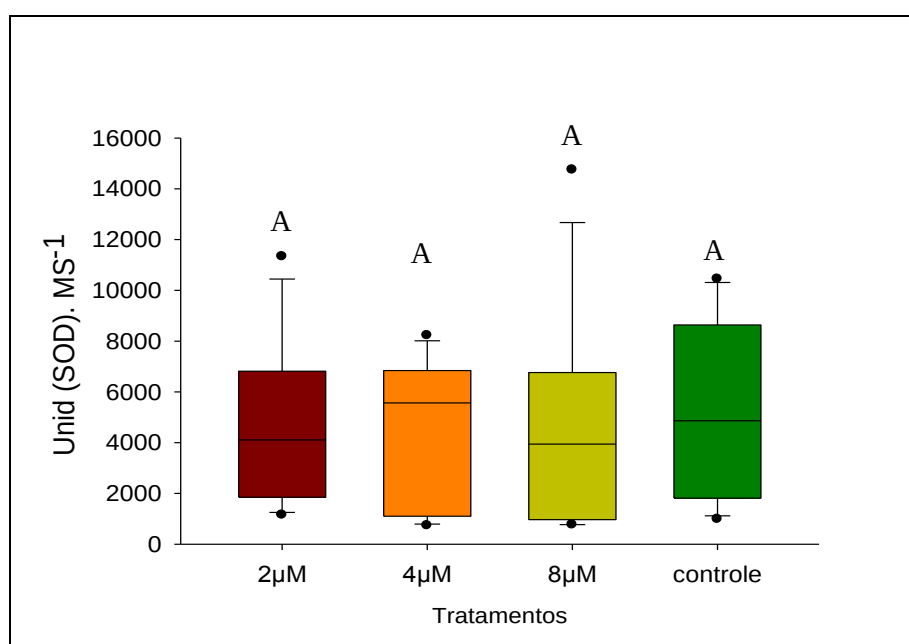


Figura 9. Atividade total das superóxido dismutase (SOD) ($\text{Unid [SOD]. MS}^{-1}$) nas folhas. As letras maiúsculas distintas representam diferença estatística dentre os tratamentos e com o controle ($P \leq 0,05$).

Estudos sobre a atividade de complexos de manganês em organismos simples como leveduras e bactérias revelaram que alguns complexos induzem ao estresse, reduzindo o crescimento, en-

quanto outros protegem e recuperam o organismo do estresse a que foi submetido (Sanchez *et al.* 2005, Munroe *et al.* 2007, Stoica *et al.* 2011).

No presente estudo, as plantas de soja tratadas com MnDFB apresentaram elevada TCR de folíolos e principalmente os indicadores de estresse oxidativo não se alteraram, de forma que pode-se supor que as concentrações investigadas de MnDFB não acarretaram efeitos oxidativos danosos ao meio celular. Sua ação foi testada nesse trabalho também por meio da avaliação das isoenzimas de SOD (Figura 10), em que os resultados indicaram que todas as concentrações testadas apresentaram ação do MnDFB em plantas de soja.

A análise de SOD em gel revelou doze bandas de isoformas e todas as isoenzimas – MnSOD, FeSOD e Cu/ZnSOD – foram identificadas nesta cultivar (Anexo 1). A análise visual do gel mostrou alta atividade de MnSOD, FeSOD e Cu/ZnSOD nos tratamentos com MnDFB em relação ao controle (Figura 10).

Os complexos miméticos da SOD para serem efetivos precisam agir ou sequestrando o O_2^{*-} em organelas específicas sem alterar a atividade SOD ou aumentando a atividade da SOD, que por consequência impediria o excesso de O_2^{*-} (Keaney *et al.* 2004). Há indícios que o efeito antioxidativo de alguns complexos de manganês nem sempre está ligado à ação mimética da SOD (Munroe *et al.* 2007, Batinić-Haberle *et al.* 2010). Neste trabalho houve maior atividade das isoenzimas SOD na presença do MnDFB, indicando que o complexo pode ter atuado como mimético. Ainda, o complexo não desencadeia um processo oxidativo, já que não houve diferença significativa no MDA e APX entre as plantas tratadas com MnDFB e controle.

O MnDFB pode ser facilitador do transporte do metal, e este atue não apenas como mimético da SOD, mas também como agente antioxidante sequestrador de metais (Hahn *et al.* 1991) ou aumente a disponibilidade de cofator para as SOD. A codificação das apoenzimas SOD são reguladas pelo metal cofator correspondente e sabe-se que há competição pela absorção e sítio ativo entre os íons Fe^{2+} e Mn^{2+} , tanto que o aumento de Fe diminui a formação da MnSOD e o contrário também poderia ocorrer (Culotta *et al.* 2005). Neste sentido, o aumento na atividade da FeSOD e

Cu/ZnSOD foi inesperado nas plantas tratadas com MnDFB (Figura 10), já que estas receberam tratamento onde apenas o íon Mn^{2+} é disponibilizado. Estes resultados sugerem que houve dissociação parcial do MnDFB no meio, disponibilizando Mn^{2+} para formação de MnSOD e DFB como facilitador de transporte de Fe^{2+} e Cu^{2+} , os quais são cofatores de FeSOD e Cu/ZnSOD, respectivamente. Há que se ressaltar que ao complexar íons os Fe^{2+} e Cu^{2+} , a DFB impede que estes metais participem de reações redox que podem levar à formação de OH^* e desencadear peroxidação lipídica. A dissociação parcial do MnDFB em Mn^{2+} e DFB, também poderia alterar a homeostase entre os micronutrientes absorvidos pelas raízes e disponibilizados entre os compartimentos celulares. Portanto, conhecer a variação de metais nos diferentes órgãos da planta é fundamental para se avaliar o mecanismo de ação antioxidante do MnDFB em espécies vegetais.

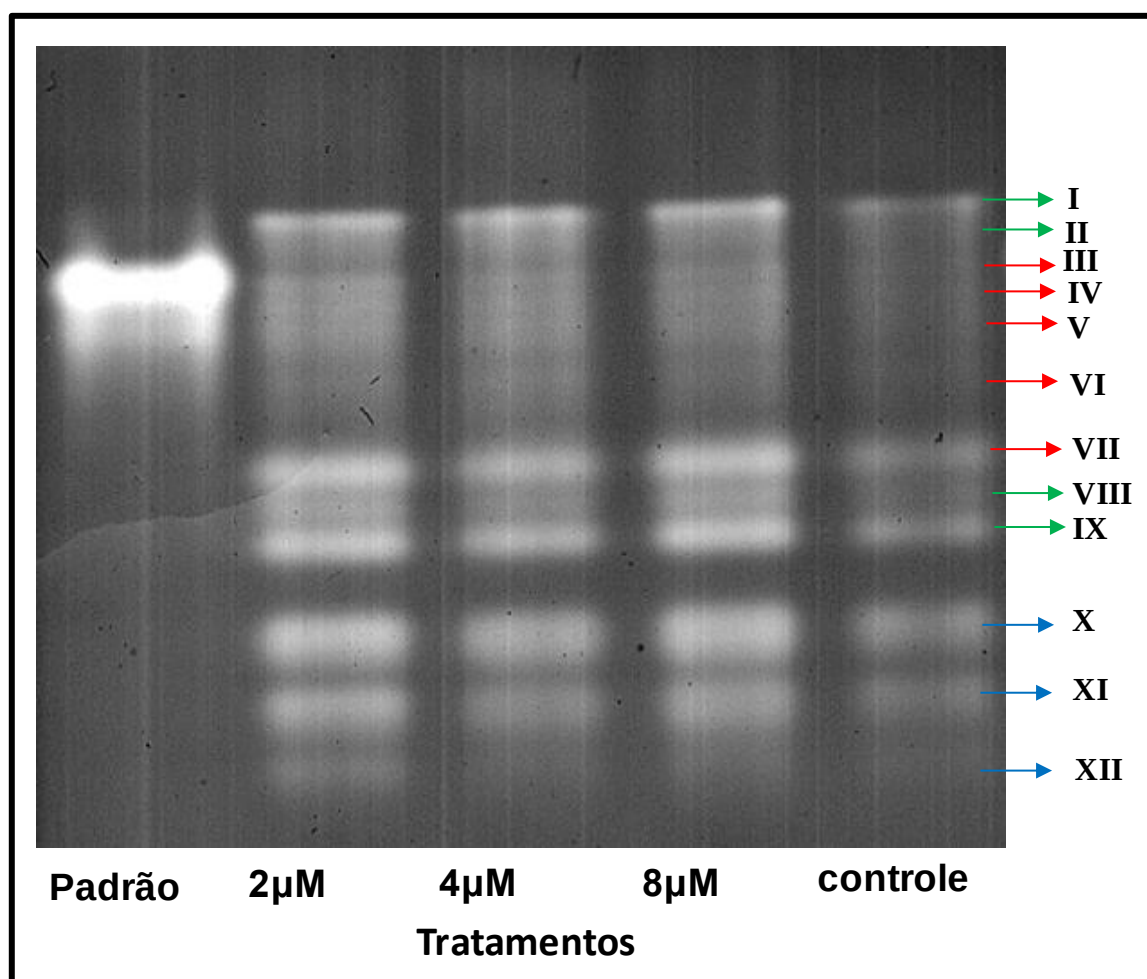


Figura 10. Atividade de isoenzimas de superóxido dismutase (SOD) em gel de poliacrilamida. As bandas numeradas I, II, VIII e IX indicam isoformas de MnSOD; III a VII, FeSOD; X a XII as, Cu/ZnSOD.

Neste estudo, não houve alteração na concentração de Cu ou Fe nas folhas (Figura 11A) entre os tratamentos com MnDFB e o controle. Porém, nas raízes a concentração de Cu e Fe diminuiu em plantas tratadas com 8 μ M de MnDFB relação ao controle (Figura 11B). Comparando os resultados de Cu e Fe nas folhas e na raiz, sugere-se que houve sequestro dos metais na raiz por DFB dissociado do MnDFB no meio radicular, corroborando com os resultados de aumento na atividade das isoenzimas Cu/ZnSOD e FeSOD. Ainda, a variação na concentração de Fe e Cu na raiz em função do tratamento pode ter sido influenciada pelo Mn livre disponibilizado pelo complexo, já que a mobilização dos metais é também regulada pelos níveis de metais livres em solução (Izaguirre-Mayoral & Sinclair 2005, Haydon & Cobbett 2007). O aumento da concentração destes metais nas folhas pode não ter sido observado devido ao método não apresentar limite de detecção suficiente para registrar baixas variações de concentração.

Com relação ao Mn nas folhas (Figura 11A), foi observado alteração significativa de sua concentração nos tratamentos com 2, 4 e 8 μ M em relação ao controle. A concentração de Mn na raiz não mostrou diferença significativa entre os tratamentos e o controle. Portanto, o aumento na concentração de Mn nas folhas e a ausência de alteração de seus níveis na raiz indica que o aporte de manganês nas folhas deve ser oriundo do complexo MnDFB.

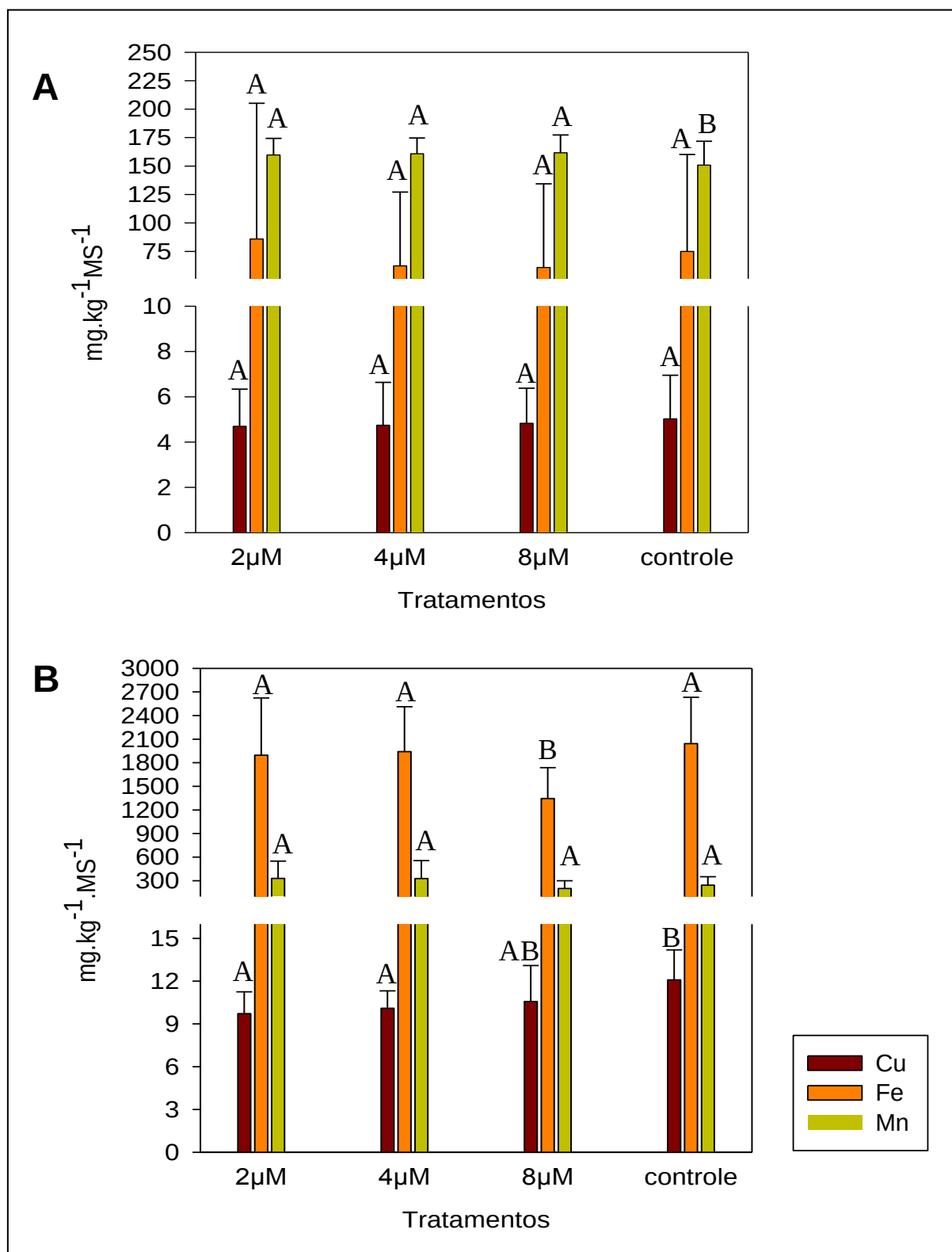


Figura11. Concentração de micronutrientes nas folhas em cada tratamento (mg.kg⁻¹.MS⁻¹). **A:** Cu, Fe e Mn nas folhas; **B:** Cu, Fe e Mn nas raízes. As letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos para cada metal.

2.2.5. CONCLUSÃO

O complexo MnDFB em baixas concentrações é capaz de alterar a bioquímica celular aumentando a atividade das isoenzimas MnSOD, FeSOD, CuZnSOD que pode ser indício de que houve aumento nas defesas antioxidativas. Muitos estudos correlacionam o aumento da atividade de isoenzimas específicas com a tolerância a fatores de estresse, assim o presente estudo sugere que o MnDFB ao aumentar a atividade de isoenzimas SOD possa aumentar a tolerância ao estresse oxidativo. Ainda, a concentração de 8 μ M de MnDFB parece ser a mais eficiente no aumento da atividade das isoenzimas SOD, por facilitar o transporte de todos os metais cofatores da raiz para as folhas .

2.2.6. REFERÊNCIAS

- Arndt, U. & Schweiger, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Ellemberg, H., Arndt, U., Brettheuer, B., Ruthsatz, B. & Steubing, L. (eds). Biological monitoring: Signals from the environment. Eschborn: Vieweg Sons, pp. 199-298.
- Batinić-Haberle, I., Rebouças, J.S. & Spasojević, I.** 2010. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(6): 877-917.
- Benite, A.M.C.B. & Machado, S.P.** 2002. Sideróforos: Uma resposta dos microorganismos. *Química Nova*, 25(6B):1155-1164.
- Benincasa, M. M. P.** Análise de crescimento de plantas: Noções básicas. 2ª ed. Funep, 2003. 41p.
- Boukhalfa, H. & Crumbliss, A.L.** 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* 15: 325–339.
- Bradford, M.M.** 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analitical Biochemistry*. 72: 248–254
- Brune, W., Alfenas, A.C. & Junghans, T.G.** 2006. Identificações específicas em enzimas em géis. In: Alfenas, A.C. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos. Editora UFV, 627p.
- Chevreux, S., Roudeau, S., Frayse, A., Carmona, A. et al.** 2009. Multimodal analysis of metals in copper–zinc superoxide dismutase isoforms separated on electrophoresis gels. *Biochimie*, 91: 1324–1327.
- Culotta, V.C.** 2001. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Current Topics in cellular regulation*, 36: 117- 132.
- Culotta, V.C., Yang, M. & Hall, M.D.** 2005. Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(7): 1159-1165.
- Dias, A.P.L., Dafré, M., Rinaldi, M.C.S. & Domingos, M.** 2011. How the redox state of tobacco ‘Bel-W3’ is modified in response to ozone and other environmental factors in a sub-tropical area? *Environmental Pollution*, 159:458-465.
- Duckworth, O.W. & Sposito, G.** 2005. Siderophore-manganese(III) interactions. I. Air-oxidation of manganese(II) promoted by desferrioxamine B. *Environmental Science & Technology*, 39: 6037-6044.
- Esposito, M.P., Ferreira, M.L., Sant’Anna, S.M.R., Domingos, M. & Souza, S.R.** 2009. Relationship between leaf antioxidants and zone injury in *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ under environmental conditions in São Paulo, SE – Brazil. *Environmental Pollution*, 43(3): 619-623.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) – Embrapa Soja** . 2011. Cultivares de soja. Regiões Norte e Nordeste do Brasil. Embrapa, Londrina-PR, 50p. Disponível on-line: < www.cnpso.embrapa.br/download/cultivares/norte_nordeste.pdf.> Acesso em jun.2012.

- Farkas, E., Csóka, H., Micera, G. & Dessi, A.** 1997. Copper(II), nickel(II), zinc(II), and molybdenum(VI) complexes of desferrioxamine B in aqueous solution. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 65(4): 281-286.
- Faulkner, K.M.; Stevens, R.D. & Fridovich, I.** 1994. Characterization of Mn(III) complexes of linear and cyclic desferrioxamines as mimics of superoxide dismutase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310(2): 341-346.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., Burmood, D.T. & Pennington, J.S.** 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11(6): 929-931.
- Ferreira, R.R., Fornazier, R.F., Vitória, A.P., Lea, P.J. & Azevedo, R.A.** 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition*, 25(2): 327-342.
- Fridovich, I.** 1972. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annals of Chemical Research*, 5(10): 321-326.
- Gill, S.S. & Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.** 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4ed. Oxford University Press., New York, pp. 1 – 851.
- Hahn, S.M., Krishna, C.M., Samuni, A., Mitchell, J.B. & Russo, A.** 1991. Mn(III)-Desferrioxamine superoxide dismutase-mimic: alternatives modes of action. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(1): 215-219.
- Hänsh, R. & Mendel, R.R.** 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12:259-266.
- Haydon, M.J. & Cobbett, C.S.** 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist*, 174: 499-506.
- Heath, R.L. & Packer, L.** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acids peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125(1): 189-198.
- Hodges, M., DeLong, J.M., Forney, C.F. & Prange, R.K.** 1998. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604-611.
- Honório, B.A.D., Horbe, A.M.C. & Seyle, P.** 2010. Chemical composition of rainwater in western Amazonia – Brazil. *Atmospheric Research*, 98: 416-425.
- Hoyes, K.P. & Porter, J.B.** 1993. Subcellular distribution of desferrioxamine and hydroxypyridin-4-one chelators in K562 cells affects chelation of intracellular iron pools. *British Journal of Haematology*, 85: 393-400.
- Izaguirre-Mayoral, M.L. & Sinclair, T.R.** 2005. Soybean genotypic difference in growth, nutrient accumulation and ultrastructure in response to manganese and iron supply in solution culture. *Annals of Botany*, 96: 149–158.

- Keaney, M., Matthussens, F., Sharpe, M., Vanfleteren, J. & Gems, D.** 2004. Superoxide dismutase mimetics elevate superoxide dismutase activity in vivo but do not retard ageing in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(2): 239-250.
- Kerchev, P.I., Fenton, B., Foyer, C.H. & Hancock, R.D.** 2012. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signaling pathways. *Plant, Cell and Environment* 35:441-453.
- Lavres Junior, J.** Influência genotípica na absorção, utilização e na toxidez de manganês na soja. Tese de Doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo. 2007.
- Lavres Junior, J., Moraes, M.F., Cabral, C.P. & Malavolta, E.** 2008. Influência genotípica na absorção e na toxidez de manganês em soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 173-181.
- Lavres Junior, J., Reis, R.A., Rossi, M.L.; Cabral, C.P., Nogueira, N.L. & Malavolta, E.** 2010. Changes in the ultrastructure of soybean cultivars in response to manganese supply in solution culture. *Scientia Agricola*, 67(3):287-294.
- Lei, Y., Korpelainen, H. & Li, C.** 2007. Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere*, 68: 686-694.
- Loneragan, J.F.** 1988. Manganese in soils and plants. In: Graham, R.D., Hannam, R.J. & Uren, N.C. Manganese in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, pp. 113-124.
- Loreto, F. & Velikova, V.** 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127: 1781-1787.
- Ma, J.F.** 2005. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24 (4): 267-281.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A.O.** 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2ed. Potafos. Piracicaba.
- Munroe, W., Kingsley, C., Durazo, A., Gralla, E.B., Imlay, J.A., Srinivasan, C. & Valentine, J.S.** 2007. Only one of a wide assortment of manganese-containing SOD mimicking compounds rescues the low aerobic growth phenotypes of both *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking superoxide dismutase enzymes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101: 1875-1882.
- Pittman, J.K.** 2005. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytologist*, 167: 733-742.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Jutur, P.P. & Sumithra, K.** 2004. Diferencial antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 52: 33-42.
- Sanchez, R.J., Srinivasan, C., Munroe, W.H., Wallace, M.A., Martins, J., Kao, T.Y., Le, K., Gralla, E. B. & Valentine, J.S.** 2005. Exogenous manganous ion at millimolar levels rescues all known dioxygen-sensitive phenotypes of yeast lacking CuZnSOD. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10: 913-923.

Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., He, Y., Qian, Q. & Yu, J. 2005. Silicon-mediated alleviation of Mn toxicity in *Cucumis sativus* in relation to activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry*, 66:1551–1559.

Sinclair, T.R., Neumaier, N., Farias, J.R.B. & Nepumuceno, A.L. 2005. Comparison of vegetative development in soybean cultivars for low-latitude environments. *Field Crops Research*, 92: 53-59.

Souza-Santos, P., Ramos, R.S., Ferreira, S.T. & Carvalho-Alves, P.C. 2001. Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATP. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1512(2): 357-366.

Srivastava, S. & Dubey, R.S. 2011. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 64:1–16.

Yoon, Y-S., Yoon, D-S., Lim, I.K., Yoon, S-H., Chung, H-Y., Rojo, M., Malka, F., Jou, M-J., Martinou, J-C. & Yoon, G. 2006. Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *Journal of Cellular Physiology*, 209: 468-480.

CAPÍTULO 3

**Investigação do potencial do MnDFB no aumento da
tolerância de plantas de soja sob estresse abiótico:
ozônio e chuva ácida**

3.1. INTRODUÇÃO

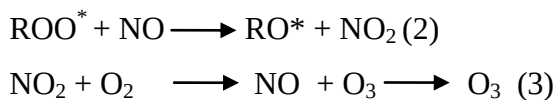
O ozônio (O₃) troposférico é um gás deletério para a vegetação devido sua ação oxidante (Cho *et al.* 2011) e também é um dos principais gases contribuintes para o efeito estufa (IPCC 2007).

Em regiões pouco poluídas, na presença de luz solar, o dióxido de nitrogênio (NO₂) é convertido a NO e oxigênio atômico (O). O oxigênio atômico, na presença de partículas, origina O₃. Este por sua vez consome o NO revertendo à produção do NO₂, impedindo o acúmulo excessivo do O₃ (Pinto *et al.* 2010).

Na presença de luz solar, a reação do O₂ com NO₂ na atmosfera leva à formação de NO e O₃ (reação 1), a reação entre estes leva novamente à formação de O₂ e NO₂, alcançando um equilíbrio foto-estacionário (vanLoon & Duffy, 2005). Desta forma, a concentração de O₃ na troposfera permanece em níveis baixos.



Em atmosfera poluída, especialmente por acréscimo de óxidos de nitrogênio e COVs, esta reação é alterada (Orlando *et al.* 2010). Radicais peroxila (ROO*) são formados em atmosfera rica em COVs e monóxido de carbono (CO) e reagem facilmente com NO, os produtos desta reação são radicais orgânicos (RO*) e NO₂ (reação 2) (Fowler *et al.* 1999). O NO₂ volta a reagir com O₂ que, por sua vez, formam NO e O₃ (reação 3). Entretanto, a cinética da reação é mais favorável com radicais orgânicos na atmosfera do que com O₃, o qual acaba sendo acumulado e alcançando altos níveis.



Estas reações entre poluentes e gases atmosféricos, na presença de luz solar, constitui o fenômeno denominado *smog* fotoquímico. O *smog* pode ser observado principalmente em áreas urba-

nas como uma espessa neblina marrom-avermelhada no horizonte em dias ensolarados e após inversão térmica.

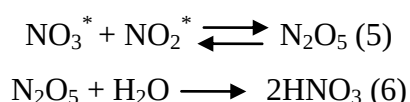
Ao tratar de danos aos vegetais, a deposição ácida é um outro importante fator de perturbação. A deposição ácida pode ocorrer por meio de chuva, orvalho, neblina ou neve (Nebel & Wright, 2000, vanLoon & Duffy 2005).

O CO₂ constituinte da atmosfera leva à formação de ácido carbônico (H₂CO₃) o qual ao entrar em contato com a água é dissociado em íons hidrogênio (H⁺) e carbonato (HCO₃⁻), a presença de H⁺ leva à formação de íons hidrônio (H₃O⁺), responsáveis pela acidificação da água. Portanto, em temperatura ambiente, a água da chuva é naturalmente ácida com pH em torno de 5,5.

O fenômeno conhecido por chuva ácida refere-se à diminuição do pH em valores abaixo de 5,5, geralmente devido à presença ácidos nítrico (HNO₃) e sulfúrico (H₂SO₄), os quais são resultantes de reações dos poluentes atmosféricos óxidos de nitrogênio (NO_x) e dióxido de enxofre (SO₂).

Considerando as fontes antropogênicas, os NO_x são emitidos na queima de óleo combustível em termoelétricas, queima de combustíveis fósseis por veículos automotores e em incinerações. O SO₂ é liberado em processos de queima de óleo combustível, veículos à diesel, refinaria de petróleo, indústria de papel e produção de fertilizantes (Nebel & Wright 2000, CETESB 2010).

Durante o dia, o óxido nítrico é oxidado por O₂, O₃ e radicais orgânicos levando a formação do radical dióxido de nitrogênio (NO₂^{*}). No período noturno, este radical leva à formação do radical nitrato (NO₃^{*}), este toma parte em uma série de reações com aldeídos e alcanos, resultando em HNO₃. Outra via de reações cineticamente favorável é a síntese do HNO₃ pela formação de dinitrogênio pentóxido (N₂O₅) (5) (6) (vanLoon & Duffy 2005).

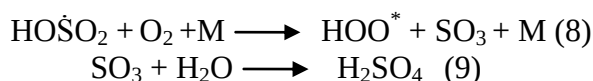


A oxidação do SO₂ para formação de ácido sulfúrico ocorre em dois processos (vanLoon & Duffy, 2005, Kloppe *et al.* 2008). No primeiro, há reação do SO₂ com radical hidroxila (OH^{*}), na

presença de uma terceira molécula “M” (em geral N₂ ou O₂) gerando o radical hidroxisulfonil (HOŠO₂) (7).



O segundo processo é a reação do HOŠO₂ com O₂ e outros compostos resultando em trióxido de enxofre (SO₃) (8), o precursor do ácido sulfúrico (9).



Os íons dissociados na água da chuva responsáveis por sua acidez excessiva são depositados sobre o solo, rios, lagos, florestas e plantações, pois os precursores podem ser transportados das áreas urbanas e/ou industriais para áreas remotas (Nebel & Wright, 2000, Ito *et al.* 2011).

A chuva ácida pode levar a danos diretos ou indiretos nos vegetais, ao alterar a permeabilidade de membranas, dissolução da parede celular, inibição da nitrificação, diminuição da fotossíntese, alteração da disponibilidade de nutrientes no solo (Larcher 2000, Schulze *et al.* 2002). A alteração do pH do solo pode levar muitos anos para ocorrer, mas já tem sido indicada como uma das principais razões do declínio de florestas na Europa (Schulze *et al.* 2002, Savva & Berninger 2010, Šebesta *et al.* 2011).

A deposição de nitrogênio (N) e enxofre (S) nos primeiros anos pode ser benéfica para a vegetação, pois ambos são nutrientes, mas o excesso no solo e a acidificação podem gerar desequilíbrios na disponibilidade dos elementos (Jonard *et al.* 2012). A variação de pH no solo pode causar prejuízos aos vegetais, pois há desequilíbrio de macro e micronutrientes, aumento na disponibilização de alumínio (Al) e diminuição da atividade biológica e ciclagem de nutrientes.

Norby *et al.* (1985) e Smith *et al.* (1991) estudaram os efeitos da chuva ácida simulada em cultivares de soja e não encontraram evidências de alteração fisiológica, por outro lado Wang *et al.* (2000) mostrou que o baixo pH do solo altera a absorção de nutrientes em soja. O aumento de H⁺

levam ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática, destruição desta e dissolução da parede celular (Shvestova *et al.* 2002, Schulze *et al.* 2005).

Tanto o ozônio quanto a chuva ácida são nocivos aos vegetais, porém há variação do mecanismo de entrada na planta e ação tóxica, o que determina as respostas de defesa. Como já descrito no Capítulo 1 (item 1.2.3), a entrada de ozônio ocorre predominantemente pela abertura estomática e dissolve-se no apoplasto e leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido (O_2^{*-}), radical hidroxila (OH^*) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Cho *et al.* 2011). A chuva ácida ao depositar sobre o limbo foliar oxida e dissolve a cutícula. A recorrência de eventos de chuva ácida sobre este tecido leva à morte das células epidérmicas e do mesofilo (Sant'Anna-Santos *et al.* 2006). É possível também que radicais livres provenientes da solução da chuva adicionem radicais sulfito e radicais dióxido de nitrogênio no meio, os quais podem gerar também as espécies reativas de oxigênio (Halliwell & Gutteridge 2007), por exemplo, a oxidação de radicais sulfito à sulfato no cloroplasto leva à formação de O_2^{*-} (Arora *et al.* 2002).

O estresse oxidativo causado pelo ozônio leva à diminuição da taxa de assimilação de carbono devido à danos nos fotossistemas, diminuição na síntese da rubisco e na quantidade de clorofila (Calatayud *et al.* 2003, Moraes *et al.* 2004, Whittmann *et al.*, 2007, Heath 2008). Logo, enquanto há maior gasto de energia para manter o balanço antioxidante na célula, há prejuízo na síntese de carboidratos.

Os efeitos da chuva ácida sobre a fisiologia vegetal é dúbio. Alguns trabalhos mostram que a assimilação de carbono não é afetada pela acidez da chuva (Norby *et al.* 1985, Chapelka *et al.* 1985; Smith *et al.* 1991), outros indicam redução na quantidade de clorofila e crescimento em condições de pH muito baixo e exposição prolongada (Silva *et al.* 2005, Liu & Liu 2011). O que se verifica com frequência é o surgimento de necroses foliares e alteração na atividade antioxidante (Yu *et al.* 2002, Silva *et al.* 2005, Liu & Liu 2011).

Ainda, o excesso de espécies radicalares pode alterar a fotossíntese seja por danos nos fotossistemas (PSI ou PSII) (Baker 2008), decréscimo da rubisco (Heath 2008) ou diminuição na con-

centração de CO_2 , acarretado pelo fechamento estomático causado pelo influxo de Ca^{2+} e síntese do hormônio ácido abscísico (Mittler *et al.* 2004, Fiscus *et al.* 2005). Ainda, há ativação de genes para aumento da síntese dos antioxidantes do ciclo ascorbato-glutationa (Mittler *et al.* 2004). Todas estas respostas dependem do tipo de exposição, aguda ou crônica, da sensibilidade da espécie e estágio de desenvolvimento (Fiscus *et al.* 2005).

Como descrito nos capítulos 1 e 2, antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos estão presentes em diversos compartimentos celulares e entre a membrana plasmática e a parede celular como é o caso do ácido ascórbico e de uma das isoformas de Cu/ZnSOD (cobre/zinco superóxido dismutase) (Schinkel *et al.* 1998) os quais removem H_2O_2 e ânion superóxido do meio (Arora *et al.* 2002).

Fatores abióticos diferentes levam à ativação de determinadas isoenzimas SOD e suas isoformas, geralmente relacionado à organela onde atua (Tsang *et al.* 1991, Mittler *et al.* 2004). A regulação da síntese e atividade de cada isoenzima ou isoforma sob estresse varia, portanto, com a localização celular (Mittler *et al.* 2004), se estiverem no mesmo gene (*splicing* alternativo) (Murgia *et al.* 2004) ou genes próximos, e presença de cofatores no caso da SOD.

Os cofatores da SOD – Fe, Mn e Cu – são micronutrientes essenciais para o desenvolvimento da planta, especialmente na fotossíntese na cadeia de transporte de elétrons e fotólise da água. Todavia é necessário haver um equilíbrio da concentração nas células de folhas e raízes para não acarretar toxicidade ou deficiência. Estudos revelam que as isoenzimas são reguladas pela concentração do metal específico, embora em *Escherichia coli* tenha-se observado o aumento na concentração de Fe regular também a expressão de genes para MnSOD (Culotta 2001).

No Capítulo 2 foi discutido que o complexo MnDFB aumenta a atividade de todas as isoenzimas SOD e que poderia haver uma relação positiva com a maior disponibilização de cofatores. Dessa forma, este complexo aumenta um dos principais mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, e por isso é possível supor um potencial do MnDFB em aumentar a tolerância das plantas ao estresse oxidativo. Assim, objetivou-se verificar se a adição de 8 μM de MnDFB aumenta a tole-

rância de *Glycine max* ‘Sambaíba’ ao estresse oxidativo causado pelo ozônio e chuva ácida simulada e investigar o mecanismo de ação do complexo comparando sua ação à do Mn livre (MnSO_4) nas defesas antioxidativas, na fisiologia e morfologia das plantas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Exposição à atmosfera controlada: fumigação com ar filtrado e ozônio

Cultivo e exposição da soja

As sementes de *Glycine max* cultivar ‘Sambaíba’ foram adquiridas pela Embrapa e germinadas e cultivadas na casa de vegetação situada no Instituto de Botânica de São Paulo (IBt-SP/SMA) (23°38’28.8” S; 46°37’15.8” W; 805 m acima do nível do mar), durante a primavera e verão de 2011/2012. O procedimento de transplante e cultivo foi idêntico ao descrito no capítulo 2 (item 2.2.2)

Desde o cultivo até a exposição, as plantas permaneceram na casa de vegetação com ar filtrado e condições favoráveis de temperatura (estabilizada por ar condicionado) e radiação solar. Durante todo o período de crescimento, foram medidas a temperatura e umidade relativa durante o dia (Tabela 2).

Tabela 2. Condições ambientais na casa de vegetação do Instituto de Botânica.

Período de cultivo	Exposição	Temperatura (°C)			UR (%)		
		Manhã	Meio-dia	Tarde	Manhã	Meio-dia	Tarde
12/09 - 31/10/2011	1*	30,3 ±7,6	42 ±5,7	38,5 ±5,0	60 ±23,5	48,5 ±2,1	42,5 ±3,5
05/12/2011 - 09/01/2012	2*	26 ±5,4	33,7 ±8,4	25,5 ±0,7	63 ±10,2	44,5 ±2,6	40,5 ±14,8
21/12/2011 - 23/01/2012	3*	23,1 ±4,7	24,6 ±7,1	21,3 ±3,2	70 ±17	42,6 ±9,9	65 ±15,1
03/01 - 06/02/2012	4*	20,9 ±2,5	21 ±2,4	21,6 ±3,1	68,2 ±21	43,4 ±20,8	70,6 ±24,5

* 3 indivíduos por tratamento.

Foram utilizadas duas câmaras de Teflon com armação de inox, uma para o poluente, aqui no caso o ozônio (O_3), e a outra com ar filtrado (AF). O interior da câmara possui pequenos espaços para a acomodação dos vasos e na sua parte inferior há compartimento para a água (Figura 12A).

O sistema de fumigação, no qual as plantas foram submetidas às condições controladas, está alocado no laboratório de interação atmosfera-plantas da Seção de Ecologia do Instituto de Botânica (Souza & Pagliuso 2009). O sistema consiste em aparelho para purificar e umedecer o ar; misturador; dispositivo gerador de ozônio; câmaras fechadas de fumigação; controlador e instrumentos de monitoramento dos gases (Figura 12B e 12C). O ar externo é recolhido por um compressor e em seguida é filtrado. Este filtro consiste em um tubo de inox para eliminar os contaminantes e a umidade através de carvão ativado, permanganato e de sílica. O compartimento seguinte é o misturador que promove à homogeneidade da mistura. Quando o ar purificado passa através do misturador, uma válvula de controle pode ser aberta fornecendo ar para um ozonizador. Quando não for necessária a geração deste gás, esta válvula é mantida fechada. As válvulas de controle apresentadas antes da entrada da câmara têm a finalidade de manter o fluxo de vazão do gás constante e igual no interior das câmaras. A concentração de ozônio é medida continuamente por um monitor EcotechTM 9810B.

Quando atingiram o estágio de desenvolvimento entre V7-V9 (Fehr *et al.*, 1971), em cada lote 6 indivíduos receberam uma dose única de 50 ml de cada tratamento, 8 μ M de MnDFB, 8 μ M de $MnSO_4$ e controle.

No dia de aplicação das doses, no início da manhã, as plantas foram removidas da casa de vegetação e alocadas na base das câmaras e mantidas sob luminosidade artificial, a fim de aclimatá-las por 1 dia.

De cada tratamento, metade das plantas foi exposta ao ar filtrado e a outra metade ao ar enriquecido com ozônio concomitantemente. Totalizando um número amostral total de 12 plantas para cada tratamento de cada exposição.



Figura 12. Sistema de fumigação ou atmosfera controlada. **A:** Plantas de soja acomodadas nos espaços do reservatório de água na base da câmara; **B:** Painel com filtro e misturador de ar; **C:** Câmara fechada e conectada à tubulação com ar filtrado enriquecido com ozônio. Abreviaturas: PAR: lâmpadas que emitem PAR; Res: reservatório de água; Mist: misturador de ar; O₃: ozonizador.

Por três dias seguidos as plantas na câmara com O₃ foram expostas à uma concentração média de 60 ppb do gás por hora, durante seis horas. A escolha desta concentração deveu-se aos limites estabelecidos para concentração de ozônio, os quais não podem ultrapassar 80 ppb.h⁻¹, e também aos indícios que a soja é sensível ao ozônio com concentrações até abaixo de 60 ppb (Britz & Robinson 2001, Bulbovas *et al.* 2007).

As plantas foram iluminadas artificialmente por 10 horas diárias com lâmpadas de vapor metálico 400W e lâmpadas de fluorescência 30W TL05, que emitem radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (em média 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A temperatura média dentro das câmaras foi de 24° C ($\pm 2,0$) e no ambiente com as luzes ligadas a temperatura média foi de 23 ° C ($\pm 2,0$).

Ao final das três exposições eram avaliados os danos visíveis, crescimento, fluorescência da clorofila a e coletado material para análises bioquímicas e de concentração de metais.

3.2.2. Exposição à chuva simulada

Cultivo e exposição da soja

As plantas de soja cresceram em casa de vegetação (Figura 13) situada na Unidade de Crescimento de Plantas pertencente ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (20°45'20" S; 42°52'40" W; 648 m acima do nível do mar). Durante todo o período de crescimento, foram medidas a temperatura, umidade relativa e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) durante o dia (Tabela 3).

O cultivo das plantas foi igual ao descrito no capítulo 2 (item 2.2.2) e as quatro exposições ocorreram entre abril e junho de 2011.

Tabela 3. Condições ambientais na casa de vegetação da UFV. Média e desvio-padrão em cada período.

Período de cultivo	Exposição	Temperatura (°C)			UR (%)			PAR ($\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$)		
		Manhã	Meio-dia	Tarde	Manhã	Meio-dia	Tarde	Manhã	Meio-dia	Tarde
06/04 - 18/05/2011	1*	23 ±5,2	28,6 ±4,0	25 ±3,1	71,8 ±15,7	60,8 ±11,9	65,45 ±9,6	203,3 ±160,3	299,1 ±231,5	210,7 ±412,2
11/04 - 25/05/2011	2**	21,9 ±5,5	28,7 ±3,8	25 ±3,0	73 ±14,5	57,8 ±12,8	63,8 ±10,7	224 ±145,5	426 ±368,9	184,6 ±382,5
15/04 - 02/06/2011	3**	21,5 ±5,1	28 ±2,9	25 ±3,0	75 ±14,6	55,1 ±10,4	64,6 ±10,6	216 ±140	426,2 ±368,9	184,6 ±382,5
26/04 - 15/06/2011	4**	19,5 ±4,9	27 ±3,6	24 ±3,4	76,4 ±14	56 ±11,7	62,5 ±12,6	187,9 ±155,9	400,9 ±395,2	153,2 ±410,1

* 3 indivíduos por tratamento.

** 4 indivíduos por tratamento.



Figura 13. Casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa onde as plantas foram cultivadas e mantidas após cada evento de chuva simulada.

O sistema de simulação de chuva é composto por dois recipientes (Figura 14A) independentes e acoplados à bombas de vácuo que transportam a água acidificada ou pH neutro pelo encanamento até os quatro sprinklers situados no topo das câmaras (Figura 14A e 14B). Sobre cada câmara há quatro lâmpadas que estimulam a fotossíntese (Figura 14 A e 14 B). O sistema foi construído a partir do modelo proposto por Alves *et al.* (1990).

As câmaras possuem área de $87 \times 115 \text{ cm}^2$ e a partir dos *sprinklers* até o meio do caule das plantas havia uma distância de 120 cm. São vedadas no teto e laterais para evitar contaminação.

A deposição úmida tem a intensidade de uma garoa fina. A vantagem deste tipo de chuva para o experimento está no aumento da área de contato das gotículas, o que promove maior interação com o tecido vegetal (Figura 14C). Além disso, um fluxo maior de chuva diminuiria o tempo de permanência da água nas folhas, e provavelmente o estresse causado pela acidez também seria menos intenso.

O fluxo da chuva nas câmaras foi calculado utilizando oito provetas de 250 mL com funis de mesmo diâmetro dispostas em locais variados, para obter uma média do volume depositado dentro da câmara (Figura 15A). Durante 20 min foi simulada uma chuva e após vários ajustes, o fluxo

para a câmara controle (chuva pH neutro) ficou em $10,5 \text{ ml.min}^{-1}$ e para a câmara de chuva ácida em $9,5 \text{ ml.min}^{-1}$.

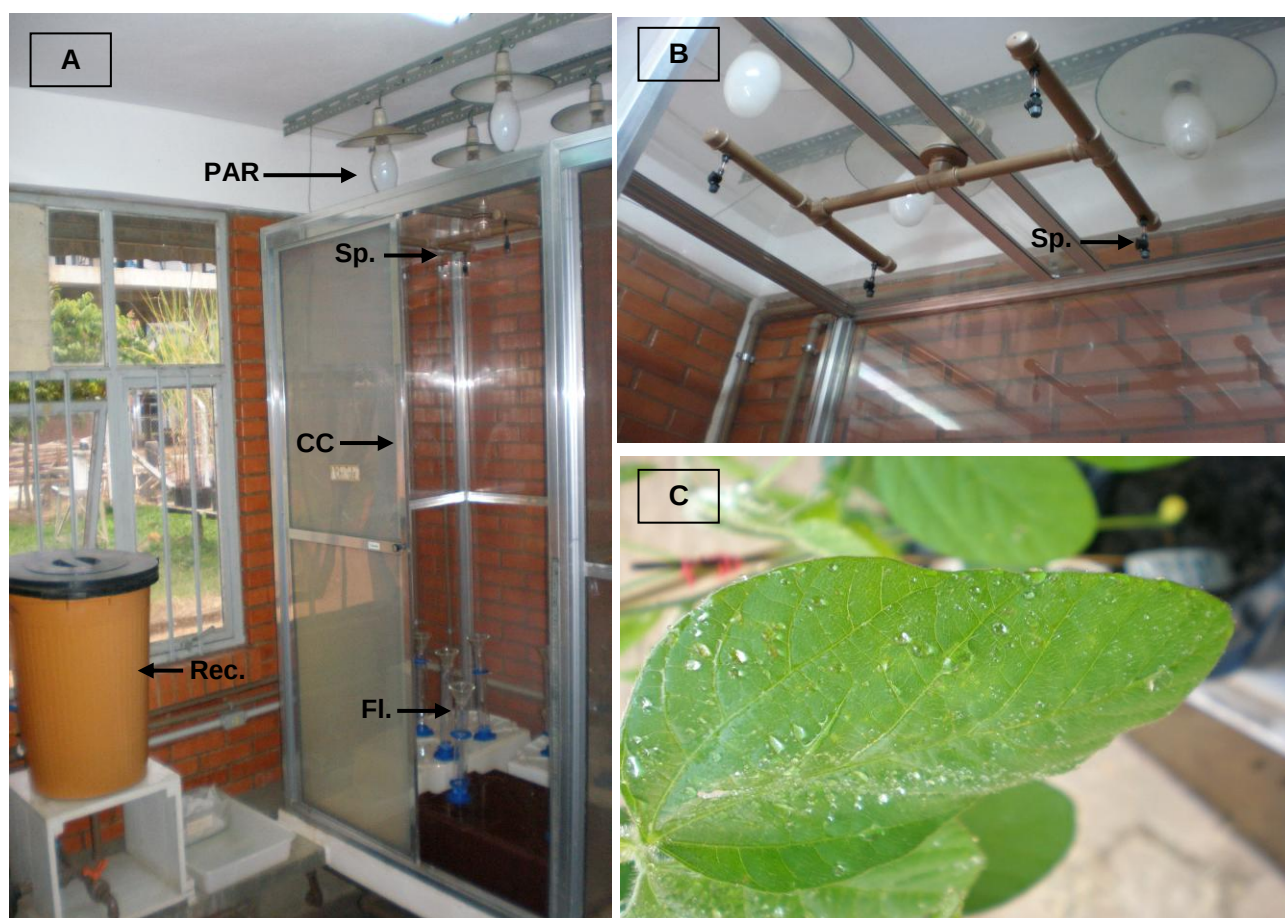


Figura 14. Sistema de chuva simulada **A:** Parte do sistema de simulação de chuva; **B:** Detalhe dos sprinklers e lâmpadas que emitem PAR; **C:** Detalhe das gotículas presas à folha, aumentando o tempo de ação dos íons sobre o tecido. Abreviaturas: Rec: Recipiente para solução; Fl. : Vidraria utilizada para o experimento de fluxo de chuva; CC: Câmara controle (chuva pH neutro); Sp: Sprinkler; PAR: Localização das lâmpadas que emitem PAR

Os tratamentos aplicados às plantas foram uma única dose de 50 ml da solução aquosa de manganês- desferrioxamina B (MnDFB, $8\mu\text{M}$) e sulfato de manganês (MnSO_4 , $8\mu\text{M}$ de manganês). Como controle do tratamento (controle) adicionou-se 50 mL de água deionizada.

Para cada exposição foram selecionados entre 18 e 24 indivíduos, totalizando um número amostral de 3 ou 4 plantas para cada tratamento (Tabela 3). Este conjunto amostral foi selecionado considerando o número máximo de indivíduos por câmara, no estágio de desenvolvimento V7-V9 (Fehr *et al.* 1971), onde as folhas de cada indivíduo não encobrisse as demais (Figura 15).

Metade das plantas de cada tratamento foram expostas à chuva ácida com pH 3,0 e a outra metade foi exposta à chuva com pH 6,5 (chuva neutra), considerada controle da exposição à chuva ácida. Para a correção do pH foram utilizadas soluções de de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e hidróxido de sódio (NaOH). A escolha desses valores de pH é baseada nos valores encontrados na região amazônica, descrito por Santos & Souza (1988) e utilizado no trabalho de Sant'Anna-Santos *et al.*(2006).



Figura 15. Plantas de soja na câmara de chuva ácida após evento de chuva.

A exposição à chuva foi iniciada no dia seguinte após a aplicação das soluções, sempre entre 9-10h da manhã. Houve um evento de chuva por dia com duração de 20 min, em três dias consecutivos.

As plantas foram retiradas todos os dias da casa de vegetação e transportadas até as câmaras de simulação de chuva, por isso antes de iniciar o experimento, as plantas tiveram 15 min de aclimação dentro das câmaras. Terminado o experimento, as plantas permaneciam nas câmaras por mais 15 min.

Durante o tempo de aclimação e evento de chuva a temperatura foi de 18,6°C. A PAR medida no mesmo período na câmara de chuva ácida e câmara controle foi de 25,7 ($\pm 2,7$) $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ e 24,6 ($\pm 2,9$) $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$, respectivamente.

Para minimizar efeitos de possível distribuição irregular da chuva, os vasos foram trocados de posição na câmara a cada dia de exposição.

Após os três dias, procederam-se às coletas para análises enzimáticas, peroxidação lipídica, quantificação de metais em folhas e raiz e também amostragem para anatomia foliar.

3.2.3. Procedimentos e Análises

O complexo MnDFB utilizado nos experimentos descritos a seguir foi sintetizado conforme os procedimentos descritos no Capítulo 2 (item 2.3.1.).

Avaliação dos danos visíveis e índice de injúria foliar (IIF)

O surgimento de injúrias foliares visíveis (necroses) foram vistoriados diariamente e mensurados visualmente em porcentagem de folíolo afetado. Para cada indivíduo foi aplicado o índice de injúria foliar (IIF), onde a porcentagem de sintomas é dividida em classes e depois calculada de acordo com a fórmula descrita em Furlan *et al.* (2008):

Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
1-5%	6-25%	26-50%	51-75%	76-100%

$$\text{IIF (\%)} = \frac{(\text{N1} \times 1) + (\text{N2} \times 2) + (\text{N3} \times 3) + (\text{N4} \times 4) + (\text{N5} \times 5)}{(\text{N0} + \text{N1} + \text{N2} + \text{N3} + \text{N4} + \text{N5}) \times 5} \times 100$$

Onde N1, N2, N3, N4 e N5 representam a quantidade de folíolos com sintomas em cada classe e N0 é o número de folíolos que não apresentaram sintomas.

Biometria, ensaios enzimáticos, peroxidação lipídica e quantificação de metais

As análises de biometria, ensaios enzimáticos em espectrofotômetro e em gel de SOD e APX, ensaio para quantificação de peroxidação lipídica em folhas e a análise de concentração de metais em folhas e raízes foram realizados seguindo os mesmos protocolos descritos no Capítulo 2 (item 2.3.4).

Rendimento quântico do fotossistema II (Fv/Fm)

A determinação do rendimento quântico do fotossistema II (PSII) permite inferências sobre sua inativação devido à fatores de estresse. Foi realizada nas plantas expostas ao ar filtrado e ozônio após os três dias de fumigação. Foram escolhidas sempre as folhas do ramo principal no 5º nó em região sem danos visíveis. Foi utilizado um fluorômetro (PAM 2500, Walz, Germany) capaz que mediz o sinal de fluorescência emitido pelas folhas e enviar os dados para o computador.

A parte da folha onde seria realizada a medida permaneceu por 30min no escuro utilizando clipe metálicos foliares fabricados pela Walz com a finalidade de cessar o fluxo de elétrons no fotossistema para manter as moléculas transportadoras de elétrons livres (oxidadas) para aproveitar o máximo de luz. Ao final deste período o tecido recebeu pulso de luz e foram medidas a fluorescência mínima (F_0), a fluorescência máxima (F_m) e o rendimento quântico do fotossistema II (F_v/F_m), ou seja, a relação entre o número de fótons emitidos e absorvidos, onde $F_v = F_m - F_0$. Esta relação permite avaliar a eficiência da absorção da luz pelo PSII para redução do aceptor primário de elétrons. O declínio da relação F_v/F_m indica algum tipo de dano (Baker 2008, Bussotti *et al.* 2011).

Análise anatômica das plantas

Para a análise anatômica de plantas expostas à chuva ácida foram coletados 10 fragmentos do limbo foliar com medida de 1cm^2 em cada planta. O tecido foi retirado de folhas do 3º nó totalmente expandidas e sem danos visíveis, ao longo da nervura central.

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato 0,2M; pH 7,0 (Karnovsky 1965, modificado) e armazenadas em etanol 70%. Posteriormente, foram desidratadas em série alcoólica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais com espessura de 5µm foram obtidos em micrótomo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica Microsystems Inc.). Os cortes foram corados com Azul de Toluidina pH 4,0 (O' Brien & McCully 1981) e as lâminas, montadas em resina sintética (Permout, Fisher Scientific, Bridgewater, NJ, USA). A análise e registro fotográfico foram realizadas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) com sistema U-Photo com câmara digital acoplada (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Alemanha) situados Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Os cortes e fotografia foram realizados pelo aluno de Iniciação Científica Talles Oliveira dos Anjos, sob orientação da pesquisadora Dra. Luzimar Campos da Silva.

Análise estatística

Diferenças entre os tratamentos foram determinadas pela análise de variância One-way Anova para verificar diferenças significativas entre as médias. Quando os dados não passaram no teste de normalidade, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis Anova on Ranks. Quando houve necessidade, os dados foram transformados (log10 ou rank). Foram considerados significativos os valores de $P \leq 0,05$. Para estas análises foi utilizado o software SigmaStat 3.5

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à atmosfera controlada, o surgimento dos danos visíveis foram detectados em todos os tratamentos (Figura 16^a e Tabela 5) e foram relativamente baixos comparados aqueles observado em herbáceas (alcançando 45% danos visíveis), sob a mesma concentração de ozônio utilizada nesse estudo (Esposito *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2012). Avaliando apenas esses resultados seria suposto afirmar que MnDFB não tem potencial para aumentar a tolerância das plantas ao ozônio. Contudo, esse fato pode não ser verdadeiro, pois os danos visíveis podem ser retardados em plantas mais tolerantes (Esposito *et al.* 2009), mas não impedidos de aparecerem e, por isso, avaliar os danos como o único parametro de tolerância ao estresse não é adequado.

A variação da taxa de crescimento relativo (TCR) (Figura 17), do rendimento quântico do fotossistema II (Fv/Fm) (Tabela 4) e da atividade de ascorbato peroxidase (APX) (Figura 16 B; Tabela 5) e da superóxido desmutase total (SOD) (Figura 16C; Tabela 5) não apresentou diferença entre os tratamentos e entre a exposição ao ozônio e ar filtrado. Estudos mostram diminuição na relação Fv/Fm e alteração da atividade da APX e SOD em plantas expostas ao ozônio (Sant'Anna *et al.* 2008, Chernikova *et al.* 2000, Scebba *et al.* 2003, Castagna & Ranieri 2009). Porém, nem sempre esses parâmetros são afetados pela presença de ozônio. Bussotti *et al.* (2011) mostraram que plantas sob elevado ozônio não alteram a relação Fv/Fm, já Calatayud *et al.* (2004) e Esposito *et al.* (2009) não detectaram alteração significativa na atividades de APX e SOD. No presente estudo, a análise dessas respostas não permitiu inferir sobre o aumento da tolerância ao estresse oxidativo causado pelo ozônio.

Entretanto, comparando os valores de MDA, como índice de peroxidação lipídica, entre os diferentes tratamentos e entre a exposição de O₃ e do AF (Figura 16D), observa-se que as plantas tratadas com MnDFB não foram afetadas pelo ozônio, enquanto a ação oxidativa desse poluente foi detectada no tratamento MnSO₄. É relevante destacar que apesar do MDA das plantas controle não apresentar diferença estatística entre AF e O₃, há maior variação nas medidas detectadas nas plan-

tas sob ozônio. Portanto, é possível que plantas tratadas com MnDFB sejam menos susceptíveis à ação do ozônio.

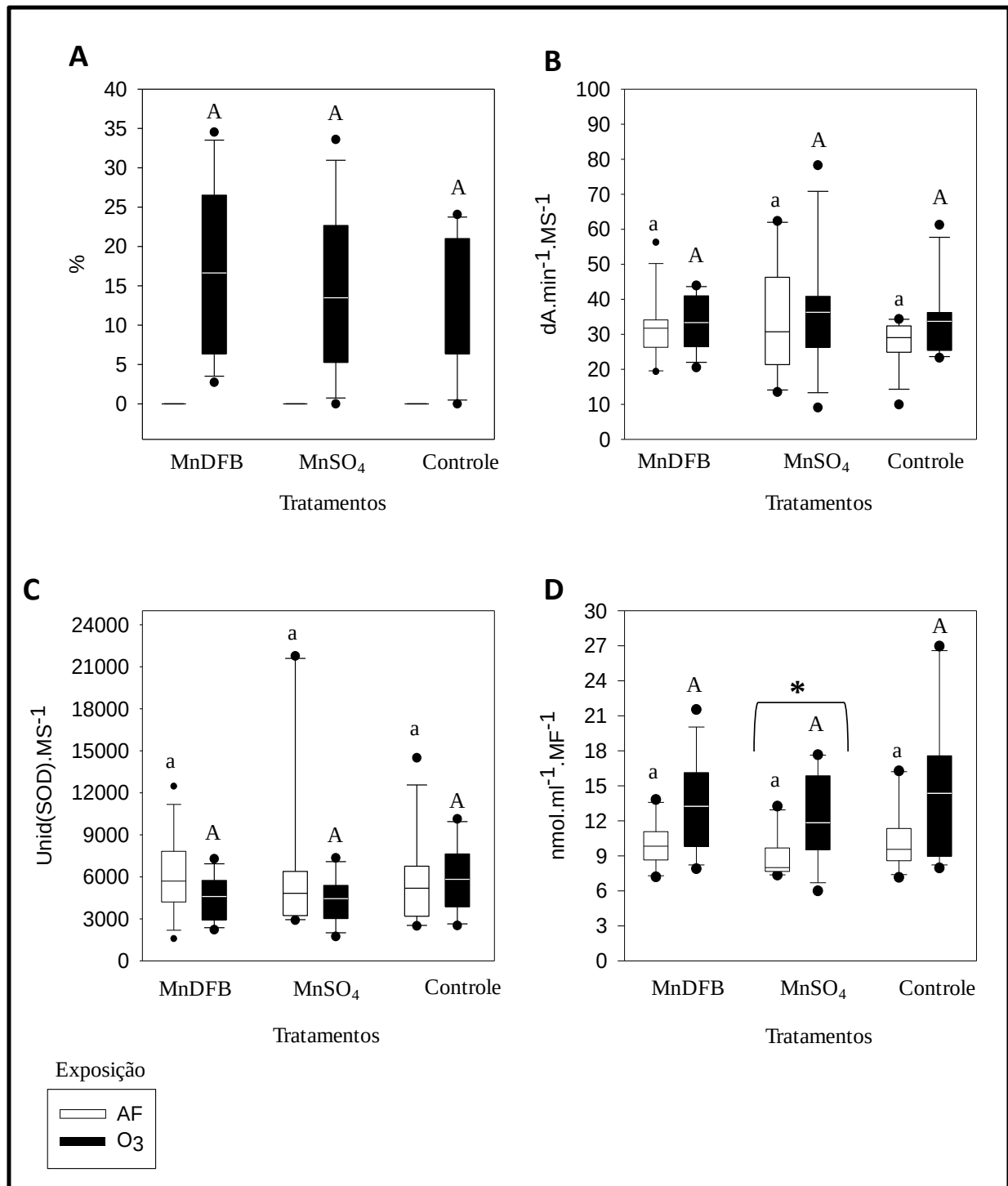


Figura 16. Variáveis dos indicadores de tolerância em folhas de soja tratadas com MnDFB ou MnSO₄ e não tratadas (controle), sob exposição ao ar filtrado (AF) e ozônio (O₃). **A:** Índice de injúria foliar (IIF) (%); **B:** Atividade de APX (dA.min⁻¹.MS⁻¹); **C:** Atividade da SOD total (Unid[SOD].MS⁻¹); **D:** Concentração de MDA (nmol⁻¹.MF⁻¹). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos na exposição ao ar filtrado. As letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (P ≤ 0,05) entre tratamentos na exposição ao ozônio (O₃). O asterisco indica di-

ferença entre exposição ao AF e O₃. Ínjúrias foliares visíveis (A) não se manifestaram nas plantas submetidas ao AF.

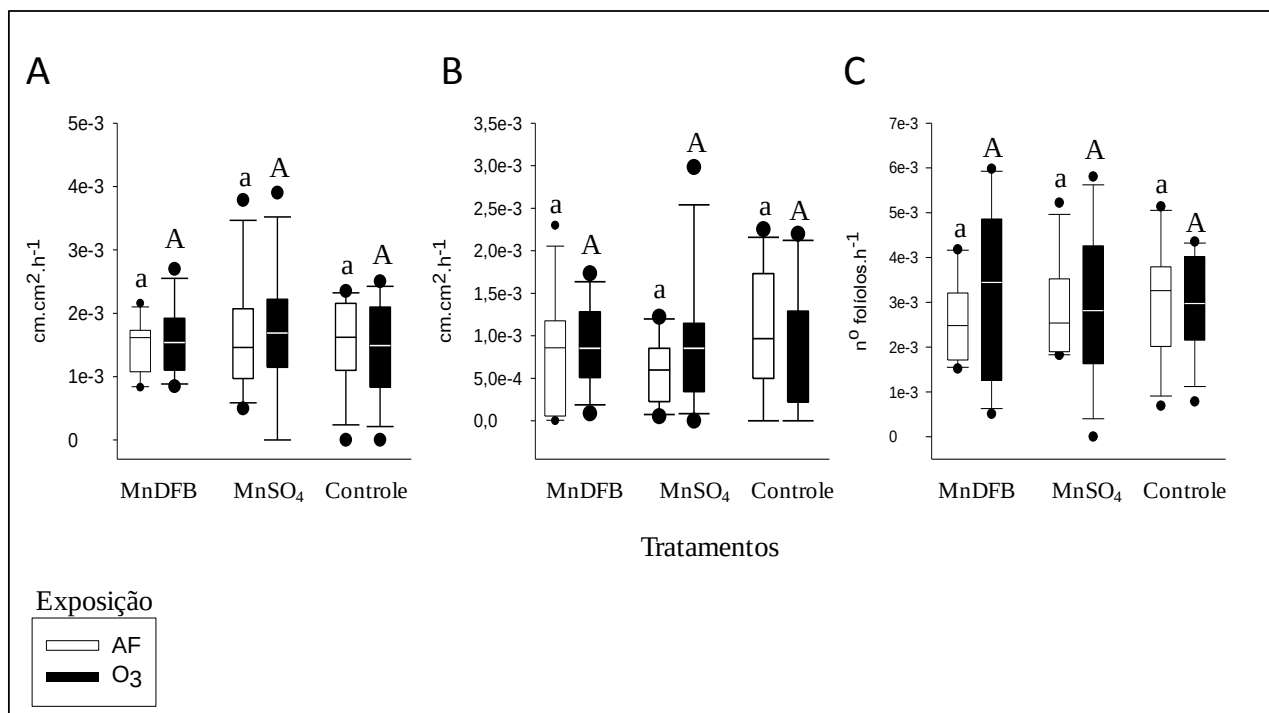


Figura 17. Taxa de crescimento relativo (TCR) dos órgãos aéreos de *Glycine max*. **A:** TCR em altura do caule (cm.cm².h⁻¹); **B:** TCR em diâmetro do caule (cm.cm².h⁻¹); **C:** TCR em número de folíolos (nº folíolos.h⁻¹). Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença estatística (P ≤ 0,05) entre os tratamentos (MnDFB, MnSO₄ e controle) para plantas expostas ao ar filtrado (AF). As letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença estatística entre os tratamentos para plantas expostas ao ozônio (O₃). Não houve diferença entre plantas sob o mesmo tratamento e expostas ao AF e O₃.

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão (±) dos parâmetros Fv/Fm, F₀ e Fm medidos nas folhas de *Glycine max* nas exposições ao ar filtrado e ozônio.

	MnDFB AF	MnDFB O ₃	MnSO ₄ AF	MnSO ₄ O ₃	Controle AF	Controle O ₃
Fv/Fm	0,82 (±0,01) a	0,81 (±0,02)A	0,81 (±0,02)a	0,80 (±0,00)A	0,81 (±0,01)a	0,80 (±0,01)A
F₀	351,67 (±17,0)a	361,67 (±19,5)A	358,50 (±13,1)a	355,00 (±5,4)A	357,11 (13,3)a	363,44 (±9,5)A
Fm	1900,89 (±70,93)a	1868,44 (±228,56)A	1930,13 (±136,23)a	1825,78 (±34,64)A	1906,44 (±147,32)a	1849,44 (±57,40)A

Letras maiúsculas diferentes destacam diferença significativa (P ≤ 0,05) nos parâmetros analisados na exposição ao ozônio (O₃), enquanto as minúsculas indicam diferença entre a exposição ao ar filtrado (AF). Não houve diferença significativa entre AF e O₃ em nenhum dos parâmetros.

A avaliação da atividade das isoenzimas da SOD também mostrou que plantas tratadas com MnDFB podem ser mais tolerante ao ozônio, pois observou-se elevada atividade das isoenzimas (Figura 18) das plantas tratadas com MnDFB sob ar filtrado, as quais foram mantidas sob ação do ozônio. A atividade das isoenzimas das plantas tratadas com MnSO₄ e controle do tratamento foi maior na presença de ozônio em comparação ao ar filtrado, corroborando com os resultados de MDA (Figura 16D), onde nesses tratamentos houve estresse oxidativo.

A atividade das isoenzimas pode ser alterada como resposta de defesa, porém nem todas são ativadas, pois pertencem a compartimentos celulares que não são igualmente afetados por fatores distintos de estresse (Kliebenstein *et al.* 1998). A MnSOD mitocondrial minimiza não apenas as espécies reativas geradas por estresse oxidativo exógeno (Wang *et al.* 2004) como também aquelas provenientes dos fatores endógenos (Culotta 2001). A FeSOD que estão presentes apenas no cloroplasto (Tsang *et al.* 1991) são mais ativadas pelo excesso de luz. Já, a atividade de Cu/ZnSOD citoplasmática é aumentada pela presença do ozônio, o qual promove excesso de EROs que se difunde facilmente no citoplasma, e é responsável por retardar o surgimento de sintomas visíveis (Pitcher & Zilinskas 1996, Kliebenstein *et al.* 1998). No presente estudo, observou-se maior atividade de MnSOD e Cu/ZnSOD em plantas não tratadas com MnDFB e sob ozônio, o que indica que plantas na presença ou ausência de Mn livre estiveram sob estresse oxidativo, já que ativaram estas isoenzimas como estratégia de defesa. Ao contrário, tanto no AF como no O₃, a atividade das isoenzimas em plantas sob ação do MnDFB foram similares (Figura 18), sugerindo uma elevada eficiência do complexo na detoxificação das EROs oriundas da dose de ozônio aplicada. A ação do complexo pode ter sido por meio de mimetismo da SOD e/ou gerando e mantendo uma reserva de SOD pela disponibilização dos cofatores metálicos, conforme sugerido no capítulo 2. Seu mecanismo de ação em plantas sob ozônio poderia ter sido melhor elucidado se variação dos metais nas folhas e nas raízes tivessem sido detectadas (Figura 19A e B).

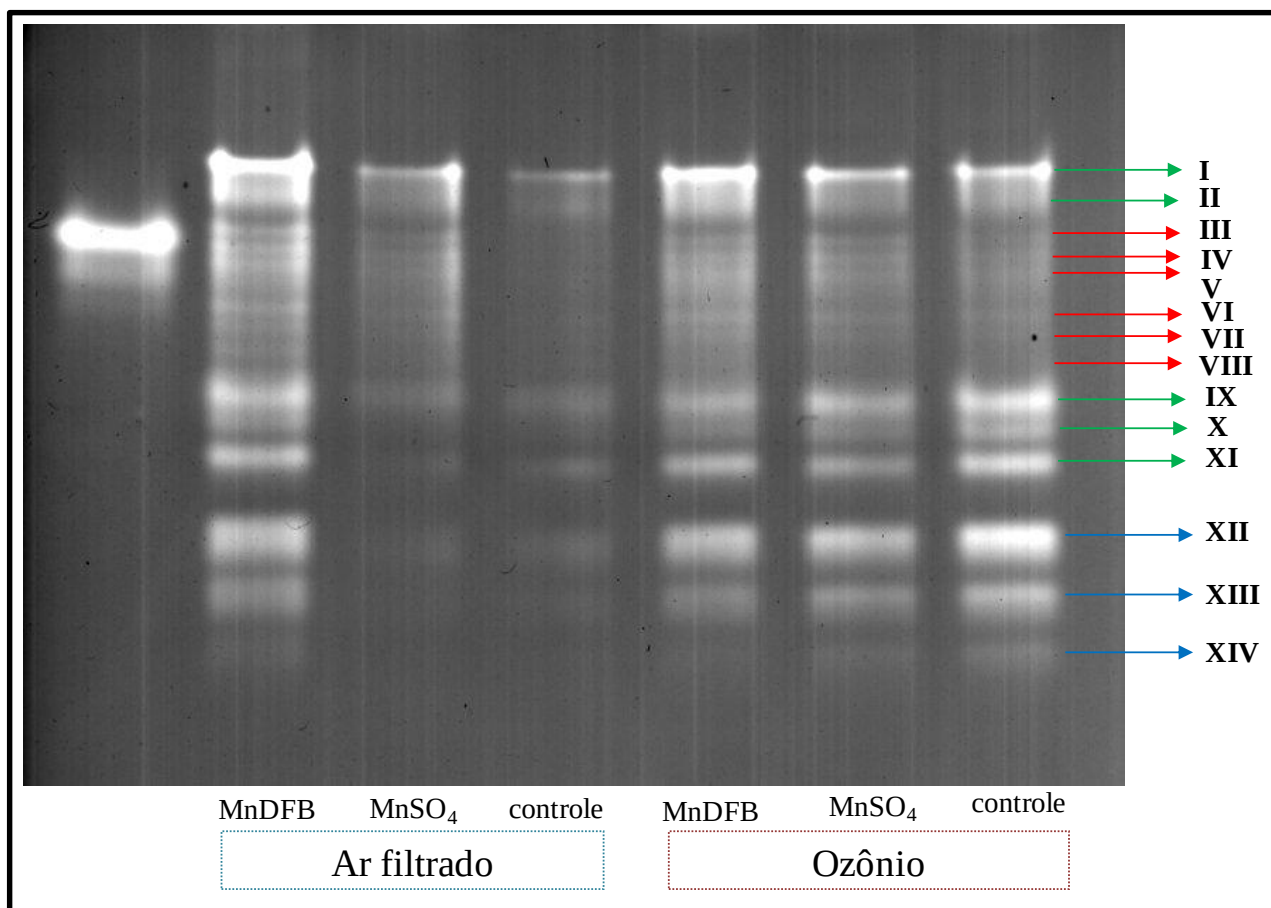


Figura 18. Atividade de isoenzimas superóxido dismutase (SOD) em gel de poliacrilamida de plantas sob diferentes tratamentos (MnDFB, MnSO_4 e controle) e expostas à atmosfera controlada (Ar filtrado e ozônio). Cada flecha indica uma banda, onde **I, II, IX, X e XI** são MnSOD; **III a VIII**, são FeSOD; **XII a XIV** são Cu/ZnSOD.

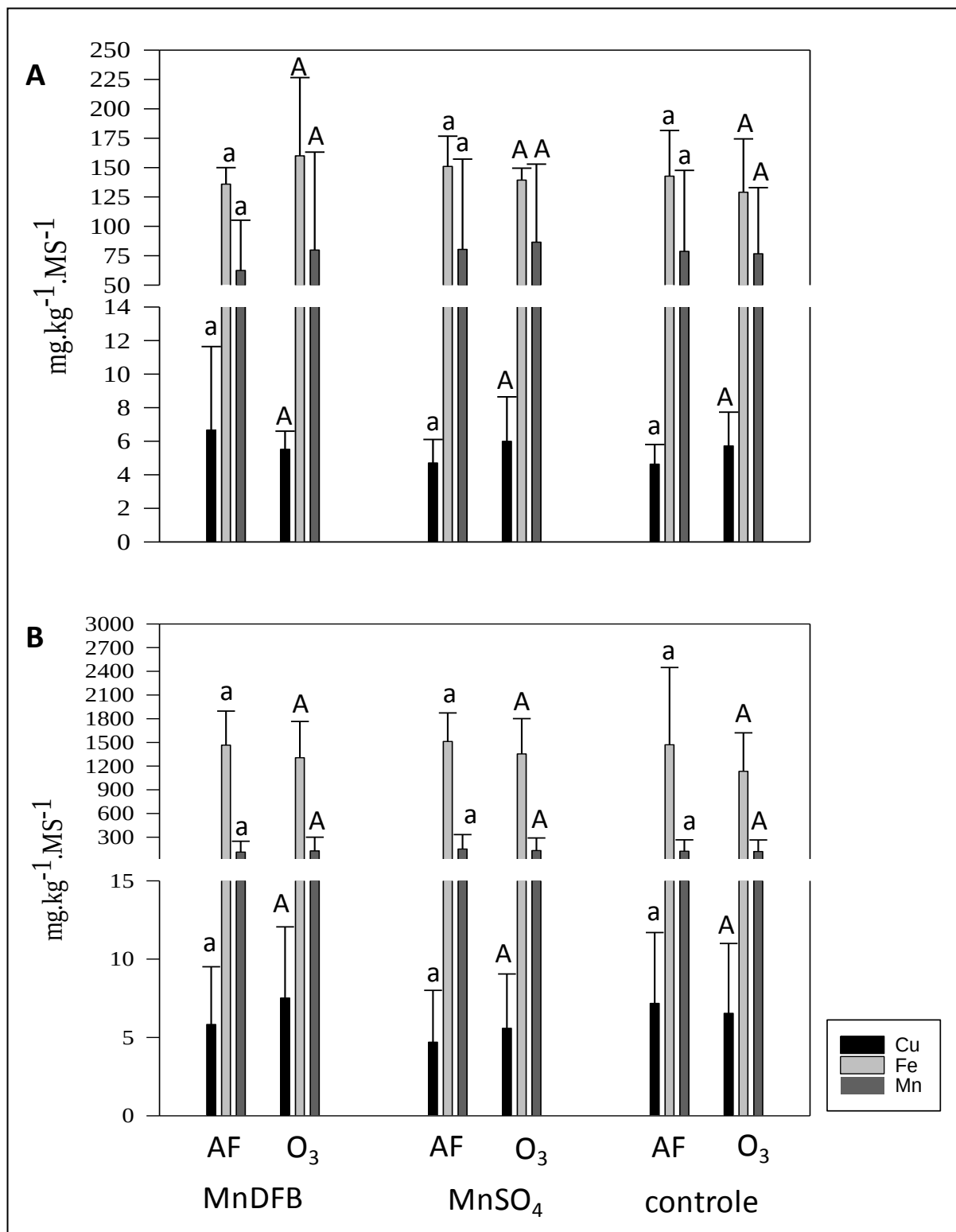


Figura 19. Concentração média e desvio padrão de metais em folhas (A) e raízes (B) de plantas de soja sob diferentes tratamentos e expostas à atmosfera controlada. As letras minúsculas e maiúsculas indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$) na exposição ao ar filtrado (AF) e ao ozônio (O_3), respectivamente, entre diferentes tratamentos. Não houve diferença entre plantas sob o mesmo tratamento e expostas ao AF e O_3 .

Assim como na exposição ao ozônio, os danos visíveis surgidos nas plantas expostas a chuva ácida foram independentes do tratamento e nenhuma ação benéfica ou deletéria do MnDFB pôde ser indicada por meio desse parâmetro (Figura 20A; Tabela 5). É conhecido que os danos visíveis oriundos da chuva ácida são decorrentes não apenas devido à elevação de ERs, mas também diretamente pela ação de seus componentes oxidantes (Shvetsova *et al.* 2002, Neves *et al.* 2009). Como observado nesse estudo (Figura 21) e reportado por Sant'Anna-Santos *et al.* 2006, a ação direta da chuva ácida provoca danos no sentido da epiderme para o mesofilo, ou seja, há desgaste da cutícula seguido de morte das células epidérmicas e desestruturação do mesofilo, deste modo as defesas antioxidantes não podem impedir o surgimento das necroses. Ressalta-se que o surgimento desses danos visíveis não é consequência do aumento das ERs, as quais podem ser formadas independentemente do surgimento dos danos. Dessa forma, apenas os danos secundários decorrentes das ERs no tecido não necrosado do mesofilo poderiam ser minimizados pela ação do MnDFB.

Günthardt-Goerg & Vollenweider (2007) relatam que sob chuva ácida, em *Pinus*, ocorre um processo de rustificação no mesofilo, o qual foi também observado nesse estudo em folhas sem sintomas aparentes de controle e tratadas com MnSO_4 (Figura 22 D e E). Por outro lado, constatou-se que, sob chuva ácida, o mesofilo das plantas tratadas com MnDFB (Figura 22F) não se alterou comparado com o MnSO_4 e o controle do tratamento. Ainda, observou-se que a densidade de células no mesofilo das plantas submetidas ao MnDFB (Figura 22F) se manteve inalterada, sendo que essas plantas também não apresentaram diferença na TCR (Figura 23), peroxidação lipídica e alteração da APX (Figura 20 D e B; Tabela 5). O estresse oxidativo é normalmente acompanhado pelo aumento da peroxidação lipídica que pode desencadear o aumento de APX para defesa (Chernikova *et al.* 2000, Scebba *et al.* 2003, Lee *et al.* 2007, Castagna & Ranieri 2009). Assim, pode-se sugerir que, no curto tempo de exposição à chuva ácida, o MnDFB deve ter atuado nas defesas contra o estresse oxidativo.

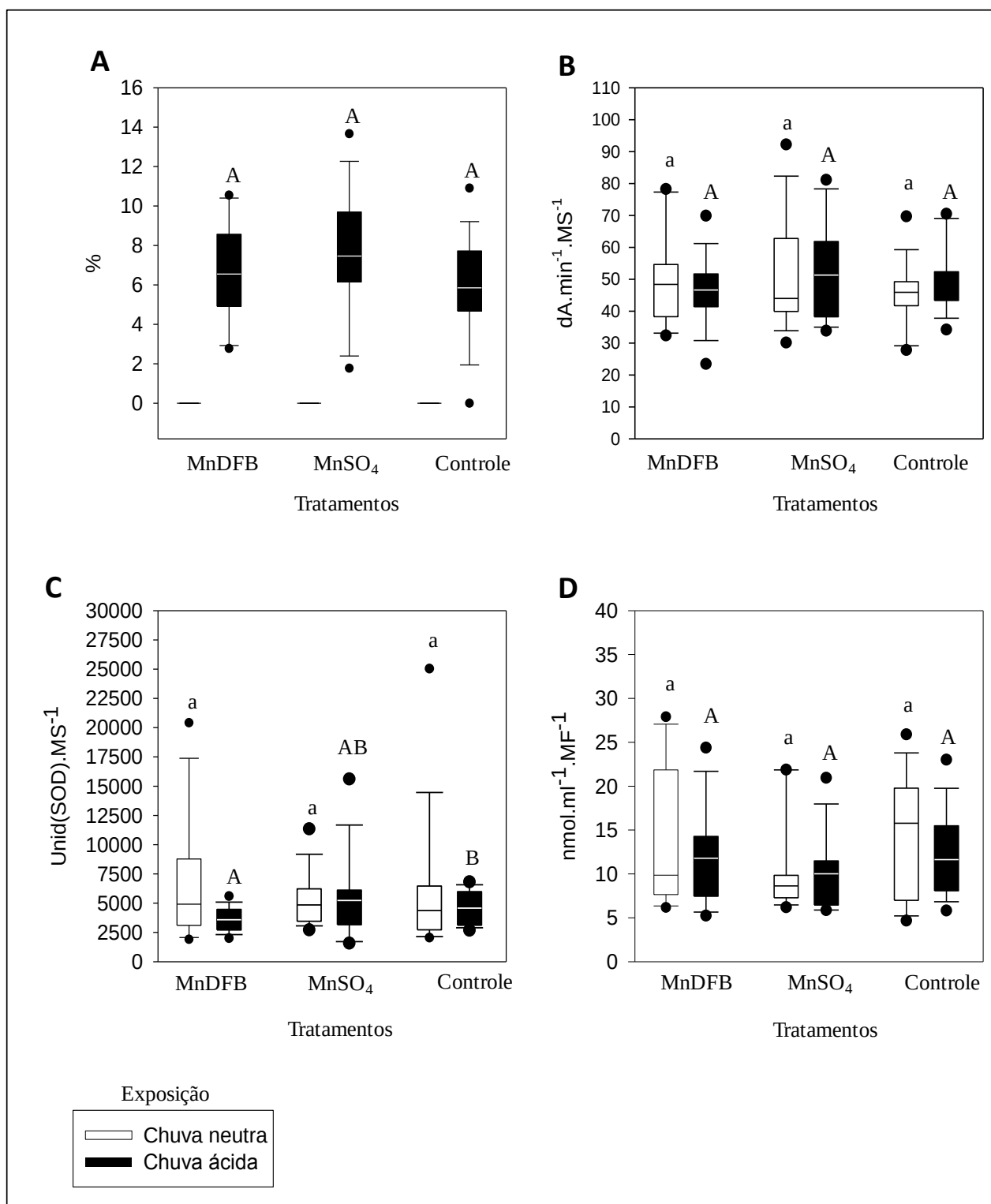


Figura 20. Variáveis dos indicadores de tolerância em folhas de soja tratadas com MnDFB ou MnSO₄ e não tratadas (controle), sob chuva neutra e chuva ácida. **A:** Índice de injúria foliar (IIF) (%); **B:** Atividade de APX (dA.min⁻¹.MS⁻¹); **C:** Atividade da SOD total (Unid[SOD].MS⁻¹); **D:** Concentração de MDA (nmol.ml⁻¹.MF⁻¹). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos na exposição à chuva neutra. As letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre tratamentos na exposição à chuva ácida. Injúrias foliares visíveis (**A**) não se manifestaram nas plantas submetidas à chuva neutra. As variáveis bioquímicas não apresentaram diferenças entre as exposições em cada tratamento (**B,C e D**).

Tabela 5. Valores médios e desvio-padrão ($\pm$) das variáveis indicadoras de tolerância em folhas de soja tratadas com MnDFB ou MnSO₄ e não tratadas (controle), sob exposição ao ar filtrado (AF), ozônio (O₃), chuva neutra ou chuva ácida.

Exposição	IIF (%)			APX (dA.min ⁻¹ .MS ⁻¹)			SOD total (Unid[SOD].MS ⁻¹)			MDA (nmol.ml ⁻¹ .MF ⁻¹)		
	MnDFB	MnSO ₄	Controle	MnDFB	MnSO ₄	Controle	MnDFB	MnSO ₄	Controle	MnDFB	MnSO ₄	Controle
Ar filtrado (AF)	0	0	0	31,76 ±9,42 a	34,37 ±16,06 a	27,8 ±6,62 a	6024,33 ±2774,18 a	7411,33 ±6968,10 a	5647,87 ±3263,35 a	9,97 ±1,96 a	8,80 ±1,8 a*	10,45 ±2,99 a
Ozônio (O₃)	16,6 ±10,6 A	13,5 ±10,3 A	13,3 ±8,3 A	33,32 ±7,86 A	36,27 ±17,06 A	33,68 ±11,30 A	4591,09 ±1567,35 A	4437,47 ±1601,29 A	5821,67 ±2450,50 A	13,23 ±3,96 A	11,83 ±3,77 A*	14,35 ±6,61 A
Chuva neutra	0	0	0	49,97 ±14,85 a	50,12 ±10,69 a	45,35 ±9,72 a	6799,79 ±5186,82 a	5217,88 ±2246,87 a	5586,27 ±5647,33 a	13,95 ±7,73 a	10,67 ±5,74 a	14,04 ±6,85 a
Chuva ácida	6,6 ±2,4 A	7,5 ±3,3 A	5,9 ±2,5 A	46,64 ±10,27 A	51,3 ±15,11 A	49,81 ±9,64 A	3580,83 ±1022,96 A	5227,14 ±3517,85 AB	4579,69 ±1344,87 B	11,79 ±5,48 A	10,02 ±4,08 A	11,64 ±4,72 A

IIF: Índice de injúria foliar; **APX:** atividade de ascorbato peroxidase; **SOD total:** atividade total de superóxido dismutase; **MDA:** concentração de malondialdeído. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre tratamentos nas câmaras com ar filtrado ou chuva neutra (i.e. exposições sem estressores). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos em cada uma das câmaras com ozônio ou chuva ácida. O asterisco indica diferença entre exposição ao AF e O₃ em plantas sob o mesmo tratamento. Injúrias foliares visíveis não se manifestaram nas plantas submetidas ao AF e chuva neutra.

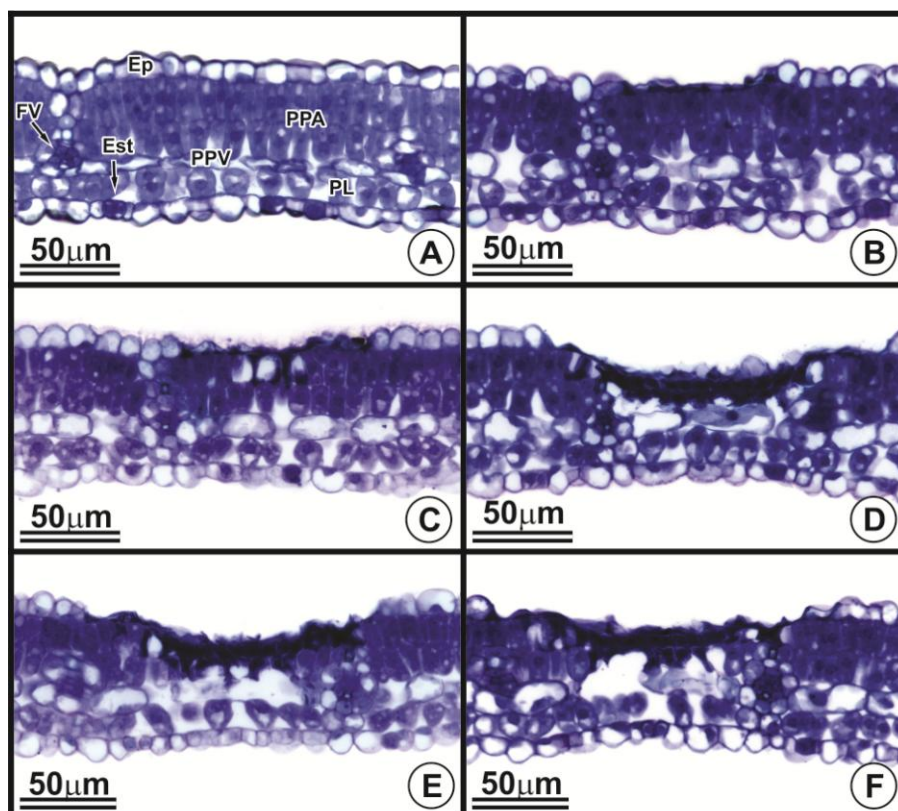


Figura 21. Cortes transversais do mesofilo de plantas de soja sob tratamento controle e submetidas à exposição em câmara de chuva simulada. **A:** Chuva neutra; **B-F:** Chuva Ácida. Abreviaturas: Epi-derme (Ep), Parênquima Paliçádico (PPA), Parênquima Para venal (PPV), Parênquima Lacunoso (PL), Feixe Vascular (FV) e Estômatos (Est). Micrografias realizadas por Talles Oliveira dos Anjos (Departamento de Biologia Vegetal – UFV).

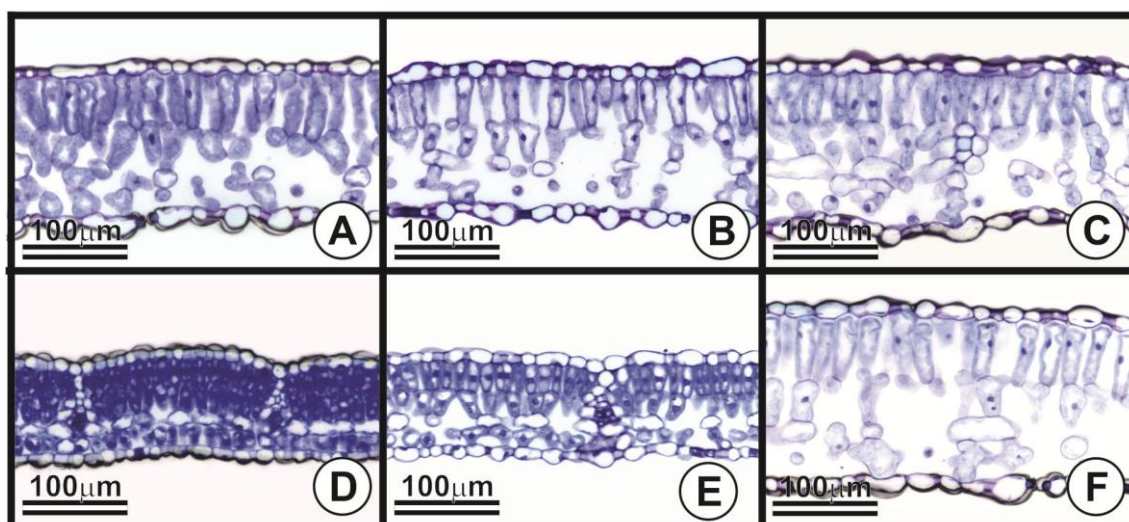


Figura 22. Cortes transversais apresentando a espessura do mesofilo de plantas de soja submetidas a diferentes tratamentos. **A, B e C:** Chuva neutra; **D, E e F:** Exposição à chuva ácida. As figuras **A e D:** Controle; **B e E:** Tratamento $MnSO_4$; **C e F:** Tratamento MnDFB. Micrografias realizadas por Talles Oliveira dos Anjos (Departamento de Biologia Vegetal – UFV).

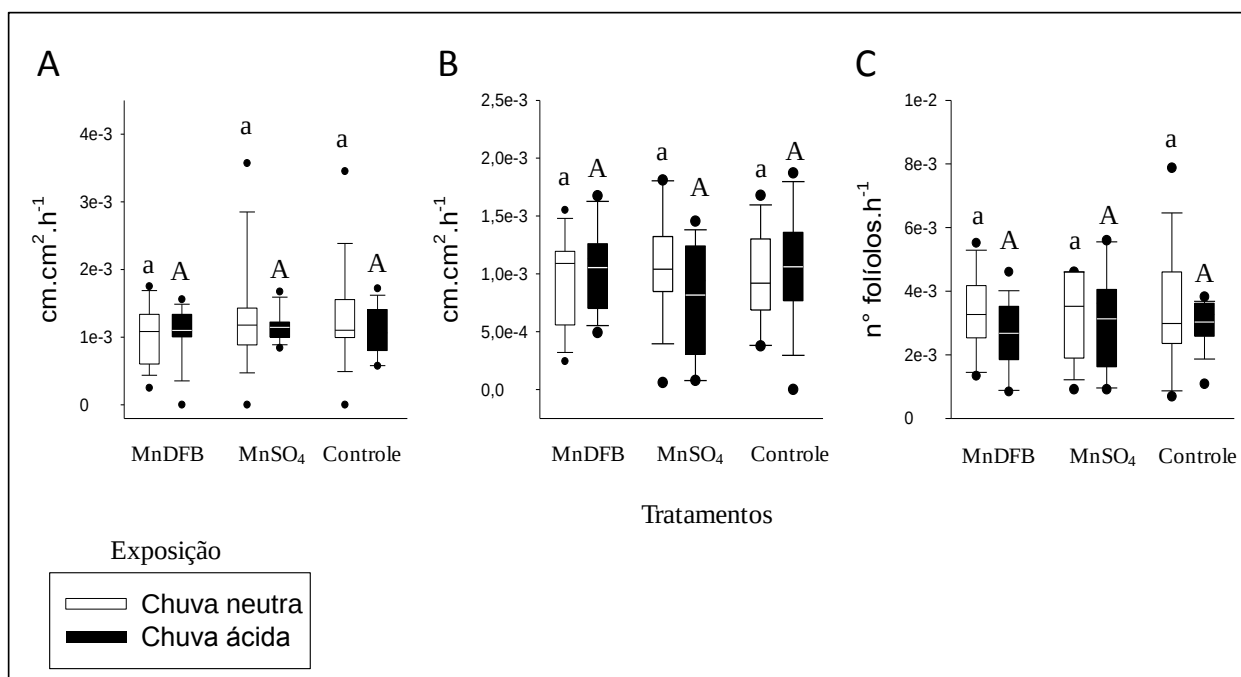


Figura 23 .Taxa de crescimento relativo (TCR) dos órgãos aéreos de *Glycine max*. **A:** TCR em altura do caule (cm.cm².h⁻¹); **B:** TCR em diâmetro do caule (cm.cm².h⁻¹); **C:** TCR em número de folíolos (nº folíolos.h⁻¹). Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos (MnDFB, MnSO₄ e controle) para plantas expostas à chuva neutra. As letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença estatística entre os tratamentos para plantas expostas à chuva ácida. Não houve diferença entre plantas expostas às chuva neutra e ácida sob o mesmo tratamento.

Como já confirmado nos experimentos anteriores, o MnDFB é um potencial regulador da atividade das SOD em plantas de soja saudáveis e sob ozônio. Em chuva ácida, a SOD total (Figura 20C; Tabela 5) das plantas tratadas com MnDFB reduziu sua atividade em relação ao tratamento controle, o que poderia indicar que o complexo ou agiu mimetizando a SOD e sequestrando as ERs, levando à supressão de geração SOD, ou ainda, que a SOD gerada pelo complexo ao longo dos dias de exposição foi consumida no processo de defesa. A menor atividade da SOD total não indica qual isoenzima foi ativada no processo. Avaliando as isoenzimas (Figura 24), observou-se maior atividade das MnSOD e Cu/ZnSOD e menor atividade de FeSOD no tratamento MnDFB comparado com o tratamento controle, sob chuva ácida, o que pode supor que a atividade da FeSOD é a que mais contribui para a atividade da SOD total, já que essa foi reduzida nesse tratamento. Porém, a FeSOD

pode não ser tão atuante na defesa antioxidativa como a Cu/ZnSOD , que foram mais ativas e que são amplamente distribuídas no meio celular.

As plantas expostas à chuva neutra não mostraram grande variação na atividade das isoenzimas entre os tratamentos e o controle (Figura 24). Este resultado é inesperado, já que nos experimentos anteriores, em ausência de fator de estresse (Figura 10 e 18), foi marcante a diferença na atividade da isoenzimas SOD entre o tratamento MnDFB e controle. É importante ressaltar, que nos experimentos anteriores as plantas foram cultivadas em casa de vegetação com ar filtrado e condições climáticas controladas. Além disto, nestes experimentos as plantas foram cultivadas durante o verão, com alta incidência de luz solar, ou seja, cultivada na condição ideal para o seu desenvolvimento (capítulo 2 item 2.2.2). Entretanto, no experimento de chuva simulada as plantas foram cultivadas em casa de vegetação sem ar filtrado e em condições de menor incidência de radiação solar e temperatura (Tabela 3). Esses fatores externos pode ter elevados os níveis basais de SOD , tornando imperceptível a contribuição do MnDFB na atividade das isoenzimas das plantas exposta à chuva neutra.

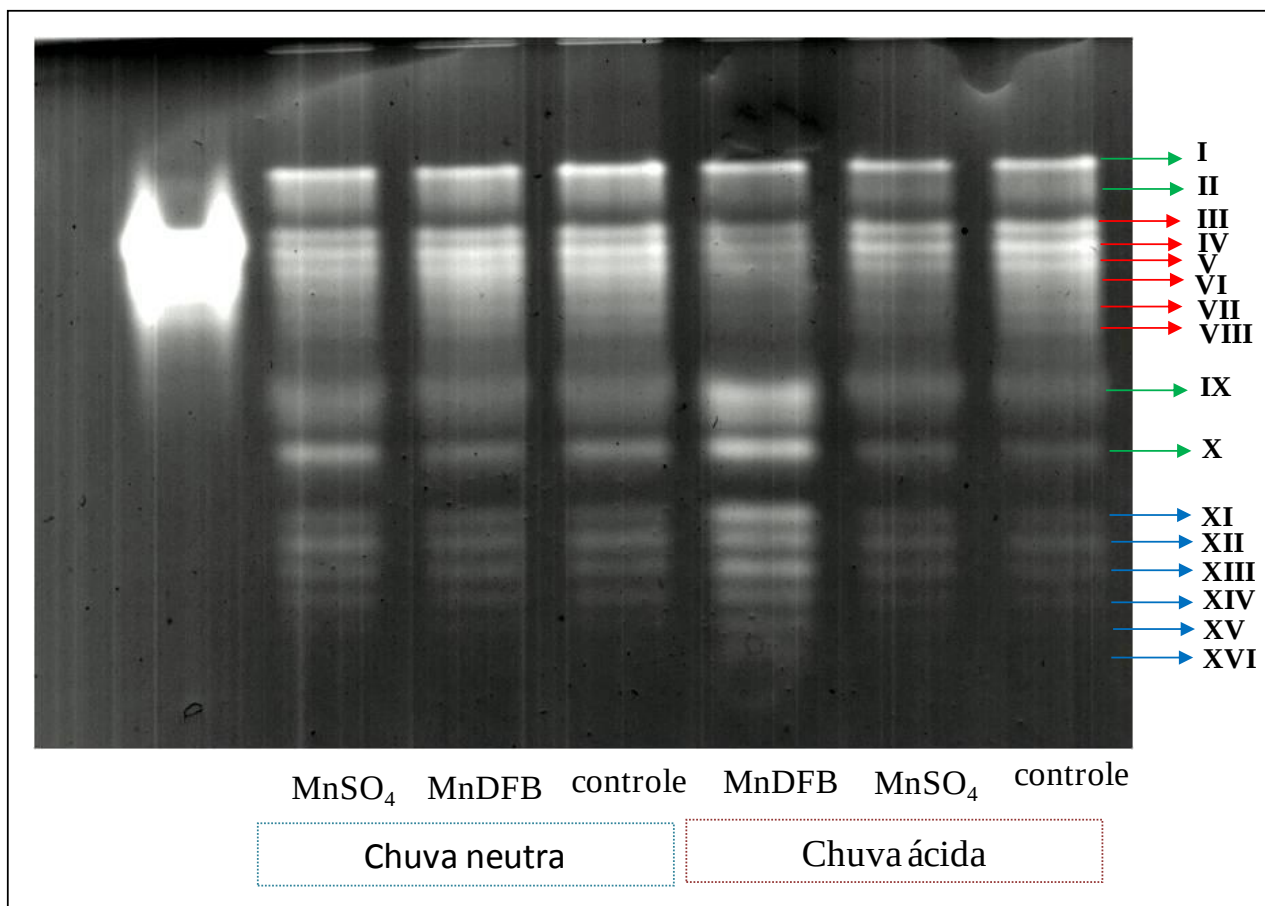


Figura 24. Atividade de isoenzimas superóxido dismutase (SOD) em gel de poliacrilamida de plantas sob diferentes tratamentos (MnDFB, MnSO_4 e controle) e expostas à chuva simulada (chuva neutra e chuva ácida). Cada flecha indica uma banda, onde I, II, IX e X são MnSOD; III a VIII são FeSOD; XI a XVI são Cu/ZnSOD.

A concentração de Cu e Fe nas folhas de plantas submetidas aos diferentes tratamentos e expostas a chuva ácida foi maior que na chuva neutra enquanto a concentração de Mn não foi alterada (Figura 25A). Essa diferença pode ser devido à acidez da água da chuva, pois é conhecido que a diminuição do pH no solo acarreta disponibilização de metais (Wang et al. 2000, Schulze et al., 2002, Jonard 2012). Na chuva ácida, a concentração de Cu nas folhas foi maior no tratamento controle que nos tratamentos com MnDFB e MnSO_4 .

Nas raízes, a concentração dos metais das plantas sob diferentes tratamentos não apresentou diferença significativa entre a chuva ácida e chuva neutra, exceto o Cu que foi menor nas plantas tratadas com MnDFB expostas à chuva ácida (Figura 25B).

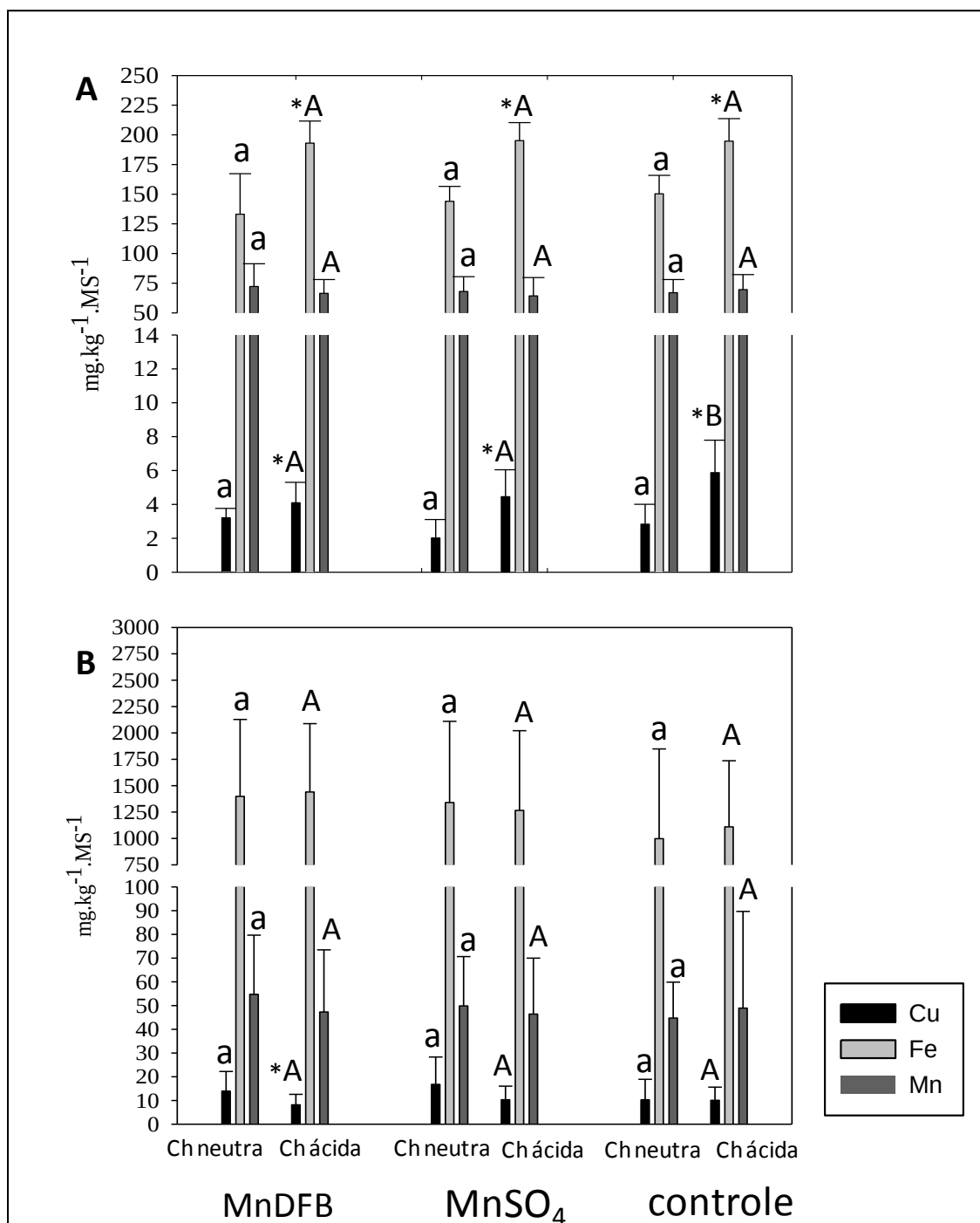


Figura 25. Concentração média e desvio-padrão de metais em folhas (A) e raízes (B) de plantas de soja sob diferentes tratamentos e expostas à chuva simulada. As letras minúsculas e maiúsculas indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$) na exposição ao chuva neutra e a chuva ácida, respectivamente, entre diferentes tratamentos. O asterisco indica diferença entre plantas sob o mesmo tratamento.

Há evidências claras que a quantidade de metais no meio afeta a síntese de isoenzimas SOD (Culotta 2001), entretanto, em situação de estresse, a atividade das isoenzimas pode não estar diretamente relacionada com a concentração dos metais cofatores, pois outras vias de indução da SOD são desencadeadas simultaneamente. Esse fato foi observado tanto nas exposições com ozônio quanto na chuva ácida, nesta última houve incremento de Cu e Fe nas folhas, independentemente do tratamento, e sem relação direta com atividade das Cu/ZnSOD e FeSOD (Figura 23 e 24). Como já mencionado, as isoenzima possui diferentes isoformas que podem ou não atuar na mesma organela. Kliebenstein *et al.* (1998) observou que em *Arabidopsis* o RNAm das Cu/ZnSOD do citosol e peroxissomos foi induzido rápida e positivamente sob estresse oxidativo enquanto a codificação do RNAm para a Cu/ZnSOD do cloroplasto foi diminuída, mas houve aumento dramático da codificação de uma das isoformas de FeSOD. Portanto, sob estresse, a sensibilidade de cada organela e a regulação genética podem influenciar mais que a disponibilização extra de cofatores metálicos.

3.4. CONCLUSÃO

Nas condições estudadas, o ozônio e a chuva ácida promoveram estresse oxidativo nas plantas de soja tratadas com MnSO_4 e controle e o contrário foi observado nas plantas submetidas ao MnDFB.

A variação de pH da água da chuva influenciou positivamente a absorção dos metais para as folhas, mas estes não pareceram regular no aumento da atividade das SOD nas plantas tratadas com MnDFB.

O complexo MnDFB apresentou potencial para aumentar a tolerância das plantas sob 60ppb de ozônio e chuva ácida (pH 3,0) por 3 dias, porém, o mecanismo de ação o qual o complexo atua para ativação das defesas antioxidativas não foi possível ser elucidado nesse trabalho.

3.5. REFERÊNCIAS

- Alves, P.L.C.A., Oliva, M.A., Cambraia, J. & Sant'Anna, R.** 1990. Efeitos da chuva ácida simulada e de um solo de Cubatão (SP) sobre parâmetros relacionados com a fotossíntese e a transpiração de plantas de soja. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 2:7-14.
- Arora, A., Sairam, R.K. & Srivastava, G.C.** 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10): 1227-1239.
- Baker, N.R.** 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 89-113.
- Britz, S.J. & Robinson, M.** 2001. Chronic ozone exposure and photosynthate partitioning into starch in soybean leaves. *International Journal of Plant Sciences*, 162(1): 111-117.
- Bulbovas, P., Souza, S.R., Moraes, R.M., Luizão, F. & Artaxo, P.** 2007. Plântulas de soja Tracajá' expostas ao ozônio sob condições controladas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(5): 641-646.
- Bussotti, F., Desotgiua, R., Cascio, C., Pollastrini, M., Gravano, E., Gerosab, G., Nali, C., Lorenzini, G., Salvatori, E., Manes, F., Schaube, M. & Strasser, R.J.** 2011. Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll *a* fluorescence. A critical reassessment of existing data. *Environmental and Experimental Botany*, 73:19-30.
- 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.
- Calatayud, A., Iglesias, D.J., Talon, M. & Barreno, E.** 2004. Response of spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.) to ozone measured by gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant systems, and lipid peroxidation. *Photosynthetica*, 42(1): 23-29.
- Castagna, A. & Ranieri, A.** 2009. Detoxification and repair of ozone injury: from O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution*, 157:1461-1469.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental).** 2010. Qualidade do ar no Estado de São Paulo 2011. Série relatórios, São Paulo, 234p.
- Chappelka, A.H., Chevone, B.I. & Burk, T.E.** 1985. Growth response of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) seedlings to ozone, sulfur dioxide, and simulated acidic precipitation, alone and in combination. *Environmental and Experimental Botany*, 25(3):233-244.
- Chernikova, T., Robinson, J.M., Lee, E.H. & Mulchi, C.L.** 2000. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynthesis Research* 64: 15-26.
- Cho, K., Tiwari, S., Agrawal, S.B., Torres, N.L., Agrawal, M., Sarkar, A., Shibato, J., Agrawal, G.K., Kubo, A. & Rakwal, R.** 2011. Tropospheric ozone and plants: absorption, responses, and consequences. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 212: 61-212.

- Culotta, V.C.** 2001. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Current Topics in cellular regulation*, 36: 117- 132.
- Esposito, M.P., Ferreira, M.L., Sant'Anna, S.M.R., Domingos, M. & Souza, S.R.** 2009. Relationship between leaf antioxidants and zone injury in *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' under environmental conditions in São Paulo, SE – Brazil. *Environmental Pollution*, 43(3): 619-623.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., Burmood, D.T. & Pennington, J.S.** 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11(6): 929-931.
- Ferreira, M.L., Esposito, J.B.N., Souza, S.R. & Domingos, M.** 2012. Critical analysis of the potential of *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' for ozone biomonitoring in sub-tropics. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(7): 1959-1967.
- Fiscus, E. L., Booker, F.L. & Burkey, K.O.** 2005. Crop responses to ozone: uptake modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell and Environment*, 28: 997-1011.
- Fowler, D., Cape, J.N., Coyle, M., Smith, R.I, Hjellbrekke, A.-G., Simpson, D., Derwent, R.G. & Johson, C.E.** 1999. Modelling photochemical oxidant formation, transport, deposition and exposure of terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100: 43-55.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P.; Sanz, M.J.; Domingos, M. & Salatino, A.** 2008. *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., a native Atlantic Forest species, as a bio-indicator of ozone: visible injury. *Environmental Pollution*, 152: 361-365.
- Günthardt-Goerg, M. & Vollenweider, P.** 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: new diagnostics perspectives. *Environmental Pollution*, 147: 467-488.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.** 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4ed. Oxford University Press., New York, pp. 1 – 851.
- Hahn, S.M., Krishna, C.M., Samuni, A., Mitchell, J.B. & Russo, A.** 1991. Mn(III)-Desferrioxamine superoxide dismutase-mimic: alternatives modes of action. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(1): 215-219.
- Heath, R.L.** 2008. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change? *Environmental Pollution*, 155: 453-463.
- Ito, K., Uchiyama, Y., Kurokami, N., Sugano, K. & Nakanishi, Y.** 2011. Soil acidification and decline of trees in forests within the precincts of shrines in Kyoto (Japan). *Water, Air and Soil Pollution*, 214: 197-204.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change).** 2007. *Climate Change 2007: Working Group I: The Physical Science Basis - 7.4.4.1 Present-Day Budgets of Ozone and its Precursors*. Disponível on-line em <http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg1/en/ch7s7-4-4.html> Acesso em: 28 abril.2012.
- Jonard, M., Legout, A., Nicolas, M., Dambrine, E. Nys, C., Ulrich, E., Van der Perre, R. & Ponette, Q.** 2012. Deterioration of Norway spruce vitality despite a sharp decline in acid deposition: a long-term integrated perspective. *Global Change Biology*, 18: 711-725.

- Karnovsky, M.J.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. 27, 137-138.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R-A. & Last, R.L.** 1998. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*, 118:637-650.
- Klopper, W., Tew, D.P., García-González, N. & Olzmann, M.** 2008. Heat of formation of the HOSO₂ radical from accurate quantum chemical calculations. *Journal of Chemical Physics*, 129: 114308-114314.
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Rima Artes e Textos, São Carlos, pp.341-478.
- Lee, S-H., Ahsan, N., Lee, K-W., Kim, D-H., Lee, D-G., Kwak, S-S., Kwon, S-Y., Kim, T-H. & Lee, B-H.** 2007. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range abiotic stresses.
- Liu, E-U. & Liu, C-P.** 2011. Effects of simulated acid rain on the antioxidative system in *Cinnamomum philippinense* seedlings. *Water, Air and Soil Pollution*, 215: 127-135.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490-498.
- Moraes, R.M., Furlan, C.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Meirelles, S.T., Delitti, W.B.C., Salatiño, A. & Sanz, M.J.** 2004. Photosynthetic responses of tropical trees to short-term exposure to ozone. *Photosynthetica*, 42: 291-293.
- Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S. & Soava, C.** 2004. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increase resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *The Plant Journal*, 38:940-953.
- Nebel, B.J. & Wright, R.T.** 2000. *Environmental Science – Chapter 22 Atmospheric Pollution*. 7ed. Prentice Hall, New Jersey, 2000, 664p.
- Neves, N.R., Oliva, M.A., Centeno, D.C., Costa, A.C., Ribas, R.F. & Pereira, E.G.** 2009. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: potential use in environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 407: 3740-3745.
- Norby, R.J., Richter, D.D. & Luxmoore, R.J.** 1985. Physiological processes in soybean inhibited by gaseous pollutants but not by acid rain. *New Phytologist*, 100: 79-85.
- O'Brien, T.P. & McCully, M.E.** 1981. *The study of plant structure principles and select methods*. Melbourne: Termarcaphi Pty, 45 p.
- Orlando, J.P., Alvim, D.S., Yamazaki, A., Corrêa, S.M & Gatti, L.V.** 2010. Ozone precursors for the São Paulo Metropolitan Area. *Science of the Total Environment*, 408 (2010) 1612 – 1620.

- Pinto, D.M., Blande, J.D., Souza, S.R.; Nerg, A-M. & Holopainen, J.K.** 2010. Plant volatile organic compounds (VOCs) in ozone (O₃) polluted atmospheres: the ecological effects. *Journal of Chemical Ecology* 36: 22-34.
- Pitcher, L.H. & Zilinskas, B.A.** 1996. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiology*, 110: 583-588.
- Sant'Anna, S.M.R., Esposito, M.P., Domingos, M., Souza, S.R.** 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* 151, 389–394.
- Sant'Anna-Santos, B.F., Silva, L.C., Azevedo, A.A. & Aguiar, R.** 2006. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(2): 313-321.
- Savva, Y. & Berninger, F.** 2010. Sulphur deposition causes a large-scale growth decline in boreal forests in Eurasia. *Global Biogeochemical Cycles*, 24:1-14.
- Scebba, F., Pucciarelli, I., Soldatini, G.F. & Ranieri, A.** 2003. O₃-induced changes in the antioxidant systems and their relationship to different degrees of susceptibility of two clover species. *Plant Science*, 165: 583-593.
- Šebesta, J., Samonil, P., Lacina, J., Oulehle, F., Houška, J. & Buček, A.** 2011. Acidification of primeval forests in the Ukraine Carpathians: vegetation and soil changes over six decades. *Forest Ecology and Management*, 262: 1265-1279.
- Schulze, E.-D.; Beck, E. & Müller-Hohenstein, K.** 2005. *Plant Ecology*. Springer, Germany, 702p.
- Shvestova, T., Mwesigwa, J., Labady, A., Kelly, S., Thomas, D., Lewis, K. & Volkov, G.** 2002. Soybean electrophysiology: effects of acid rain. *Plant Science*, 162: 723-731.
- Silva, L.C., Azevedo, A.A., Silva, E.A.M. & Oliva, M.A.** 2005. Effects simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Australian Journal of Botany*, 53: 789-796.
- Smith, C.R., Vasilas, B.L., Banwart, W.L. & Walkers, W.M.** 1991. Physiological response of two soybean cultivars to simulated acid rain. *New Phytologist*, 119:53-60.
- Souza, S.R. & Pagliuso, J.** 2009. Design and assembly of an experimental laboratory for the study of atmosphere–plant interactions in the system of fumigation chambers. *Environmental Monitoring Assessment*. 5: 243-249 .
- Tsang, W.T., Bowler, C., Herouart, D., Van Camp, W., Villarroel, R., Genetello, C., Van Montagu, M. & Inze, D.** 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell*, 3: 783-792.
- VanLoon, G.W. & Duffy, S.J.** 2005. *Environmental Chemistry: A global perspective*. 2ed. Oxford University Press, New York, 515p.

- Wang, Y., Ying, Y., Chen, J. & Wang, X.** 2004. Transgenic Arabidopsis overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Science*, 167: 671–677.
- Wang, H.F., Takematsu, N. & Ambe, S.**2000. Effects of soil acidity on the uptake of trace elements in soybean and tomato plants. *Applied Radiation and Isotopes* 52 : 803-811.
- Whittmann, C., Matyssek, R., Pfanz, H. & Humar, M.** 2007. Effects of ozone impact on the gas exchange and chlorophyll fluorescence of juvenile birch stems (*Betula pendula* Roth.). *Environmental Polluitor*, 150: 258-266.
- Yu, J-Q. & Ye, S-F. & Huang, L-F.** 2002. Effects of simulated acid precipitation on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzymes in *Cucumis sativus* L. *Photosynthetica*, 40(3): 331-335.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O complexo MnDFB tem potencial para aumentar a tolerância de plantas de soja sob estresse oxidativo, já que estimula a síntese/atividade de isoenzimas superóxido dismutase (SOD), as quais atuam como primeira via de defesa antioxidativa. Este efeito parece variar em função da concentração do complexo aplicada e da natureza do agente estressor, porém resultados que elucidam a dose/resposta do MnDFB em diferentes níveis dos fatores de estresse precisam ser obtidos para comprovar sua ação na tolerância aos danos oxidativos.

O período de três dias entre a adição do complexo e a coleta de dados foi suficiente para identificar que o MnDFB atua sobre as SOD, porém não foi comprovado se este aumento da atividade da SOD restringiria o avanço dos danos causados pelo estresse oxidativo. Maior período de exposição ao estresse e diferentes intervalos de aplicação do MnDFB devem ser estudados para melhor compreensão do papel do complexo na ativação das SOD e na restrição dos sintomas.

Os resultados obtidos no presente estudo reforça a proposta de que o MnDFB pode atuar como mimético da SOD e/ou disponibilizar o DFB para sequestrar ou realocar metais cofatores da SOD. Os mecanismos pelos quais o MnDFB poderia atuar como antioxidante ainda não estão bem elucidados. Porém, nesse trabalho foi possível verificar que sua atuação é abrangente para todas as isoenzimas de SOD na ausência do estresse oxidativo e que na presença do estresse as isoenzimas são MnDFB-dependente. Estudos de expressão gênica poderiam contribuir para melhor entendimento da ação do MnDFB sobre a regulação das isoenzimas SOD e trazer à luz a eficácia de sua ação na tolerância ao estresse oxidativo.

ANEXOS

Anexo 1

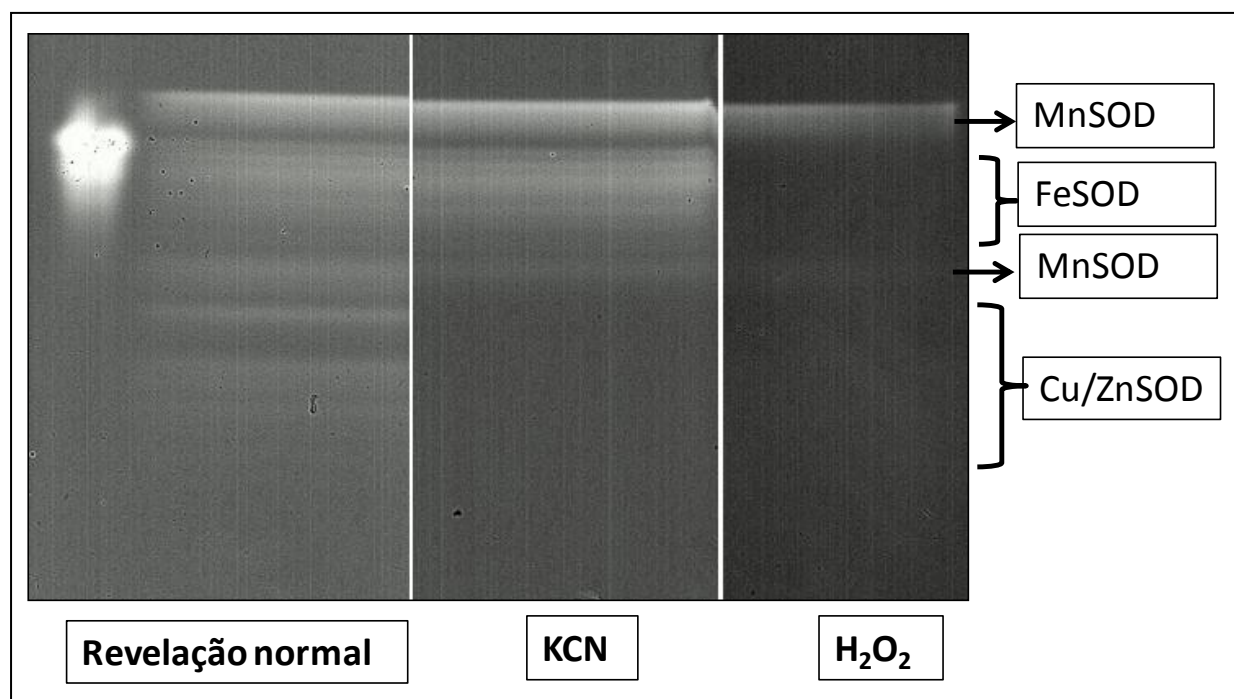


Figura 26. Revelação diferencial de isoenzimas. Partes de um único gel com mesma amostra revelado normalmente e partes tratadas com cianeto de potássio (KCN) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). KCN inibe a atividade de Cu/ZnSOD e H₂O₂ inibe Cu/ZnSOD e FeSOD.

Anexo 2

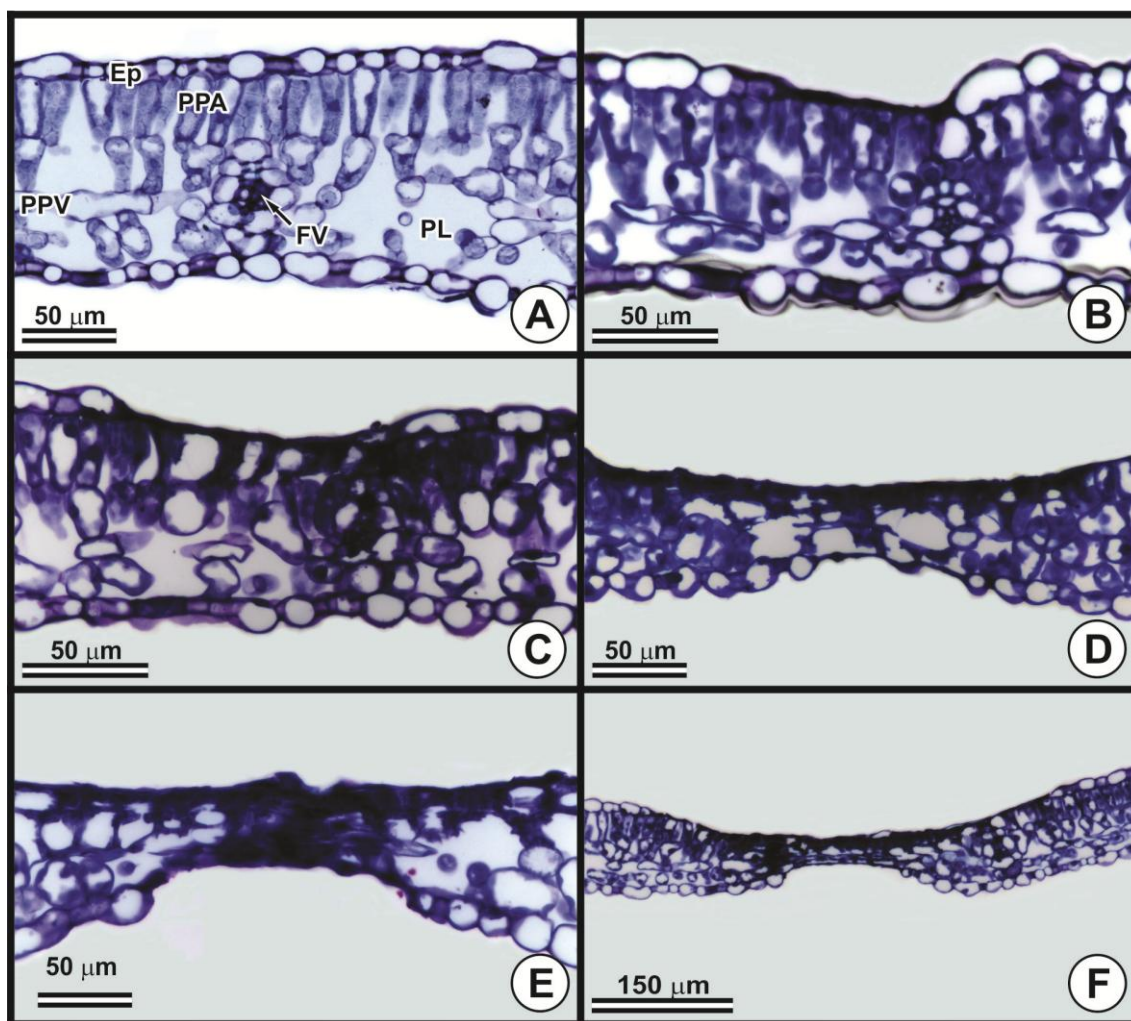


Figura 27. Cortes transversais do mesofilo de plantas *Glycine max* tratadas com o complexo MnDFB e expostas à chuva ácida. A: Tratamento MnDFB chuva neutra, Figuras B-F: Tratamento MnDFB Chuva Ácida. Abreviaturas: Epiderme (Ep), Parênquima Paliçádico (PPA), Parênquima Para venal (PPV), Parênquima Lacunoso (PL), Feixe Vascular (FV). Os cortes e fotografia foram realizados pelo aluno de Iniciação Científica Talles Oliveira dos Anjos sob orientação da pesquisadora Dra. Luzimar Campos da Silva.