

MARCELLE DAFRÉ

**Capacidade de oxi-redução de plantas de
Ipomoea nil (L.) Roth cv. Scarlet O'Hara em
área contaminada por ozônio, no Parque
Estadual das Fontes do Ipiranga - SP**

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

SÃO PAULO
2010

MARCELLE DAFRÉ

**Capacidade de oxi-redução de plantas de
Ipomoea nil (L.) Roth cv. Scarlet O'Hara em
área contaminada por ozônio, no Parque
Estadual das Fontes do Ipiranga - SP**

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. MARISA DOMINGOS

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Dafré, Marcelle

D124c Capacidade de oxi-redução de plantas de *Ipomoea nil* (L.) Roth cv. Scarlet O'Hara em área contaminada por ozônio, no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – SP / Marcelle Dafré -- São Paulo, 2010.
82 p. il.

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

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

CDU: 582.942

Dedico este trabalho a todos aqueles
que acreditam que as pequenas
mudanças farão um amanhã melhor.

“O sucesso quase sempre se forma com uma parte de ideal
e noventa e nove partes de suor na ação que o realiza”.

André Luiz

Agradecimentos

Não poderia deixar de agradecer, antes de tudo, a Deus pela oportunidade única e abençoada de estar viva;

Aos meus pais, a quem devo eterna gratidão, que além de viabilizar meu sonho de ser bióloga, me ensinaram, com seus exemplos de vida, a lutar, com muita perseverança e determinação pelos meus objetivos;

Ao meu marido que sempre me disse aquilo que eu precisava escutar. Nos momentos mais críticos, ele me fez parar para refletir quão simples eram as soluções para os meus problemas, quando observados por outro ponto de vista;

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Ana Paula e Ricardo que desde o início me ajudaram colocando “a mão na massa” em todas as etapas deste estudo. Posso dizer que esse trabalho não teria sido realizado sem vocês;

À amiga Daiane por estar perto sempre que eu precisava, no laboratório e nas minhas “crises existenciais”. Não sei se conseguirei retribuir tudo o que fez por mim, no entanto sempre esteja pronta para me pedir;

À Jéssica que sempre esteve pronta para colaborar em todas as atividades de laboratório, injetando amostras no HPLC e até mesmo lavando as vidrarias;

À Clarice por contribuir com seu capricho nos dias de amostragem;

À Sandra, por coletar e disponibilizar todos os dados de danos foliares utilizados neste trabalho;

A todas as colegas que participaram do Projeto Bioindicadores: Bárbara, Beleta, Juliana, Andréa e Fernanda;

Às funcionárias da seção de Ecologia: Amariles, Dorinha, Marli e Valdenice que sempre auxiliaram nas atividades de laboratório e demonstraram carinho durante os momentos mais difíceis;

À Patrícia Giampaoli pelo apoio na elaboração do abstract;

Aos alunos e estagiários da Seção de Ecologia, principalmente a Marísia e Murilo;

À Ms. Mirian Rinaldi que sempre esteve presente nos momentos cruciais de análises, ajudando com as metodologias e com os equipamentos;

À Dra Carla Ferragut e Dra. Patrícia Bulbovas pela paciência e dedicação ao me ensinar sobre o “mundo das PCAs”;

Aos pesquisadores: Dra. Edenise Segala Alves, Dra. Regina Maria de Moraes, Dr. Sergio Tadeu Meirelles e Dra. Silvia Ribeiro de Souza que contribuíram para a realização do Projeto Bioindicadores;

À minha orientadora Dra Marisa Domingos, que através de sua característica tranquilidade me guiou pelos caminhos mais simples e seguros, além de me oferecer o máximo de atenção para sanar todas as minhas dúvidas com clareza e paciência;

Ao Instituto de Botânica pela realização do experimento;

À FAPESP pelo auxílio financeiro que garantiu a execução deste trabalho ;

Ao IAG- USP pelo fornecimento de dados meteorológicos para a realização do projeto.

Índice

Introdução.....	1
Objetivos.....	16
Material e métodos	
Local de estudos.....	17
Cultivo e exposição das plantas.....	19
Análise de antioxidantes.....	23
Monitoramento das condições ambientais.....	25
Análise de sintomas foliares visíveis.....	26
Análises estatísticas.....	26
Resultados	
Condições Climáticas.....	28
Poluentes atmosféricos.....	29
Antioxidantes.....	31
Danos foliares visíveis.....	44
Fatores bióticos x fatores ambientais.....	47
Discussão.....	53
Conclusões.....	60
Resumo.....	61
Abstract.....	63
Referências bibliográficas.....	65

Abreviaturas Utilizadas

AA – ácido ascórbico
ACP – análise de componentes principais
AOTzero – dose acumulada de valores horários acima de zero ppb de ozônio
AOT20 – dose acumulada de valores horários acima de 20 ppb de ozônio
AOT40 – dose acumulada de valores horários acima de 40 ppb de ozônio
APX – ascorbato peroxidase
CARO- carotenóides
CAT – catalases
CH₄ – gás metano
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
CO – monóxido de carbono
CO₂ – dióxido de carbono
COVs – compostos orgânicos voláteis
DHA – deidroascorbato (AA oxidado)
DHAR- deidroascorbato redutase
EROs – espécies reativas de oxigênio
GPX- glutathione peroxidase
GR – glutathione reductase
GSH – glutathione reduzida
GSSG – glutathione oxidada
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HR-like – resposta semelhante à hipersensibilidade
IR – irradiação solar global
MDHA – monodeidroascorbato
MDHAR - monodeidroascorbato redutase
MP- material particulado
NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NO – monóxido de nitrogênio
NO₂ – dióxido de nitrogênio
NO_x – óxidos de nitrogênio
O[•] – oxigênio atômico
O₂ – gás oxigênio
O₃ – ozônio troposférico
O₂^{•-} – radical superóxido
OH⁻ – hidroxila
P- precipitação
PA- poliaminas;
POD – peroxidases totais
RO₂ – peroxi-radicaís
SO₂ – dióxido de enxofre
SOD – superóxido dismutase
T- temperatura
TOC- tocoferóis
UR- umidade relativa do ar
VRPP – Valor de Referência para Proteção da Produtividade Agrícola

Introdução Geral

O crescimento exponencial da população humana nos últimos séculos, proporcionando desmatamentos, poluição e rápida exploração de recursos não biológicos, tem provocado degradação ambiental, mudando a biosfera em uma escala e em uma intensidade que é comparável aos efeitos dos eventos geológicos massivos como as glaciações (Freedman 1995).

Houve também um aumento da demanda de energia associada ao crescimento econômico e industrialização na Ásia, África e América Latina, que resultou em aumento dramático das emissões de poluentes atmosféricos. A poluição atmosférica urbana é um dos principais problemas ambientais nos países em desenvolvimento (Mage *et al.* 1996; Baird 2002 b; Marshall 2003).

Define-se como poluição atmosférica a presença na atmosfera de substâncias ou energia em tal quantidade e duração de forma a causar danos à vida, estruturas e materiais construídos pelo homem ou provocar mudanças nas condições meteorológicas e climáticas (Yang & Omaye 2008).

Os poluentes atmosféricos podem ser emitidos por fontes naturais, como vulcões, queimadas espontâneas, por organismos anaeróbios ou por fontes antrópicas, principalmente pela queima de combustíveis fósseis, sendo que o funcionamento dos motores dos automóveis produz mais poluição do ar que qualquer outra atividade humana (Freedman 1995).

A queima de combustíveis fósseis emite gás carbônico (CO₂), óxidos de nitrogênio (NO_x) e dióxido de enxofre (SO₂) para a atmosfera. Se esta combustão for incompleta, são emitidos também monóxido de carbono (CO), partículas de carbono e vários hidrocarbonetos. O desmatamento e a queima de biomassa constituem atividades humanas importantes. A queima de biomassa produz CO₂, CO, metano (CH₄), gases-traço, material particulado (MP) e precursores de ozônio (O₃). O desmatamento favorece as emissões de óxido nitroso, que também pode ser emitido pelas atividades agrícolas, por intermédio do uso de fertilizantes (Domingos *et al.* 2002).

Segundo sua origem os poluentes atmosféricos podem ser classificados em primários: aqueles emitidos diretamente de sua fonte e secundários: aqueles produzidos como consequência da transformação e de reações químicas e físicas sofridas pelos poluentes primários com constituintes da atmosfera (Domingos *et al.* 2002; Ballester 2005; CETESB 2009).

Dentre os poluentes consagrados universalmente como indicadores da qualidade do ar estão alguns poluentes primários como: monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre

(SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂), material particulado com diâmetro de até 10 µm e alguns poluentes secundários como: ozônio (O₃) e aerossol secundário. A razão da escolha destes poluentes como indicadores de qualidade do ar está ligada a sua maior frequência de ocorrência e aos efeitos adversos que causam ao meio ambiente (CETESB 2009).

A contaminação da atmosfera por SO₂ e fuligem foi característica das fases iniciais da poluição atmosférica urbana durante e logo após a revolução industrial do séc. XVIII. Esta contaminação é freqüentemente chamada de redutora ou *smog* de inverno. O termo *smog* é utilizado para se referir a mistura de fumaça (smoke) com neblina (fog) (Freedman 1995; Ballester 2005; Yang & Omaye 2008). No inverno, episódios de poluição podem ocorrer devido à estagnação das condições atmosféricas, quando poluentes provenientes de combustão se concentram na atmosfera (Ballester 2005).

Um exemplo clássico de *smog* de inverno ocorreu em dezembro de 1952, quando uma fina camada de neblina envolveu Londres em temperatura próxima de 0°C. Esta neblina era formada de poluentes provenientes principalmente da queima de carvão. Oficialmente o número de mortes atribuído ao episódio ultrapassou 3000. Este evento ficou conhecido como “*Smog* de Londres de 1952” (Ballester 2005; Yang & Omaye 2008).

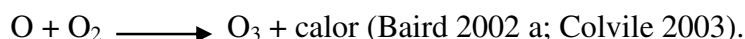
Outro tipo de *smog* foi primeiramente noticiado em Los Angeles, durante a Segunda Guerra Mundial. Esse fenômeno só acontecia em dias ensolarados e ficou conhecido como *smog* fotoquímico ou *smog* oxidante (Baird 2002 b; Yang & Omaye 2008). No Brasil, o primeiro *smog* fotoquímico registrado aconteceu na cidade de São Paulo, em 1972, e foi provocado, principalmente por emissões veiculares sob condições de inversão térmica e ausência de vento e chuva (Domingos *et al.* 2002).

A formação deste *smog* oxidante envolve um complexo grupo de reações fotoquímicas entre poluentes emitidos por atividades antrópicas e constituintes da atmosfera, resultando na formação de compostos químicos oxidantes (ozônio, nitrato de peroxiacetila, dióxido de nitrogênio e aldeídos). As concentrações destes oxidantes fotoquímicos exibem um característico padrão diurno, dependendo das taxas de emissão de seus precursores, intensidade da radiação solar e estabilidade atmosférica nos diferentes períodos do dia (Freedman 1995).

O ozônio, que está entre os constituintes oxidantes do *smog* fotoquímico mais tóxicos aos seres vivos, ocorre naturalmente em baixas concentrações na troposfera (Fowler *et al.* 1999; Bassin *et al.* 2004; Iriti & Faoro 2008), mas os produtos liberados pelo homem na queima incompleta de combustíveis fósseis altera o curso deste ciclo fotoquímico e as concentrações de ozônio ficam acima do normal (Manning *et al.* 2004).

Cabe lembrar que 90% do ozônio se encontra na estratosfera, formando a camada de ozônio, que é benéfica aos seres vivos (Bray *et al.* 2000), diferentemente do ozônio troposférico que é conhecido como um dos poluentes mais importantes do mundo (Iglesias *et al.* 2006).

A formação do ozônio estratosférico se dá através da seguinte reação:



Sua função é absorver as radiações nocivas UV-B e UV-C, protegendo os seres vivos (Iriti & Faoro 2008).

O ozônio troposférico, por sua vez, é formado através da reação entre óxidos de nitrogênio (NO e NO₂) e compostos orgânicos voláteis (COVs) em presença de luz solar. Ambos precursores podem ser emitidos por fontes antrópicas, especialmente veículos e indústrias ou por recursos biogênicos (Fowler *et al.* 1999; Ashmore 2003, 2005).

O tráfego é um dos principais fatores na emissão de NO_x. A tendência para o futuro é o aumento destas emissões, que influenciarão nas taxas de O₃ (Ashmore 2003).

O grupo dos COVs inclui uma larga extensão de hidrocarbonetos como alcanos, alcenos, aromáticos, aldeídos, cetonas, alcoóis, ésteres e alguns compostos clorinados (Ballester 2005).

A formação de ozônio, mostrada na figura 1, inicia-se pela fotólise do NO₂, o produto desta reação, O[•] reage rapidamente com O₂ e forma o O₃, enquanto que o outro produto NO reage com o O₃ para regenerar o NO₂ (CETESB 2000).

Os compostos orgânicos voláteis favorecem a formação de ozônio, pois, ao reagirem com os radicais hidroxila (OH[•]) ou sofrerem fotólise, formam os peroxi radicais (RO₂), que reagem com NO formando NO₂ (CETESB 2000). No entanto, são os óxidos de nitrogênio que determinam a taxa total de reação de formação do ozônio (Baird 2002 b).

Devido às correntes de ar, os poluentes podem ser transportados a longas distâncias, por isso muitas áreas que tem emissões esporádicas ficam sujeitas a casos regulares de alto nível de ozônio troposférico e de outros oxidantes do *smog* fotoquímico. As maiores concentrações de ozônio tendem a ocorrer em áreas rurais e suburbanas, diferentemente dos grandes perímetros urbanos, onde parte do ozônio é eliminada por reação com o óxido nítrico (Baird 2002 b; Emberson 2003; Iriti & Faoro 2008).

Para que uma cidade fique sujeita ao *smog* fotoquímico, várias condições devem ser satisfeitas: tráfego de veículo substancial, para haver emissões de NO e COVs; devem ocorrer temperaturas elevadas e radiação solar abundante; pouco movimento das massas de ar. Por

questões geográficas e de densidade populacional, cidades ensolaradas e quentes, como Los Angeles, Denver, México, Tóquio, Atenas, São Paulo e Roma, ajustam-se perfeitamente a estas condições (Baird 2002 b).

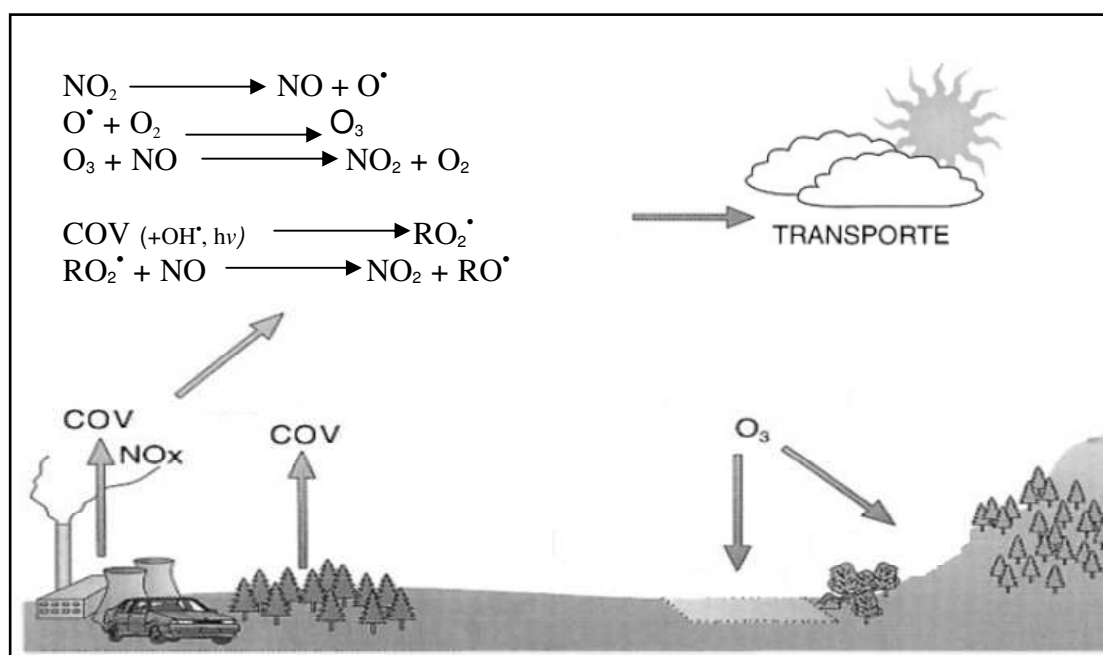


Figura 1. Reações do ciclo fotoquímico da formação de ozônio (figura modificada de Fowler *et al.* 1999).

A Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) é altamente industrializada, com aproximadamente 15 milhões de habitantes. Seu clima é caracterizado por inverno seco e verão chuvoso (Massambani & Andrade 1994). Nesta área, as emissões dos poluentes atmosféricos são originadas de cerca de 2000 indústrias com potencial poluidor e da frota registrada de aproximadamente 9,2 milhões de veículos (CETESB 2009). A principal fonte emissora de poluentes na RMSP são os veículos automotores leves e pesados, seguida pelas emissões oriundas dos processos industriais (Domingos *et al.* 2002).

Com relação ao comportamento do ozônio na RMSP, o perfil sazonal mostra maior ocorrência de altas concentrações desde o final do inverno até início do verão. A maior frequência não ocorre nos meses mais quentes e com maior incidência de radiação solar provavelmente pelo aumento da nebulosidade que ocorre nesses meses, o que reduz a quantidade de radiação solar que incide sobre a superfície, e conseqüentemente, diminui a formação do ozônio na baixa troposfera (CETESB 2000). Dentre os locais da RMSP monitorados para ozônio, foi na estação IPEN-USP, localizada na região oeste da cidade de São Paulo, em que se registraram as máximas concentrações horárias em 2008 (141 e 142 ppb) (CETESB 2009).

As concentrações globais de ozônio troposférico aumentaram 36% desde os tempos pré-industriais, devido ao aumento de emissões de NO_x e COVs (Karnosky *et al.* 2006) e tendem a aumentar no futuro próximo (Dizengremel *et al.* 2008). Medidas limitadas do século XIX sugerem que as concentrações pré-industriais eram menores que 10 ppb. Projeções baseadas no Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) indicam que as concentrações de ozônio poderiam aumentar 20%-25% entre 2015 e 2050 e depois aumentar 40%-60% em 2100 se as emissões continuarem (Wittig *et al.* 2007).

Elevadas concentrações de O₃ podem prejudicar a saúde de animais, humanos e plantas (Bassin *et al.* 2004). Em humanos e animais, o O₃ pode afetar o trato respiratório causando efeitos agudos e crônicos (Iriti & Faoro 2008). As ocorrências mais relatadas da exposição de seres humanos são irritação nos olhos, vias respiratórias e o agravamento de doenças respiratórias pré-existentes, como a asma (CETESB 2000). Além disso, está associado com o aumento de taxas de mortalidade devido às doenças cardiovasculares e respiratórias, bem como à diminuição da expectativa de vida (Iriti & Faoro 2008).

Os efeitos adversos do O₃ em plantas foram observados pela primeira vez em 1950 (Ashmore 2005). Coníferas da Califórnia (EUA) apresentaram injúrias caracterizadas por ferrugem nas suas acículas. Após diversos experimentos em campo e com câmaras de fumigação, em 1960, estes sintomas foram relacionados às altas concentrações de O₃ na região (Arbaugh *et al.* 2003; Karnosky *et al.* 2006). As câmaras de fumigação são sistemas abertos ou fechados, onde ocorre a formação e monitoramento de ozônio, para avaliar os impactos do ozônio sobre as plantas (Karnosky *et al.* 2006).

Tipo de solo, topografia, condições meteorológicas, estado nutricional das plantas e competição entre espécies afetam a forma pela qual uma planta responde a uma concentração ou dose específica de um poluente ou mistura de poluentes (Domingos *et al.* 2002).

No entanto, os efeitos do ozônio sobre as plantas também dependem da dose de ozônio a que são submetidas, que pode ser: aguda, quando recebem altas concentrações de ozônio (acima de 80 ppb) por algumas horas até dias ou crônica, quando recebem baixas concentrações de ozônio (abaixo de 40 ppb) por um longo período, como uma vida inteira, com episódios intermitentes de altas concentrações (Iriti & Faoro 2008).

Doses agudas de ozônio geralmente levam a resposta de hipersensibilidade similar àquela promovida pela incompatibilidade da interação das plantas- patógenos (HR-like), uma forma de morte celular programada, que conduz a formação de sintomas visíveis foliares (Iriti & Faoro 2008). Doses crônicas, por outro lado, podem causar: redução da fotossíntese, o que está associada ao declínio da eficiência da carboxilação, do sistema de transporte de elétrons e efeitos diretos nos estômatos (Paoletti *et al.* 2009); redução do crescimento e aceleração da

senescência foliar, que resultam na disfunção da transpiração e eficiência do uso da água (Di Baccio *et al.* 2008); redução da produção de massa seca, efeitos na floração e extensão do tubo polínico e perdas econômicas (Iriti & Faoro 2008).

Avaliações do impacto econômico do ozônio sobre a agricultura têm indicado perdas de 2 a 4 bilhões de dólares nos EUA e de 4 bilhões de euros na Europa, embora existam muitas suposições envolvidas nestas estimativas (Ashmore 2005). No final da década de 80, os EUA perderam 5% da produção nacional, devido às perdas agrícolas. A redução das concentrações de O₃ em 40%, resultaram em um benefício econômico a este país de 3 bilhões anuais (Singh *et al.* 2009).

Esses impactos econômicos e ecológicos resultam na necessidade de proposição de padrões específicos para a proteção da vegetação e das culturas agrícolas (Paoletti & Manning 2007).

Na Europa, a fim de prever os efeitos do ozônio em plantas superiores, um nível crítico de ozônio foi proposto, baseado em um parâmetro cumulativo de longo prazo: a AOT40, que é a soma das diferenças das concentrações horárias acima de 40 ppb durante as horas de luz da estação de crescimento (Manes *et al.* 2007; Dizengremel *et al.* 2008). Nos EUA e Canadá, por sua vez, têm-se utilizado o SUM60, que é a soma das diferenças das concentrações horárias acima de 60 ppb no período de luz (Paoletti & Manning 2007).

Com o intuito de proteger a saúde da população e minimizar danos à fauna e flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral, no Brasil, o CONAMA propôs a resolução N° 03 de 28/06/90, que estabeleceu como padrão nacional de qualidade do ar para ozônio, uma concentração de 81,63 ppb (= 160 µg/m³) por uma hora, sendo que este valor não deve ser excedido mais de uma vez ao ano (CETESB 2009). No entanto, ressalta-se que espécies de plantas sensíveis podem apresentar injúrias com concentrações bem menores (Freedman 1995).

A CETESB utiliza para proteção da vegetação, o Valor de Referência para Proteção da Produtividade Agrícola (VRPP) preconizado pela Organização Mundial da Saúde e estabelecido com base na AOT40. O VRPP é uma AOT40 de 3.000 ppb.h de ozônio acumulada no período de 3 meses (AOT40 trimestral). A Organização Mundial da Saúde também propõe uma AOT40 de 200 ppb acumulada no período de 5 dias, para o aparecimento de injúrias visíveis em plantas sensíveis (CETESB 2009).

O ozônio entra na planta através dos estômatos e, quando se encontra no espaço intercelular foliar (apoplasto), é convertido em espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (OH[•]) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sharma & Davis 1997; Dizengremel *et al.* 2008; Iriti & Faoro 2008).

O $O_2^{\bullet -}$ tem como alvo principal as enzimas, o H_2O_2 , os ácidos graxos insaturados e $OH^{\bullet}$ pode reagir com todas as biomoléculas (Muggli 1993). Embora o $O_2^{\bullet -}$ e o H_2O_2 sejam as EROs menos reativas, elas não são menos prejudiciais já que podem se difundir por qualquer compartimento celular, além de iniciar reações em cascata que resultam na produção de $OH^{\bullet}$ e outras espécies reativas como peróxidos lipídicos (Noctor & Foyer 1998; Di Baccio *et al.* 2008).

As membranas celulares são os alvos primários das EROs provenientes do ozônio, estimulando a peroxidação lipídica, que além de prejudicar a permeabilidade da membrana, inicia uma série de reações intermediárias, que produzem novas espécies reativas de oxigênio, que também reagem com as biomoléculas, como DNA, membranas lipídicas e proteínas (Muggli 1993; Sharma & Davis 1997; Iriti & Faoro 2008).

As EROs são naturalmente produzidas como subprodutos de várias vias metabólicas, localizadas em vários compartimentos celulares, como nas mitocôndrias, peroxissomos e cloroplastos (Noctor & Foyer 1998; Apel & Hirt 2004). Além disso, em plantas superiores estas EROs podem ser mensageiras secundárias em muitos processos associados com o crescimento e desenvolvimento da planta (Hong-bo *et al.* 2008).

As EROs são componentes chaves no controle do estado redox celular. Elas participam de todos os processos controlados por reação redox (redução-oxidação), inclusive transdução de sinais, expressão gênica, síntese e quebra de proteínas e regulação de metabolismo (Hong-bo *et al.* 2008). Geração de EROs em compartimentos celulares resultam em mudanças nas transcrições que ocorrem no núcleo, indicando que informações das organelas precisam chegar ao núcleo. (Apel & Hirt 2004).

Entretanto, em condições normais a produção de EROS é baixa e muitos fatores de estresse podem desregular a homeostase celular, aumentando sua produção (Mittler 2002). Esse é o caso do estresse biótico. Uma das mais rápidas reações de defesa contra o ataque de patógenos é a explosão oxidativa, que constitui na produção de EROs no local de invasão (Apel & Hirt 2004). Elas também limitam a propagação da infecção do patógeno por reforçar a parede celular e por matar diretamente o patógeno, além de servirem como moléculas sinalizadoras durante a resistência sistêmica e local adquiridas (Dat *et al.* 2000).

Fatores abióticos também provocam o aumento da produção de EROs como a seca, estresse salino, extremos de temperatura, choque térmico, metais pesados, radiação ultravioleta, poluentes atmosféricos como O_3 e SO_2 , estresse mecânico, privação de nutrientes, intensa luminosidade, ventos e herbicidas (Bray *et al.* 2000; Dat *et al.* 2000; Mittler 2002).

A intensidade da resposta das plantas ao estresse causado pela poluição depende de sua resistência aos poluentes, que é determinada por fatores externos e internos. A resistência a poluição pode ser determinada por mecanismos que impeçam a absorção de poluentes (evitação do estresse) e por mecanismos de desintoxicação do poluente absorvido (tolerância ao estresse). Ambos os tipos de resistência são determinados geneticamente e estão sujeitos a influências ambientais (Domingos *et al.* 2002).

As plantas podem tolerar esse estresse, neutralizando as EROs através do sistema de defesa antioxidante, que envolve metabólitos e enzimas, distribuído desigualmente entre os compartimentos celulares, como mostra a figura 2 (Bray *et al.* 2000; Paoletti *et al.* 2008).

O termo antioxidante pode ser definido como qualquer composto capaz de neutralizar as EROs, sem se converter em um radical destrutivo. Os antioxidantes têm a função de interromper as cascatas de oxidações incontroláveis (Noctor & Foyer 1998).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos estão os compostos com alto potencial redutor, como o ácido ascórbico, carotenóides, tocoferóis, poliaminas e glutathione (Sharma & Davis 1997; Bray *et al.* 2000). Dentre os antioxidantes enzimáticos, estão a ascorbato peroxidase, catalase, deidroascorbato redutase, glutathione redutase, monodeidroascorbato redutase e a superóxido dismutase (Bray *et al.* 2000).

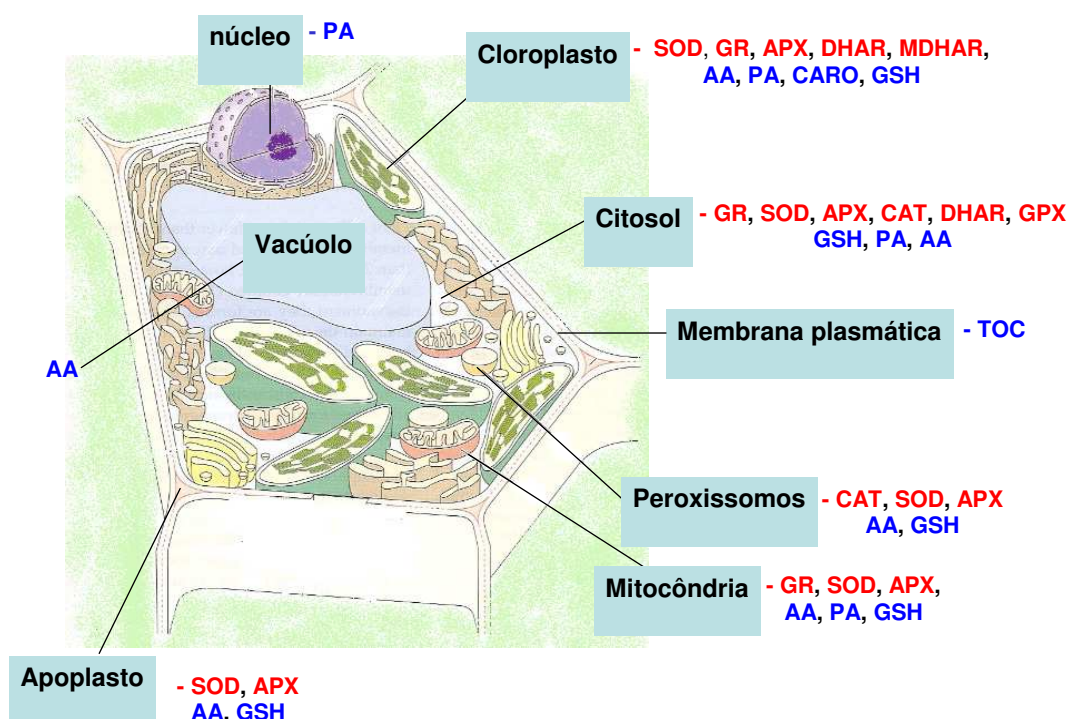


Figura 2. Localização dos antioxidantes em uma célula vegetal. Antioxidantes não-enzimáticos representados em azul: AA- ácido ascórbico; CARO- carotenóides; GSH- glutathione; PA- poliaminas; TOC- tocoferóis. Antioxidantes enzimáticos representados em

vermelho: APX- ascorbato peroxidase; DHAR- deidroascorbato redutase; GR- glutationa redutase; GPX- glutationa peroxidase; MDHAR- monodeidroascorbato redutase; SOD- superóxido dismutase (de acordo com Bray *et al.* 2000; Mittler 2002) (figura modificada de de Staehelin & Newcomb 2000).

As principais vias de neutralização de EROs de plantas incluem: a **superóxido dismutase**, encontrada em quase todos os compartimentos celulares, que converte $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 ; **glutaciona peroxidase**, encontrada no citosol e **catalase**, nos peroxissomos, ambas neutralizam H_2O_2 e os antioxidantes do **ciclo ascorbato-glutaciona** (fig. 3) (Mittler 2002).

Os compostos do ciclo ascorbato-glutaciona, também conhecido por Foyer-Halliwell-Asada, ocorrem em cloroplastos, citosol, mitocôndrias, apoplasto e peroxissomos. A presença de seus compostos em todos estes compartimentos celulares e a alta afinidade de APX ao H_2O_2 sugerem que este ciclo tem uma função crucial no controle dos níveis de EROs. Em contraste com a APX, a enzima catalase, que também atua sobre H_2O_2 , está presente apenas em peroxissomos, mas é indispensável na detoxificação de H_2O_2 , quando este se encontra em níveis muito elevados (Mittler 2002).

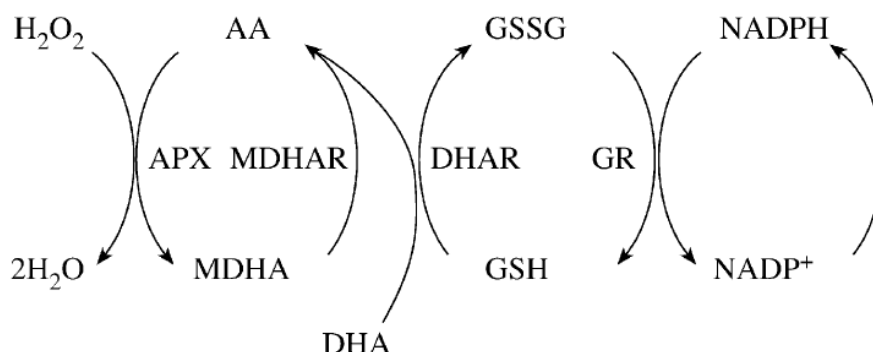


Figura 3. Ciclo Ascorbato-Glutaciona - Ácido ascórbico (AA) reage com H_2O_2 na presença de ascorbato peroxidase (APX) para formar monodeidroascorbato (MDHA). Ascorbato (ácido ascórbico) pode ser regenerado a partir de MDHA pela ação de monodeidroascorbato redutase (MDHAR) ou por dismutação espontânea em AA e deidroascorbato (DHA). AA é regenerado de DHA na reação catalisada por deidroascorbato redutase (DHAR), por meio da oxidação da glutaciona reduzida (GSH) em GSSG. A GSH é regenerada na presença de NADPH pela glutaciona redutase (GR) (figura de Blokhina *et al.* 2003).

O distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor das EROs, pode levar ao estresse oxidativo (Iriti & Faoro 2008).

Em muitas plantas, a exposição ao ozônio e a outros fatores de estresse oxidativo pode estimular a síntese de metabólitos antioxidantes e aumentar as atividades das enzimas antioxidantes, o que é importante para regenerar as formas ativas dos antioxidantes (Bray *et al.* 2000; Blokhina *et al.* 2003), já que para uma eficiente neutralização das EROs é necessária a manutenção de alta taxa GSH e AA reduzidos por oxidados (Mittler 2002).

Em certos casos, a superexpressão de uma ou mais enzimas antioxidantes pode prover proteção contra o estresse oxidativo; por isso, plantas tolerantes ou aclimatadas podem conter altas concentrações de antioxidantes para minimizar danos causados pelas EROs (Bray *et al.* 2000).

No entanto, a capacidade antioxidante é muito dependente da severidade do estresse, bem como da espécie, genótipo e do estágio de desenvolvimento da planta. A capacidade antioxidativa foliar também varia com a idade fisiológica da folha e com sua posição em relação à interceptação da irradiância (Dat *et al.* 2000; Karnosky *et al.* 2006).

Os danos oxidativos gerados pelo ozônio podem se tornar visíveis em folhas, na forma de cloroses, necroses e pigmentações, em plantas sensíveis. Por esta razão, tais injúrias podem ser usadas para medir os efeitos deste poluente (VDI 2003).

Nessas plantas sensíveis ao ozônio, a formação inicial de EROs a partir da reação do ozônio com água é seguida por uma cadeia de reações oxidativas secundárias, derivada de H_2O_2 ou de $O_2^{\bullet-}$, dependendo da espécie. Essa explosão oxidativa secundária é inicialmente localizada no apoplasto foliar e depois se expande para o citoplasma e compartimentos subcelulares, levando à formação de lesões visíveis (Burkey *et al.* 2006).

De acordo com De Temmerman *et al.* (2004), espécies ou cultivares usadas para monitorar a distribuição temporal e espacial dos efeitos dos poluentes e que demonstram claramente seus efeitos a partir de sintomas visíveis como necroses e cloroses, são denominadas bioindicadoras.

O emprego de plantas bioindicadoras para monitoramento da presença de ozônio na atmosfera, entre outros poluentes, conhecido por biomonitoramento, não pretende e não consegue substituir medições de concentrações de poluentes através de métodos físico-químicos. No entanto, oferece suporte e conhecimento científico para estabelecer padrões de qualidade do ar, com base nos valores-limite que causam efeitos sobre as plantas; tem relevância ecológica, pois demonstra a pressão da poluição do ar sobre as plantas de comunidades e ecossistemas e detecta efeitos na biodiversidade (De Temmerman *et al.* 2004).

Se o método for altamente padronizado, a planta bioindicadora poderá, além de qualificar o ambiente, quantificar os níveis do poluente.

O biomonitoramento pode ser passivo quando plantas são observadas *in situ*, constituindo importante método para o estudo das interações entre plantas e os poluentes em seu ambiente natural ou pode ser ativo quando cultivares específicas são levadas de forma padronizada para pontos específicos de monitoramento (Domingos *et al.* 2002; De Temmerman *et al.* 2004).

Injúrias foliares visíveis são causadas por vários fatores de estresse (Vollenweider & Gunthardt-Goerg 2006) e, por isso, existem critérios bem estabelecidos para diagnosticar as injúrias foliares induzidas por ozônio (fig. 4): os sintomas aparecem geralmente como pontuações escuras ou descoloração (avermelhada ou bronze) na superfície adaxial (fig. 4 c); sintomas ocorrem entre as nervuras (fig. 4 b); os sintomas inicialmente aparecem com grande severidade nas folhas mais velhas, próximas à base da planta (fig. 4) (Novak *et al.* 2003); folhas danificadas tendem a ter senescência acelerada (fig. 4 d); porções sombreadas geralmente não apresentam injúrias, promovendo o “efeito sombra” (fig. 4 e) (Fundación CEAM 2009).



Figura 4. Injúrias foliares provocadas por ozônio. **a.** Planta de *Sambucus ebulus* exposta ao ozônio em câmara de fumigação, **b.** Planta de *Hibiscus syriacus* exposta ao ozônio em câmara de fumigação, **c.** Planta de *Ulmus glabra* com sintomas de ozônio, observada em campo, **d.**

Planta de *Salix alba* exposta ao ozônio em câmara de fumigação, **e**. Planta de *Cornus sanguinea* com sintomas de ozônio, observada em campo (fotos: **a**, **b**, **c**, **d** retiradas de www.ozoneinjury.org; foto **e** retirada de Sánchez *et al.* 2003).

Nicotiana tabacum ‘Bel W3’ é uma cultivar já padronizada como bioindicadora de O₃ em regiões de clima temperado, reage muito rapidamente e especificamente ao ozônio, com injúrias visíveis muito características, que se encontram ilustradas na figura 5 (VDI 2003). Por isso essa cultivar tem sido utilizada em numerosos estudos de biomonitoramento pelo mundo todo há várias décadas (Franzle 2006; Klumpp *et al.* 2006). Outras espécies nativas da Europa são similares ao tabaco ‘Bel W3’ em relação à sensibilidade ao ozônio, é o caso de *Malva sylvestris* e *Rumex crispus*, que mostram efeitos visíveis em relação a este poluente (Wohlgemuth *et al.* 2002).



Figura 5. Injúrias características de ozônio em folhas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ (foto: Sant’anna 2007).

No entanto, o tabaco ‘Bel W3’, segundo Sant’anna (2007), não apresenta bom potencial para quantificar os níveis de ozônio na cidade de São Paulo já que houve uma baixa explicabilidade do modelo encontrado entre danos foliares e as concentrações de ozônio.

Na verdade, a eficiência de uma espécie bioindicadora depende de sua sensibilidade a outros fatores de estresse, que podem ocorrer no local que se deseja monitorar, bem como às doses de poluente encontradas neste local, que pode exceder a capacidade de resposta da planta, devido a sua extrema sensibilidade. Sendo assim, pode-se supor que plantas nativas da região a ser monitorada podem ser bioindicadoras mais eficientes do que as que não são nativas.

Assim, uma cultivar comprovadamente sensível ao ozônio de uma espécie de origem tropical, como a *Ipomoea nil* Scarlet O'Hara, como mostraram Nouchi & Aoki (1979), pode vir a ser uma bioindicadora mais eficiente para São Paulo do que *Nicotiana tabacum* 'Bel W3'.

Ipomoea nil, também conhecida como corda de viola, corriola, campainha, entre outros nomes populares, é uma espécie de planta trepadeira pertencente à família Convolvulaceae, nativa da América tropical e apenas cultivada em zonas de clima temperado (Bianchini 1998).

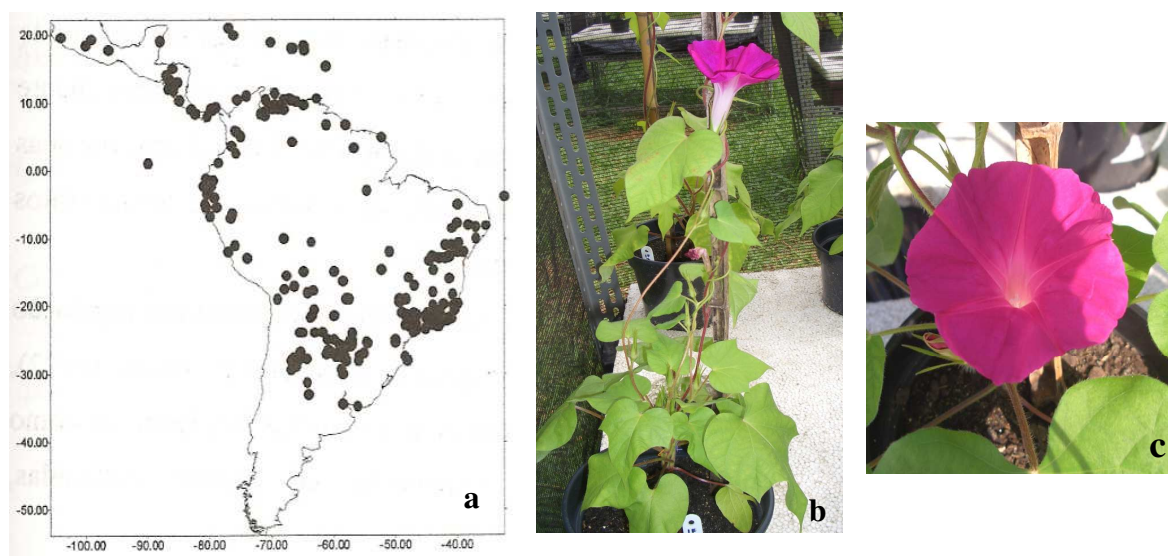


Figura 6. a. Distribuição geográfica de *I. nil* (Bianchini 1998); b. Planta de *I. nil* 'Scarlet O' Hara'; c. Flor de *Ipomoea nil* 'Scarlet O' Hara'.

Na região Sudeste do Brasil, esta espécie é muito comum em vegetação nativa, em áreas agrícolas e até em jardins (Bianchini 1998). No geral, *I. nil*, considerada como planta daninha, apresenta vasta e expressiva ocorrência no Brasil, sendo uma das espécies do gênero mais frequentes nas áreas de produção agrícola (Duarte *et al.* 2008).

Plantas daninhas, em geral, possuem diversificados e complexos mecanismos de adaptação, que lhes permitem, em curto prazo, sobreviver às variações do ambiente e reproduzir-se em condições adversas, graças à sua alta capacidade de alteração de fenótipo, como resposta às variações do meio (Duarte *et al.* 2008).

Nouchi & Aoki (1979) observaram que plantas de *I. nil* 'Scarlet O'Hara' expostas em áreas de Tóquio em 1975 e 1976 apresentaram pontos esbranquiçados e necroses intervenais nas folhas, que se assemelhavam às injúrias foliares induzidas por oxidantes fotoquímicos e estes eram mais severos nas folhas mais velhas. Além disso, a concentração dos oxidantes na atmosfera sempre pareceu ser maior quando ocorriam necroses foliares nessas plantas,

destacando o potencial bioindicador de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara para oxidantes fotoquímicos, inclusive ozônio. Com a finalidade de comprovar esse potencial, Nouchi & Aoki (1979) realizaram um experimento controlado em câmara de fumigação com ozônio no qual plantas de *I. nil* foram expostas a várias concentrações do poluente por diferentes períodos de tempo. Verificou-se que uma concentração de 300 ppb de ozônio por uma hora gerou severos pontos esbranquiçados ou necroses, enquanto nenhuma injúria foi observada em exposição a 75 ppb por 4 horas. As injúrias observadas neste experimento foram semelhantes às observadas em campo, confirmando que as injúrias observadas em campo foram devido ao ozônio. Os autores concluíram, então, que plantas dessa cultivar podem ser bioindicadoras para oxidantes fotoquímicos, devido a sua alta sensibilidade, seu fácil crescimento, sendo adequadas para longas exposições, já que produz muitas novas folhas e os sintomas de injúrias em suas folhas são característicos e facilmente identificáveis.

Ferreira (2007) realizou um estudo de campo, em 2006, com plantas de *I. nil* ‘Scarlet O’ Hara’ expostas no parque do Ibirapuera em São Paulo, região caracterizada por altas concentrações de ozônio, com o intuito de avaliar se as flutuações sazonais nas concentrações totais de ácido ascórbico, na atividade de peroxidases totais (POD) e de superóxido dismutase em plantas de *I. nil* ‘Scarlet O’Hara’ afetavam a manifestação de sintomas visíveis supostamente induzidos por ozônio. Além disso, procurou determinar quais fatores ambientais estavam associados à variação nas respostas antioxidativas e na intensidade de sintomas foliares. Em síntese, o autor observou que as respostas antioxidativas foram menos intensas no verão, coincidindo com as maiores porcentagens de injúrias e maior concentração média de ozônio. Por outro lado, na primavera, época em que a dose de exposição acumulada de ozônio foi similar à observada no verão, as respostas antioxidativas foram mais expressivas e a intensidade de injúrias foliares foi menor do que a observada no verão. Esses resultados indicam que a intensidade dos sintomas visíveis nas plantas dessa cultivar pode ser modulada pelo sistema antioxidante, apontando para a necessidade de se aprofundar e ampliar o conhecimento sobre o tema antes que esta seja rotineiramente utilizada como bioindicadora de ozônio nas regiões de clima tropical. Além disso, Ferreira (2007) verificou que as injúrias foliares foram caracterizadas por cloroses e necroses internervais na face adaxial das folhas (figura 7), que parecem diferentes daquelas descritas por Nouchi & Aoki (1979), um aspecto que também precisa ser melhor investigado.



Figura 7. Folha de planta de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’ Hara’ exposta no Parque do Ibirapuera, S.P. com injúrias supostamente induzidas por ozônio (Ferreira 2007).

Na realidade, deve-se considerar que a análise de antioxidantes totais, como fez Ferreira (2007), não revela o balanço redox de uma célula e, assim, o potencial de oxi-redução das plantas submetidas a fatores de estresse oxidativo. Isto porque são as formas reduzidas de ácido ascórbico e de glutathione que atuam como antioxidantes. Sua disponibilidade nas células depende da eficiência de enzimas regeneradoras das formas oxidadas destes metabólitos (Hong-bo *et al.* 2008). Essa idéia é reforçada Burkey *et al.* (2006), ao comentarem que não basta que as plantas sintetizem uma quantia suficiente de ácido ascórbico, é preciso também que demonstrem boa capacidade para reduzir sua forma oxidada. Tais parâmetros, em conjunto, são marcadores importantes para avaliar a eficiência do ciclo ascorbato glutathione, já que mudanças nesse ciclo podem se manifestar por meio de taxas alteradas entre as formas reduzidas e oxidadas de ácido ascórbico e de glutathione (Tausz *et al.* 2004).

Assim, dando continuidade à pesquisa realizada por Ferreira (2007), o presente estudo foi proposto para testar as seguintes hipóteses: (1) variações na capacidade de oxi-redução de plantas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’ Hara’, expostas em um local contaminado por O_3 , ocorrem em resposta a um gradiente de condições ambientais; (2) as mencionadas variações interferem no surgimento de injúrias foliares características da exposição a esse poluente, já que uma alta capacidade de oxi-redução pode atenuar os danos oxidativos. Se essa segunda hipótese for comprovada, podem-se esperar mudanças na relação linear entre danos e concentrações de O_3 ou uma defasagem de tempo entre um aumento da concentração deste e a ocorrência da injúria visível, o que pode diminuir a eficiência desta espécie para programas de biomonitoramento em regiões urbanas brasileiras.

Para testar estas hipóteses, este estudo tem como objetivos:

1. Verificar se há variações em indicadores da capacidade de oxi-redução (atividades de ascorbato peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase, e estado redox de ácido ascórbico e glutathione), em plantas de *I. nil* ‘Scarlet O’ Hara’ expostas em ambiente contaminado por ozônio, em resposta às oscilações nas condições ambientais, tanto no que diz respeito à contaminação atmosférica propriamente dita quanto às condições meteorológicas.
2. Identificar quais fatores ambientais determinam as variações nos indicadores da capacidade de oxi-redução mensurados nestas plantas.
3. Verificar se as variações na capacidade de oxi-redução interferem no surgimento e na intensidade de injúrias foliares nas plantas expostas no ambiente contaminado e, assim, na eficiência da cultivar para biomonitoramento de ozônio em áreas urbanas brasileiras.

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

Material e Métodos

Local de estudos

O local de estudos fica inserido no Instituto de Botânica e este no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – PEFI (fig. 8 e 9), situado na região sul do município de São Paulo (23°45′-23°55′S), limite com o município de Diadema, no Estado de São Paulo. Apresenta altitudes médias de 770 e 825 m. Este parque tem um dos mais significativos remanescentes de Mata Atlântica em área urbana do país (Barros *et al.* 2002). O PEFI foi criado em 1893 com a finalidade de proteger os recursos hídricos da bacia do riacho Ipiranga e suplementar o abastecimento de água na capital (Barbosa *et al.* 2002).

Em função de sua situação geográfica muito próxima de municípios que apresentam intensa industrialização, como é o caso de Diadema e São Bernardo do Campo, o PEFI pode estar submetido a inúmeros poluentes característicos de áreas industrializadas (Domingos *et al.* 2002; Fernandes *et al.* 2002). Além disso, o PEFI está inserido em uma área altamente urbanizada sendo atingido por poluentes aéreos emitidos por um grande número de veículos que circulam na região (Domingos *et al.* 2002).

Estudos de biomonitoramento realizados por Domingos *et al.* (2002), Sant’anna *et al.* (2008) e Esposito *et al.* (2009), no mesmo local, demonstraram que este é atingido por níveis fitotóxicos de componentes do *smog* fotoquímico, como o ozônio. Considerando que o Instituto fica a aproximadamente 3 km de distância de uma avenida com alto fluxo de veículos (fig. 9 seta), os precursores deste poluente parecem vir predominantemente destas fontes veiculares e das emissões biogênicas do próprio fragmento florestal do PEFI (Souza *et al.* 2009). Trata-se, portanto, de um local adequado para a realização deste estudo.



Figura 8. Vista Aérea de uma parcela do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) no município de São Paulo (fonte: <http://atlasambiental.prefeitura.sp.gov.br> acesso em 15/01/2009).



Figura 9. Imagem de satélite do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no município de São Paulo. A seta aponta a Av. Miguel Stéfano, que corta o PEFI; A sigla IBT, localiza o Instituto de Botânica dentro do PEFI (fonte: <http://maps.google.com.br> acesso em 15/01/2009).

Cultivo e exposição das plantas

Sementes de *Ipomoea nil* cv. ‘Scarlet O’Hara’ (fig. 10 a) foram fornecidas pela CN Seeds Ltd (<http://www.cnseeds.com.uk/>).



Figura 10. Sementes de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ (a) ; Gerbox com sementes de *I. nil* em fase de germinação (b) e Plântulas de *I. nil* (c).

Estas sementes foram germinadas em caixa plástica transparente com área de 100 cm² (gerbox; fig. 10 b). O surgimento e expansão das folhas cotiledonares (fig. 10 c) ocorriam em média 10 dias após a sementeira, quando, então, as plântulas formadas eram transplantadas em vasos plásticos de 1,5 litros com substrato comercial Plantimax (Eucatex), composto a base de casca de pinus, vermiculita e turfa.

Com o intuito de promover a irrigação por capilaridade ao longo do cultivo e exposição das plantas, na base dos vasos, foram inseridos 3 cordões de náilon (fig. 11 a), que ficavam submersos em água de torneira sobre caixas plásticas cobertas por tela de arame galvanizado, segundo modelo proposto pelo VDI (2003). Todo esse processo de cultivo ocorreu em casa de vegetação localizada no Instituto de Botânica, (fig. 11 b), que recebe ar filtrado por filtros de carvão ativado e de lã de vidro e de papel, para impedir a passagem de poluentes particulados e gasosos. Além disso, para garantir o bom desenvolvimento das plantas na casa de vegetação, através de dois aparelhos de ar condicionado, foi mantida uma temperatura média de 21 °C.



Figura 11. Vaso com cordões de náilon inseridos em sua base (a) e casa de vegetação do Instituto de Botânica de São Paulo (b).

Devido ao porte volúvel de *I. nil*, após o transplante cada vaso recebeu uma estaca de bambu para suportar o crescimento das plantas (fig. 12). Semanalmente, até o início da exposição, as plantas receberam 50 ml de solução aquosa preparada com adubo comercial contendo 20:20:20 de N, P e K, além dos principais micronutrientes.



Figura 12. Estacas de bambu em vasos de plantas de *I. nil* no interior da casa de vegetação do Instituto de Botânica.

Aproximadamente 30 dias após o transplante, 36 plantas foram colocadas no ambiente externo da casa de vegetação, caracterizando o início de cada exposição, momento em que as folhas 6 e 7 mais velhas do ramo principal (fig. 13), estavam totalmente expandidas (fig. 14 a). Consideraram-se as folhas cotiledonares como as de números 1 e 2. Somente 6 plantas continuaram dentro da casa de vegetação e serviram como referência para os danos foliares visíveis.

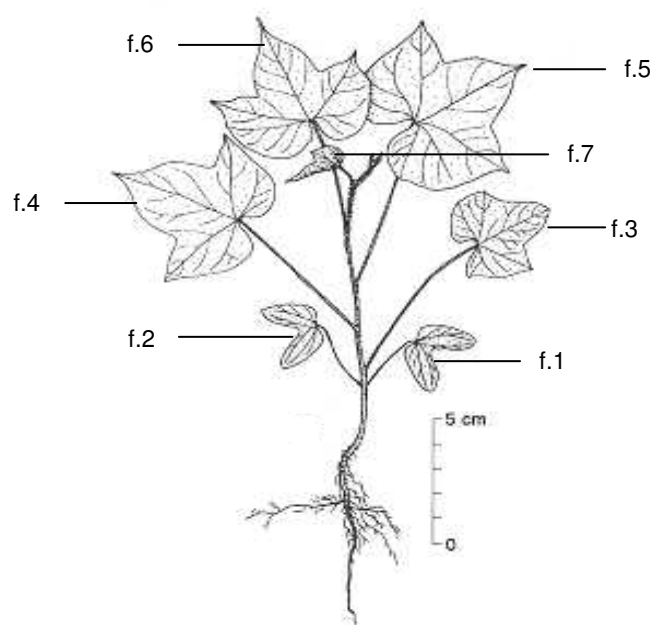


Figura 13. Posicionamento das folhas de *Ipomoea nil* (imagem modificada de <http://malherbologie.cirad.fr> acesso em 15/01/2009).

Essas 36 plantas retiradas da casa de vegetação foram expostas no mencionado ambiente sobre 4 estantes metálicas (fig. 14 b), com sombreamento de 50% (nas 3 laterais e no topo). Em cada estante, foram colocados 9 vasos, dispostos sobre uma tela de arame galvanizado, colocada sobre caixas plásticas utilizadas como reservatório de água. Placas de isopor perfuradas impediam que os vasos tombassem. Ao longo do tempo de permanência no local, as plantas continuaram recebendo irrigação por capilaridade, por meio dos cordões de náilon, como recomendado pelo VDI (2003).



Figura 14. Plantas expostas, com folhas totalmente expandidas (a) e estante com a distribuição de vasos de *I. nil* em área externa e próxima da casa de vegetação (b).

Cada exposição das plantas no ambiente externo teve duração de 28 dias. Em 6 dias sorteados, no decorrer desse período, foram retiradas 6 plantas igualmente sorteadas. Foram realizadas 2 exposições no verão e 3 exposições nas demais estações do ano de 2008. Para todas as exposições, foram sempre seguidos os mesmos procedimentos de cultivo e exposição acima descritos.

A estação considerada verão iniciou no dia 14 de janeiro de 2008 e terminou no dia 07 de abril de 2008, compreendendo a exposição 1 (14/01 – 11/02) e a exposição 2 (10/03 – 07/04); a estação considerada outono iniciou no dia 07 de abril de 2008 e finalizou no dia 30 de junho de 2008, compreendendo a exposição 1 (07/04 - 05/05), exposição 2 (05/05 – 02/06) e exposição 3 (02/06 – 30/06); a estação considerada inverno começou no dia 14 de julho de 2008 e foi até o dia 06 de outubro de 2008, compreendendo a exposição 1 (14/07 – 11/08), exposição 2 (11/08 – 08/09) e exposição 3 (08/09 – 06/10) e a estação considerada primavera iniciou em 13 de outubro de 2008 e terminou em 05 de janeiro de 2009, com a exposição 1 (13/10 – 10/11), exposição 2 (10/11 – 08/12) e exposição 3 (08/12 – 05/01).

Em cada dia de amostragem por exposição, as folhas 6 e 7 de cada planta sorteada, previamente marcadas, foram analisadas quanto à atividade de enzimas e à concentração de compostos não enzimáticos, estimando-se também sua capacidade oxi-redução. A utilização destas folhas, em particular, foi recomendada pelo VDI (2003).

Análises de antioxidantes

Nas folhas 6 e 7 de cada planta sorteada, foram determinadas as concentrações de ácido ascórbico (AA) e glutathione (GSH), em suas formas reduzida e oxidada, e a atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR).

Para todos os antioxidantes, exceto para glutathione, as análises foram feitas nas folhas 6 e 7 isoladamente. A análise de glutathione, última etapa analítica, foi realizada em uma amostra mista por planta contendo o restante das folhas 6 e 7. Cabe destacar que, em uma das exposições do verão, a quantidade do material vegetal disponível não foi suficiente para a análise de glutathione e, em uma das exposições da primavera, por problemas de ordem técnica, não foi feita a análise de ácido ascórbico.

A análise de ácido ascórbico foi realizada no próprio dia sorteado para amostragem, devido à sua instabilidade química. Em relação às enzimas APX, GR e SOD, após a extração e centrifugação das amostras, os sobrenadantes foram congelados em freezer -80°C para posterior análise. Para a análise de glutathione, a mencionada amostra mista de folhas frescas era também congelada, para que no dia de análise ocorresse a extração e centrifugação.

Após a coleta de todo o material vegetal para as diferentes análises, uma das folhas que havia restado na planta foi inicialmente pesada, para obtenção da massa fresca, e, em seguida, colocada em estufa a 70°C , onde permanecia por 7 dias, para a obtenção da massa seca. A razão entre massa fresca e seca foi utilizada somente para expressar os resultados relacionados aos antioxidantes por grama de massa seca.

Para análise do ácido ascórbico, o material vegetal fresco, aproximadamente 0,25 g, foi homogeneizado com solução de ácido metafosfórico (HPO_3) 6% com etileno diamina tetra acetato dissódio (EDTA) 1 mM. O extrato obtido foi centrifugado por 10 minutos a 10000 RPM e, para remover maiores impurezas, foi filtrado em papel filtro. Para a determinação de ácido ascórbico em sua forma reduzida (AA), 1 mL desse extrato foi diluído em 4 mL de água bideionizada e filtrado em uma membrana com porosidade de 0,22 μm . Apenas 20 μL desta solução foram injetados no equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector ultravioleta $\lambda = 245 \text{ nm}$, coluna C18, fase móvel com solução aquosa acidificada (pH 2,3) com ácido ortofosfórico (H_3PO_4) e uma vazão de 1,00 mL/min em temperatura ambiente. Para a determinação de ácido ascórbico total (AA+DHA), o ácido ascórbico oxidado (DHA) foi totalmente reduzido a AA através da mistura de 1 mL do extrato vegetal com 0,4 mL de ditioneitol (DTT) 0,2% e 0,2 mL de fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4) 45%. Esta solução foi mantida no escuro por 15 minutos para depois receber

0,4 mL de H_3PO_4 2M e 3 mL de água bideionizada. O extrato final foi injetado no equipamento de CLAE. O ácido ascórbico das amostras foi identificado pelo tempo de retenção e seu espectro de absorção. O conteúdo de DHA foi calculado pela subtração do AA total do AA reduzido determinado inicialmente. Essa metodologia foi adaptada a partir do trabalho de López *et al.* (2005). O potencial oxi-redução do ácido ascórbico foi obtido pela divisão da concentração de AA pela concentração de AAtotal, seguindo sugestão de Burkey *et al.* (2006) e Di Baccio *et al.* (2008).

Para análise da atividade da APX, o material vegetal, aproximadamente 0,5 g, foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, triton 0,05%, polivinilpolipirrolidona (PVPP) 10% e ácido ascórbico 1 mM e depois centrifugado por 10 minutos a 10000 RPM. O extrato obtido foi dividido em duas alíquotas, pois este também foi utilizado para avaliar a atividade da enzima SOD. Estas alíquotas foram congeladas em freezer -80°C para posterior análise. Uma parcela da alíquota (300 μl) separada para a análise de APX, após descongelamento, recebeu a seguinte mistura: 2 ml de tampão fosfato 80 mM, pH 7,0, 350 μl de EDTA 1mM, 300 μl de ácido ascórbico 10 mM, 300 de μl peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2 mM. Foi feita a mesma mistura, porém sem a amostra, o que serviu de controle. Para medir a atividade da APX foi observada a decomposição do ácido ascórbico da mistura com amostra, na fase linear da reação, comparada com a mistura controle, através de espectrofotômetro UV/VIS com $\lambda=290$ nm, de 5 em 5 segundos, por 2 minutos. Essa metodologia foi baseada em Asada (1984), com modificações.

Na alíquota do extrato acima mencionado, que foi reservada para determinação da atividade da SOD (50 μl), após descongelamento, foram acrescentados: 0,95 ml de tampão fosfato 100 mM pH 7,0, 0,5 ml de EDTA 0,0004 mM, 0,5 mL de metionina 1 mM, 0,5 ml azul *p*-nitrotetrazolio (NBT) 5 mM e 0,2 ml de riboflavina 1 mM. Essa mistura ficou exposta 15 minutos sob luz fluorescente (80 W), sendo que cada amostra exposta a luz teve seu controle, que ficou protegido de luz. Cada par de amostras foi levado ao espectrofotômetro UV/VIS $\lambda= 560$ nm. A atividade de SOD foi medida indiretamente pela inibição da redução do composto NBT, já que a SOD compete com o NBT pelo ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que é gerado fotoquimicamente pela riboflavina. Uma unidade de atividade de SOD é definida pela quantidade da enzima que causa 50% da redução do NBT. Essa metodologia foi baseada em Ramachandra Reddy *et al.* (2004), com modificações.

O material vegetal destinado às análises de GR, aproximadamente 0,3 g, após ser homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 Mm, pH 7,8, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 5mM e PVPP (10%) foi centrifugado por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante obtido foi congelado em freezer -80°C . Em uma parcela (15 μl) de extrato descongelado,

foram acrescidos 1,5 mL da mistura mantida a 30 °C de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5 e 3 carboxi-4-nitrofenil dissulfeto (DTNB) 1 mM. Em seguida, outros reagentes foram adicionados: 0,1 mL de glutathione oxidada (GSSG) 1 mM e 0,1 mL de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) 0,1 mM, este último permite a redução da GSSG pela enzima GR em GSH (glutathione reduzida). Por fim, esta solução foi levada ao espectrofotômetro $\lambda = 412$ nm, com um controle (mesma mistura sem a amostra), onde a atividade da GR foi observada através da detecção de glutathione reduzida, através do DTNB (reagente de cor) durante 15 segundos, com intervalos de 1 segundo. Essa metodologia foi proposta por Ramachandra Reddy *et al.* (2004), sendo utilizada após modificações.

O material vegetal armazenado para a determinação da glutathione, aproximadamente 1 g proveniente das folhas 6 e 7, após descongelado, foi triturado com ácido sulfosalicílico 5% e centrifugado a 20 minutos a 10000 RPM. Para a obtenção das concentrações de glutathione reduzida (GSH), em uma parcela deste extrato (0,25 mL), foram acrescidos: 1,75 mL de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e 0,1 mL de DTNB 3 mM. Após 5 minutos de reação (em ambiente claro), foi feita a leitura em espectrofotômetro UV/VIS, $\lambda = 412$ nm. Para determinar a glutathione total (GSH + GSSG), na mistura utilizada anteriormente foram acrescidos 100 μ L de NADPH 0,4 mM e 4 μ L de glutathione redutase, para que toda a glutathione oxidada (GSSG) fosse reduzida e, após 20 minutos de reação (em ambiente claro), foi feita uma nova leitura em espectrofotômetro $\lambda = 412$ nm. O conteúdo de GSSG foi calculado pela subtração da Gtotal da GSH reduzida determinada inicialmente. O potencial oxi-redução de glutathione foi também obtido pela divisão da concentração de GSH pela concentração de Gtotal (glutathione total). Essa metodologia foi baseada em Israr *et al.* (2006), com modificações.

Monitoramento das condições ambientais

Durante o período de exposições, os dados meteorológicos (temperatura, umidade relativa do ar, índice pluviométrico e radiação solar global) foram obtidos junto à estação meteorológica do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo (IAG - USP), que está sediada na área de estudo, o Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI).

O monitoramento contínuo das concentrações de óxidos de nitrogênio (NO e NO₂) e de ozônio (O₃), compostos que caracterizam o *smog* fotoquímico, no local escolhido para realização do estudo, foi realizado por outros integrantes do “Projeto Bioindicadores - FAPESP”, por meio de analisadores HORIBA.

Análise de sintomas foliares visíveis

As mesmas folhas 6 e 7 das plantas sorteadas, antes de qualquer análise destrutiva, foram avaliadas quanto à ocorrência de sintomas foliares semelhantes aos induzidos pelo ozônio por outros integrantes do projeto financiado pela FAPESP. A porcentagem da área foliar afetada pelos mesmos foi estimada visualmente seguindo as recomendações de Schaub *et al.* (2001) e do VDI (2003). Os resultados foram expressos em porcentagem de área foliar danificada e apresentados na forma de médias de danos nas folhas analisadas por planta.

Análises Estatísticas

Diferenças estatísticas na atividade ou concentração dos antioxidantes entre as exposições e entre as estações do ano foram determinadas por meio de análise de variância não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), seguidas de testes de comparações múltiplas (Teste de Student-Newman-Keuls ou de Dunn), quando pertinentes.

As relações entre variações nos antioxidantes das plantas de *I. nil* ‘Scarlet O’Hara’, mantidas por 28 dias no local de estudo, nas diferentes exposições das quatro estações do ano, e variações nas condições ambientais foram testadas por meio de análises exploratórias de correlação de Pearson e de análises de regressão multivariadas.

Inicialmente, realizaram-se análises de correlação de Pearson entre cada indicador do sistema antioxidante e fatores ambientais com o objetivo de verificar quais fatores, entre os meteorológicos (radiação solar global, umidade relativa do ar, temperatura e precipitação) ou ozônio provavelmente afetariam as respostas antioxidativas. No caso de O₃, tais análises foram realizadas com as médias de concentrações máximas horárias em cada dia e com doses acumuladas (AOTzero, AOT20 e AOT40). Além disso, procurou-se verificar se haveria uma defasagem de tempo entre uma determinada mudança nas condições ambientais e seu reflexo sobre o sistema antioxidante. Assim, realizaram-se as análises de correlação entre valores médios de antioxidantes por planta retirada em cada dia de amostragem, incluindo dados de todas as exposições, e valores médios dos mencionados fatores ambientais entre 2 e 6 dias anteriores a cada dia de análise dos antioxidantes, adotando esquema previamente proposto por Ferreira (2007).

Em seguida, foram realizadas análises de regressão multivariada com todo o conjunto de dados para determinar o quanto da variação nos níveis dos antioxidantes e na capacidade de oxi-redução de ácido ascórbico e de glutathiona (variáveis dependentes) poderia ser explicado por fatores abióticos (variáveis independentes) e quais destes contribuiriam

significativamente para explicar, agora de forma combinada, as oscilações nas respostas antioxidativas. Em tais análises, foram igualmente utilizados os valores médios dos antioxidantes por planta e os valores médios dos mencionados fatores ambientais entre 2 e 6 dias anteriores a cada dia de amostragem das plantas. No caso de O₃, apenas uma das formas de expressá-lo foi incluída em cada modelo. NO e NO₂ foram desconsiderados nestas análises, devido à inexistência de dados para toda a primavera. As análises multivariadas foram realizadas pelo método *stepwise* (passo a passo). Quando necessário, os dados das variáveis dependentes foram transformados para alcançar a normalidade e igualdade de variância. O procedimento de ajuste de cada regressão iniciou com um modelo saturado, ou seja, com todas as variáveis presentes, removendo aquela de menor participação para explicar as variações nos antioxidantes. Novos ajustes foram feitos sequencialmente, seguindo o mesmo procedimento. Ao final, permaneceram no modelo somente as variáveis que contribuíram significativamente para explicar as variações em cada indicador do sistema antioxidante. Com o conjunto de modelos explicativos e significativos em mãos, escolheu-se, para cada indicador, aquele com maior explicabilidade, ou seja, aquele que gerou o maior coeficiente de regressão (r^2).

Finalmente, realizou-se uma análise de componentes principais, incluindo resultados obtidos nas estações do ano para a atividade das enzimas e concentrações de ácido ascórbico e de glutathione, em suas formas reduzida e oxidada e porcentagem de área afetada por danos tipicamente induzidas por O₃. O objetivo dessa análise foi resumir a variabilidade total dos dados e avaliar qualitativamente a relação entre níveis dos antioxidantes e intensidade de injúrias foliares. Para esta relação foram usados os valores médios dos resultados obtidos para as 6 plantas retiradas em cada dia de amostragem, que foram transformados por ordenação.

Os resultados obtidos no verão não entraram nas análises de correlação, de regressão e de componentes principais, uma vez que as plantas nesse período foram infectadas por microrganismos, possivelmente fungos, o que levou à ocorrência de danos foliares não característicos de ozônio e que pode ter interferido nas respostas antioxidativas.

Resultados

Condições climáticas

As condições climáticas no local de exposição e no período de experimento estão descritas na Tabela 1.

As maiores médias de temperatura ocorreram nas estações do verão e primavera, a maior temperatura máxima foi 34,3 °C e ocorreu durante a exposição 1 da primavera e a menor temperatura mínima registrada foi 6,8 °C e ocorreu durante a exposição 3 do outono.

Em relação à umidade relativa do ar, as maiores médias ocorreram na estação do verão, a maior umidade relativa máxima foi 100% e ocorreu na exposição 1 da primavera e a menor umidade relativa mínima foi 18% na exposição 2 de inverno.

O maior índice de precipitação foi 222,8 mm na exposição 3 da primavera, estação em que se registrou a maior quantidade de chuva. O menor índice pluviométrico foi de 12,8 mm durante a exposição 2 do inverno. No entanto, foi durante a estação do outono que ocorreu o menor índice de chuvas.

A maior média de irradiação solar global foi 19,7 MJ/m² e foi registrada na exposição 2 da primavera, estação com a maior média de irradiação. A menor intensidade de irradiação foi 10,7 MJ/m² e ocorreu na exposição 3 do outono, estação com a menor média de irradiação.

Tabela 1. Valores médios, máximos e mínimos de temperatura e de umidade relativa do ar; valores acumulados de precipitação e médios de irradiação solar global, no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), durante os períodos de exposição, nas estações do ano de 2008. Exposições de verão: 1 (14/01 – 11/02) e 2 (10/03 – 07/04); Exposições de outono: 1 (07/04 - 05/05), 2 (05/05 – 02/06) e 3 (02/06 – 30/06); Exposições de inverno: 1 (14/07 – 11/08), 2 (11/08 – 08/09) e 3 (08/09 – 06/10) e exposições da primavera: 1 (13/10 – 10/11), 2 (10/11 – 08/12) e 3 (08/12 – 05/01/09).

Estações	Exposições	Temperatura (°C)			Umidade Relativa (%)			Precipitação (mm)	Irradiação Solar Global (MJ/m ²)
		méd	máx	mín	méd	máx	mín		
Verão	1	20,9	32,4	13,7	83,1	99,0	38,0	198,1	15,8
	2	20,4	30,2	13,5	84,2	97,0	43,0	125,3	13,9
Outono	1	19,6	30,4	10,9	81,0	98,0	38,0	114,2	13,6
	2	16,8	27,9	7,9	78,3	98,0	31,0	18,8	12,3
	3	16,5	27,0	6,8	81,3	98,0	38,0	52,3	10,7
Inverno	1	16,7	28,5	7,2	75,8	98,0	25,0	80,9	13,2
	2	18,3	32,8	9,8	74,2	98,0	18,0	12,8	15,8
	3	16,8	33,4	8,9	82,1	97,0	25,0	101,0	14,2
Primavera	1	20,9	34,3	14,1	80,1	100,0	24,0	114,1	17,0
	2	19,4	31,8	10,8	80,1	99,0	28,0	109,5	19,7
	3	20,5	32,9	13,9	81,8	97,0	24,0	222,8	17,8

Poluentes atmosféricos

O monitoramento de óxidos de nitrogênio (NO_x) foi realizado somente até a exposição 2 de inverno, devido a problemas de ordem técnica em seu equipamento de medição.

Na Figura 15, observa-se que as médias de NO e NO₂ foram menores no verão e maiores no outono e inverno. A concentração máxima de NO foi 339,7 ppb na exposição 2 do outono e a máxima concentração de NO₂ foi 261,9 ppb durante a exposição 3 do outono. As médias de NO₂ foram maiores que as de NO em quase todas as exposições, exceto na exposição 1 de verão e exposição 2 de inverno.

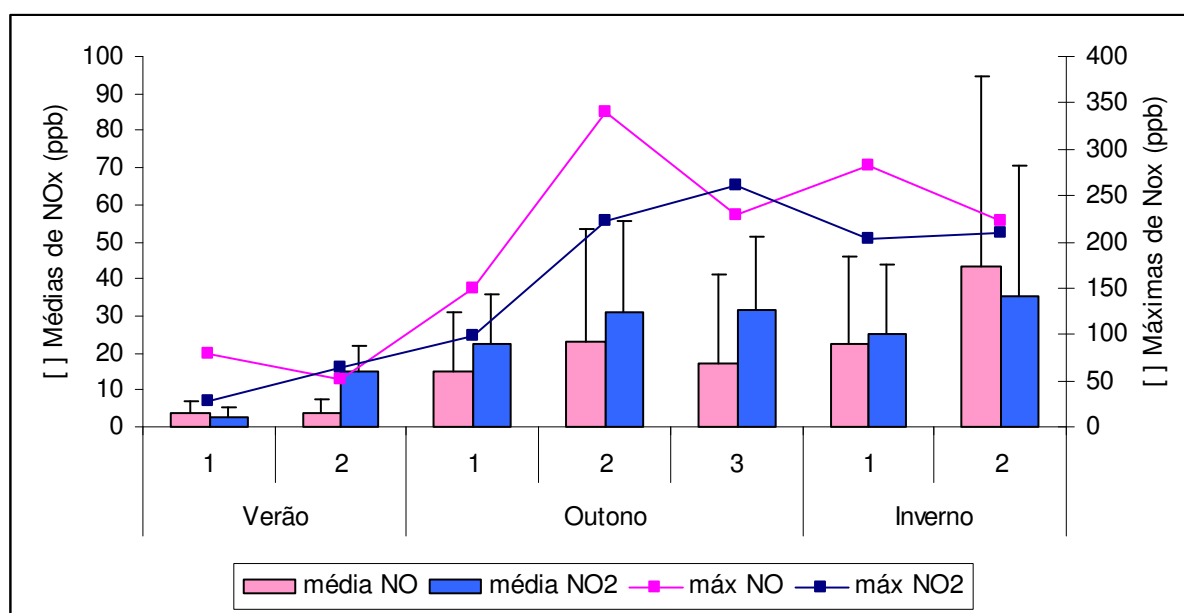


Figura 15. Concentrações médias e máximas de óxido de nitrogênio (NO) e de dióxido de nitrogênio (NO₂), em ppb, no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) durante os períodos de exposição do verão e outono e exposições 1 e 2 do inverno, no ano de 2008. Exposições de verão: 1 (14/01 – 11/02) e 2 (10/03 – 07/04); Exposições de outono: 1 (07/04 – 05/05), 2 (05/05 – 02/06) e 3 (02/06 – 30/06); Exposições de inverno: 1 (14/07 – 11/08), 2 (11/08 – 08/09).

Na figura 16 podemos observar que as concentrações médias de ozônio variaram de 6,5 ppb na primeira exposição do verão até 25,6 ppb na segunda do inverno. No entanto, as maiores concentrações máximas horárias de ozônio do período ocorreram na exposição 2 do verão (129,3 ppb) e na exposição 1 de outono (138,3 ppb).

Na tabela 2, foram apresentadas as doses acumuladas de ozônio, AOT0: (dose acumulada de valores horários acima de 0 ppb); AOT20 (dose acumulada de valores horários acima de 20 ppb) e AOT40 (dose acumulada de valores horários acima de 40 ppb), em cada período de exposição. Os menores valores para todos os índices foram observados na

exposição 1 do verão. Já as maiores AOT0 e AOT20 ocorreram na exposição 2 de inverno e a maior AOT40 foi estimada para na exposição 1 do outono.

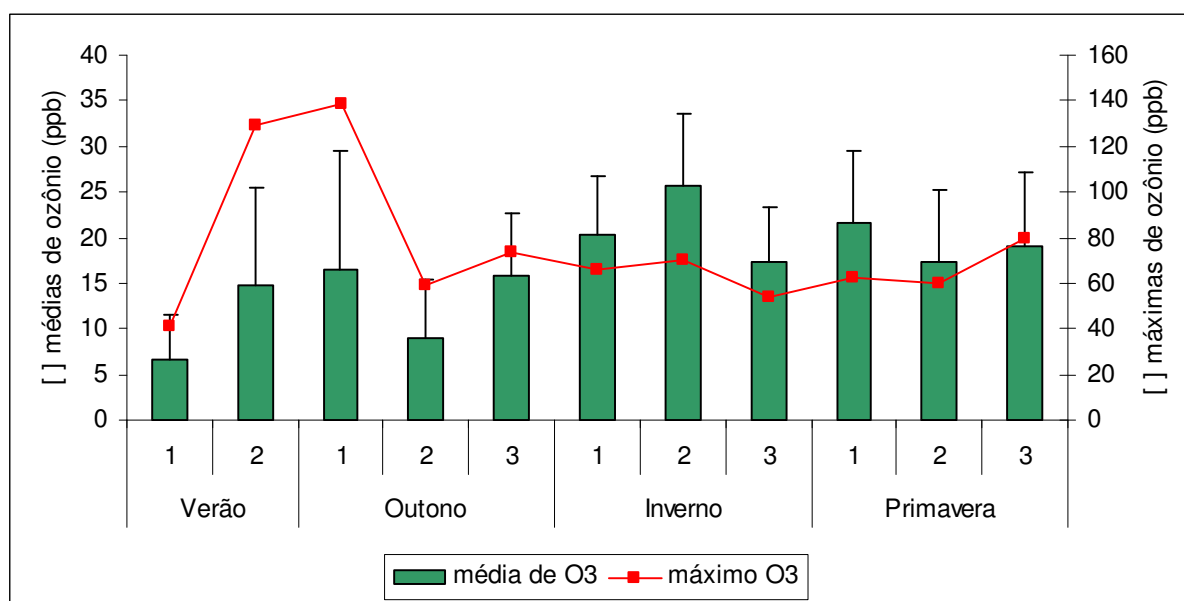


Figura 16. Concentrações médias e máximas horárias de ozônio (em ppb), no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), durante os períodos de exposição nas diferentes estações do ano de 2008. Exposições de verão: 1 (14/01 – 11/02) e 2 (10/03 – 07/04); Exposições de outono: 1 (07/04 - 05/05), 2 (05/05 – 02/06) e 3 (02/06 – 30/06); Exposições de inverno: 1 (14/07 – 11/08), 2 (11/08 – 08/09) e 3 (08/09 – 06/10) e exposições da primavera: 1 (13/10 – 10/11), 2 (10/11 – 08/12) e 3 (08/12 – 05/01/09).

Tabela 2. Doses Acumuladas de ozônio em (ppb.h) totais (AOT0), acima de 20 ppb (AOT20) e acima de 40 ppb (AOT40), no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), durante os períodos de exposição das estações do ano de 2008. Exposições de verão: 1 (14/01 – 11/02) e 2 (10/03 – 07/04); Exposições de outono: 1 (07/04 - 05/05), 2 (05/05 – 02/06) e 3 (02/06 – 30/06); Exposições de inverno: 1 (14/07 – 11/08), 2 (11/08 – 08/09) e 3 (08/09 – 06/10) e exposições da primavera: 1 (13/10 – 10/11), 2 (10/11 – 08/12) e 3 (08/12 – 05/01/09).

Estações	Exposições	AOT0	AOT20	AOT40
Verão	1	2470,5	121,9	1,1
	2	5700,2	1066,1	332,3
Outono	1	5585,0	1452,3	601,2
	2	3227,0	200,2	18,7
	3	7269,7	1021,6	109,0
Inverno	1	8025,6	1902,0	228,9
	2	10622,7	2789,4	596,9
	3	7937,8	856,6	62,5
Primavera	1	9888,7	2045,6	272,5
	2	7987,7	1205,1	114,6
	3	8856,2	1761,6	334,1

Antioxidantes

Em geral, não houve diferença significativa entre as folhas 6 e 7 para a atividade enzimática e para o conteúdo dos compostos não enzimáticos das plantas de *I. nil* 'Scarlet O'Hara' amostradas ao longo do período experimental, de forma que os resultados não foram apresentados separadamente para cada uma dessas folhas analisadas

Além disso, as respostas antioxidativas das plantas variaram entre os dias de amostragem de cada exposição, parecendo ser mais em função de oscilações nas condições ambientais do que em função da idade das folhas analisadas ou mesmo da idade das plantas, visto que não foi verificada uma linha de tendência evidente que indicasse acréscimo ou decréscimo na atividade ou concentração dos compostos analisados ao longo do tempo de exposição (dados não mostrados). Sendo assim, optou-se por mostrar os resultados relativos às variações entre exposições em cada estação do ano e variações sazonais (figuras 17 a 28). Cabe ressaltar, no entanto, que todos os dados obtidos por folhas de cada planta e por dia de amostragem contribuíram para a construção dos gráficos e para a análise das relações entre os indicadores do sistema antioxidante e fatores ambientais.

Optou-se pela apresentação de resultados em gráficos do tipo *box-plot*. Nesse tipo de gráfico, a linha que divide os retângulos (*boxes*) indica a mediana dos dados; os retângulos delimitam os 25% de dados acima e abaixo da mediana (percentis de 25 e 75); as barras de erro mostram os valores menores situados entre os percentis de 10 e 25 ou maiores entre os de 75 e 90; os símbolos (●) apontam os *outliers* (valores extremos abaixo do percentil de 5 ou acima do de 95). Essa apresentação possibilita representar a distribuição de um conjunto de dados com base na mediana, podendo-se avaliar a simetria dos dados, sua dispersão e a existência ou não de *outliers*.

A atividade de APX aumentou gradativamente no decorrer das estações do verão, outono e inverno (fig. 17 a, b, c), obtendo-se a maior atividade nas plantas da última exposição de cada uma dessas estações. Na primavera (fig. 17 d), ao contrário, a atividade dessa enzima foi significativamente menor na última exposição em comparação com os valores obtidos nas 2 primeiras exposições. A atividade de APX, considerando-se cada unidade amostral, variou de 10,6 (determinada na exposição 2 da primavera) a 197,50 $\text{dA min}^{-1} \text{g}^{-1}$ (determinada na exposição 1 da estação primavera).

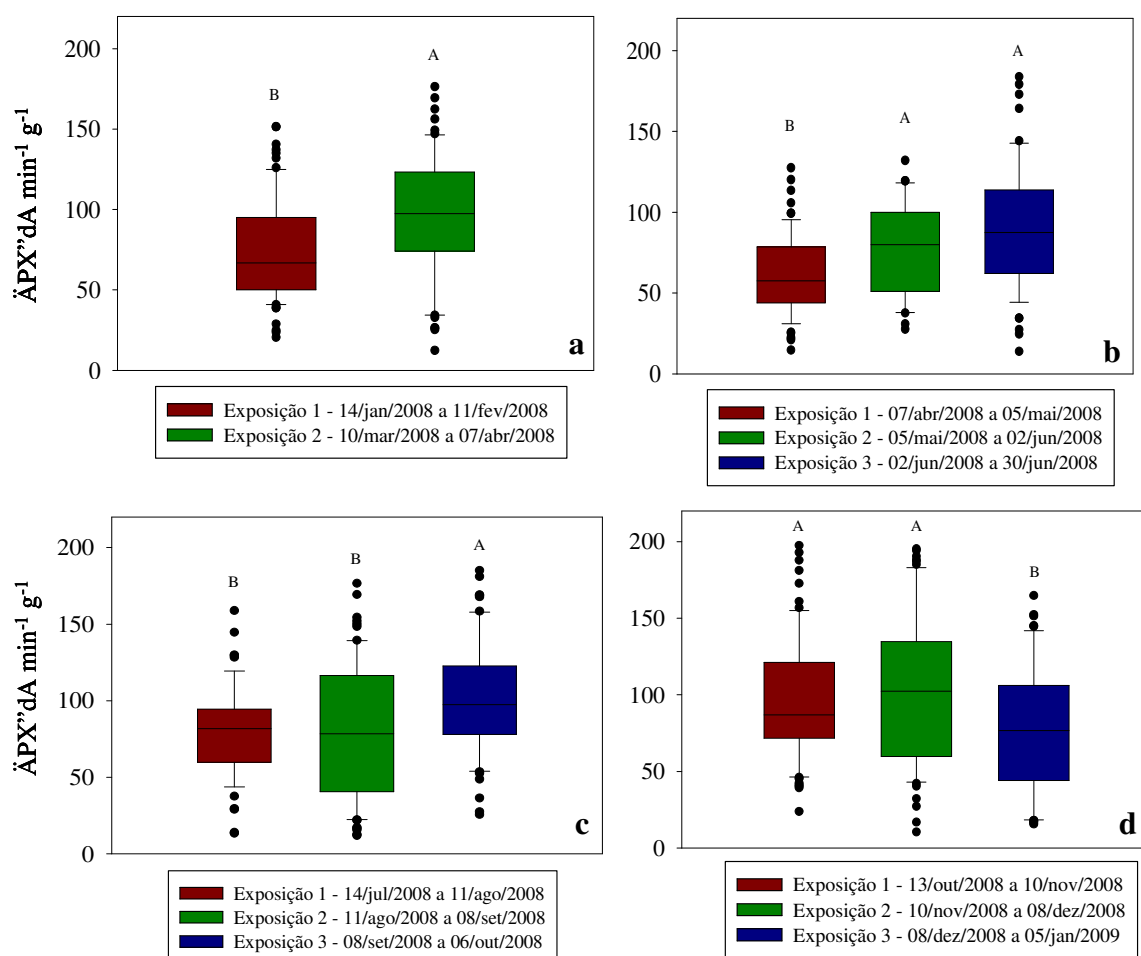


Figura 17. Atividade de ascorbato peroxidase (APX) em folhas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' durante as exposições de verão (a), outono (b), inverno (c) e primavera (d). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

A atividade de SOD não variou significativamente entre as exposições do verão (fig. 18 a) e da primavera (fig. 18 d). Já no outono (fig. 18 b), a atividade dessa enzima foi significativamente menor nas plantas utilizadas na 2ª exposição e mais alta na terceira. Por outro lado, houve um decréscimo significativo e gradativo da atividade da SOD ao longo inverno (fig. 18 c). A atividade de SOD variou de 1298,6 (medida em uma planta da 1ª. exposição do outono) a 44576,1 (determinada na 3ª. exposição do outono) unidades de SOD g⁻¹.

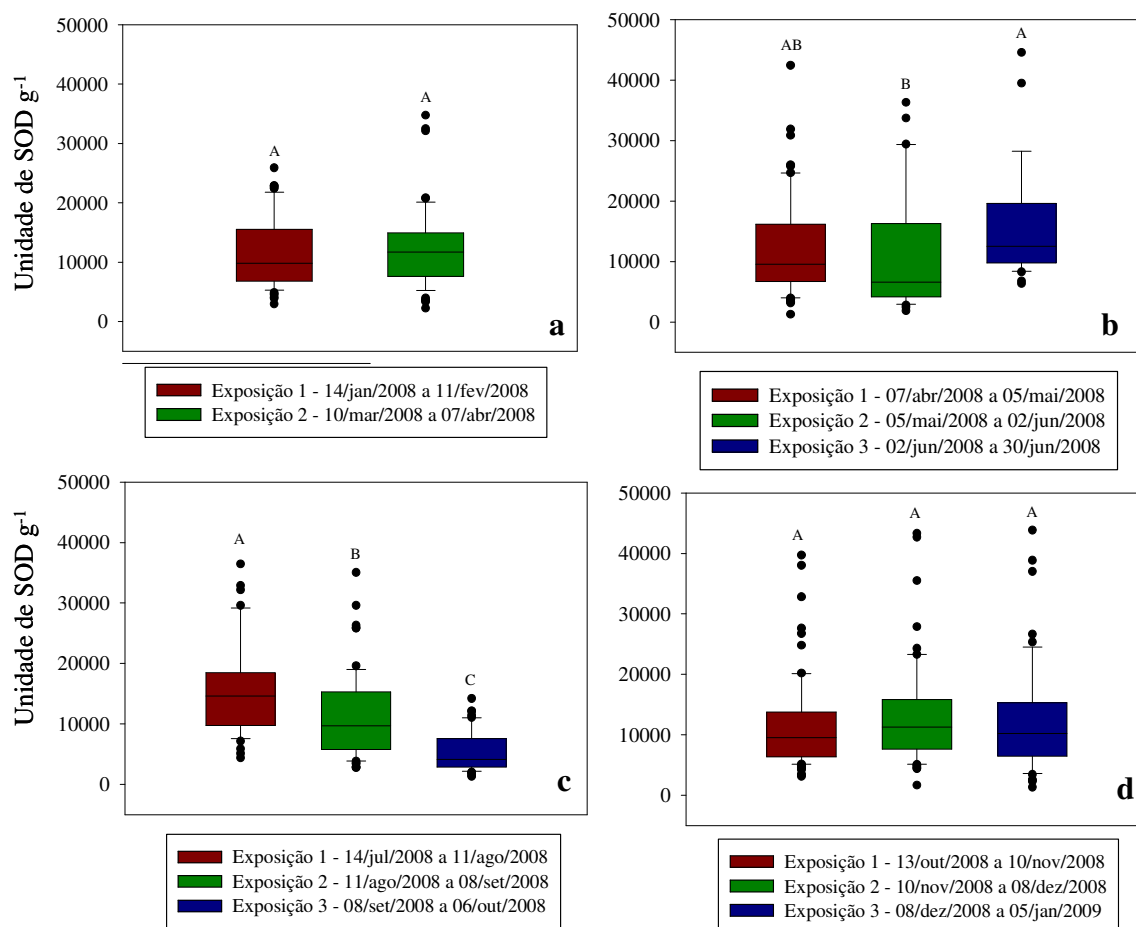


Figura 18. Atividade de superóxido dismutase (SOD) em folhas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' durante as exposições de verão (a), outono (b), inverno (c) e primavera (d). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

Na estação de verão (fig. 19 a), a atividade de GR foi significativamente menor nas plantas da última exposição. Na primavera (fig. 19 d), foi mais alta no último período. E no outono (fig. 19 b), a maior atividade foi observada na segunda exposição. No inverno (fig. 19 c), não houve diferença significativa entre as exposições. A atividade de GR variou de 94,5 a 12488,1 dAmin⁻¹g⁻¹ (ambos os valores ocorreram na exposição 1 de verão).

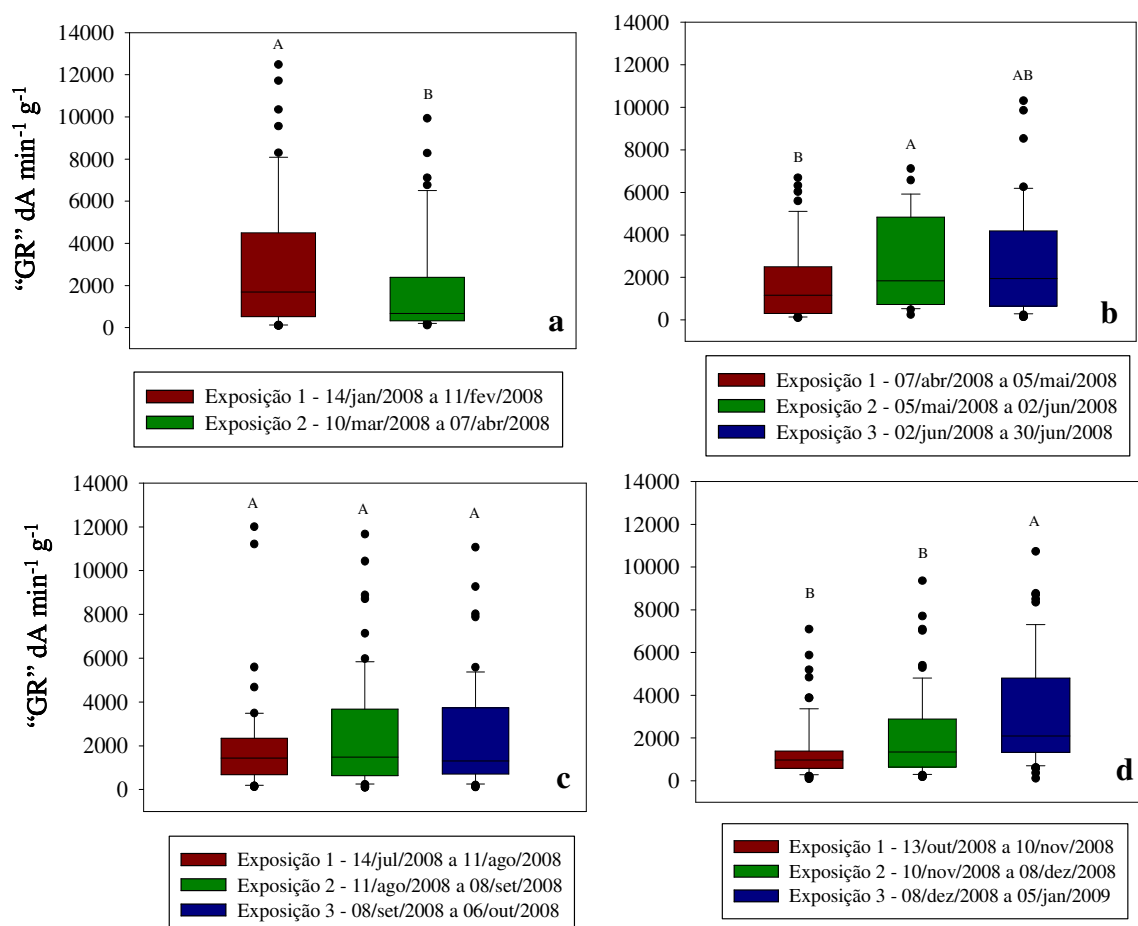


Figura 19. Atividade de glutatona redutase (GR) em folhas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ durante as exposições de verão (a), outono (b), inverno (c) e primavera (d). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

No outono, as concentrações de GSH mais altas ocorreram na exposição 2, em comparação com os valores encontrados nos demais períodos de experimentação (fig. 20 b). Nas duas últimas exposições do inverno e na última da primavera (fig. 20 c, d), as concentrações foliares de GSH foram significativamente menores. A concentração de GSH, considerando o total de plantas analisadas durante todas as estações do ano, variou de 0,5 a 9,8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (na exposição 1 do outono e exposição 1 do inverno, respectivamente).

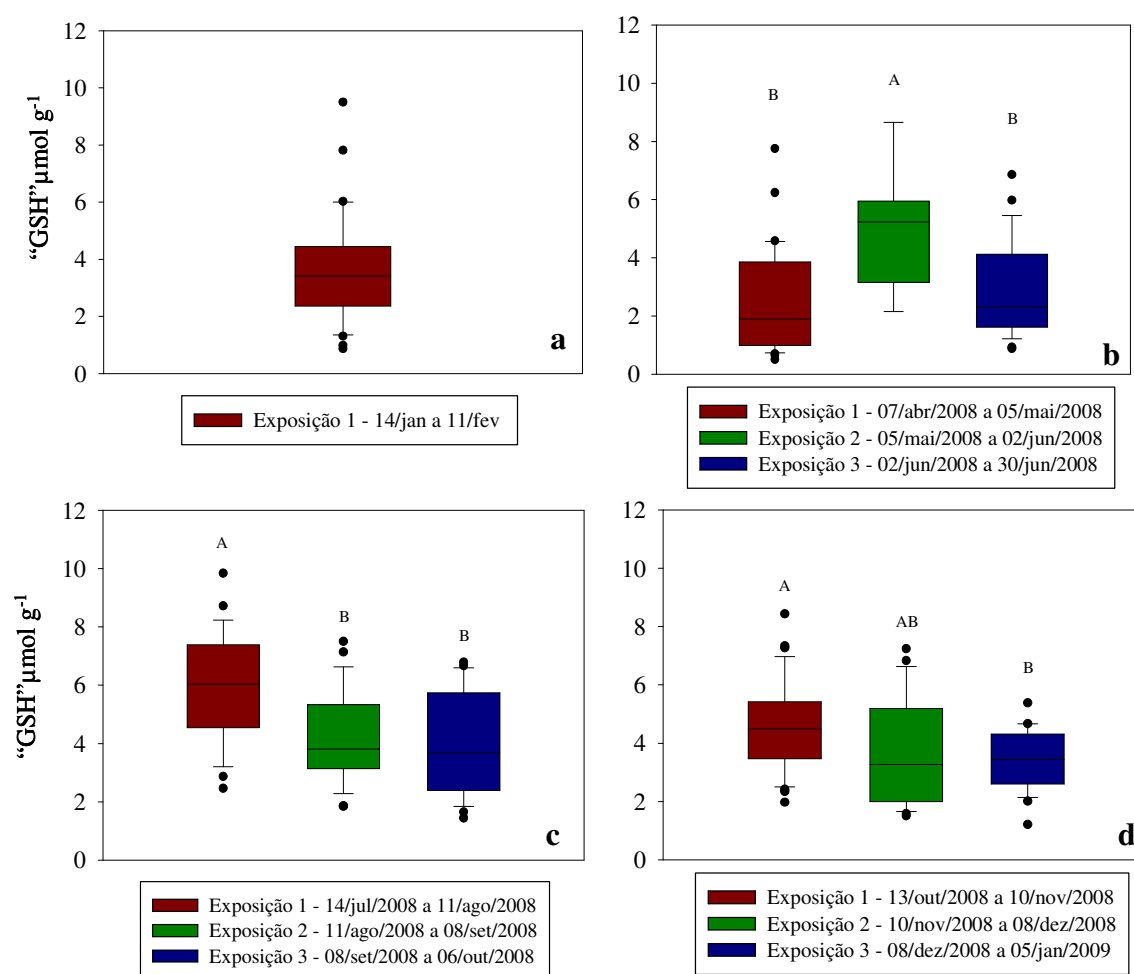


Figura 20. Concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em folhas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ durante as exposições de verão (a), outono (b), inverno (c) e primavera (d). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

A concentração de GSSG se manteve constante entre as exposições de inverno (fig. 21 c) e foi mais alta na 2^a. exposição do outono (fig. 21 b) e mais baixa na 2^a. da primavera (fig. 21 d), comparando-se às demais exposições de cada uma das estações. As concentrações de GSSG durante todas as estações variaram de 0,14 a 14 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (na exposição 3 do outono e exposição 3 do inverno, respectivamente).

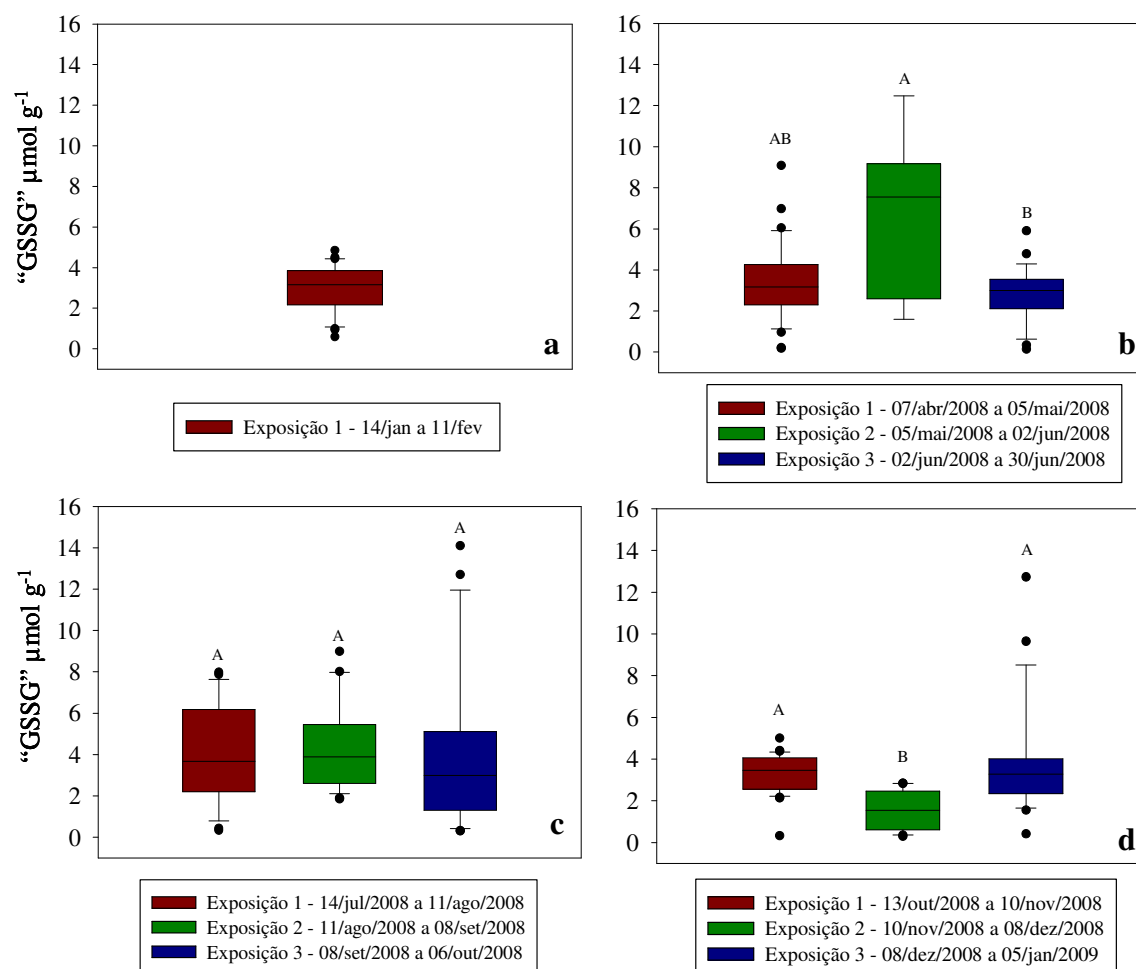


Figura 21. Concentrações de glutathiona oxidada (GSSG) em folhas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ durante as exposições de verão (a), outono (b), inverno (c) e primavera (d). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

O estado redox de glutathiona (GSH/Gtotal) não variou entre as exposições do outono e inverno (fig. 22 b, c), mas na primavera (fig. 22 d) o valor estimado dessa razão foi maior na 2^a. exposição e menor na 3^a. exposição. As razões de GSH/Gtotal variaram de 0,12 (obtido na 1^a. exposição do outono e também na 3^a. exposição da primavera) a 0,97 (obtido na 1^a e 3^a. exposição do outono).

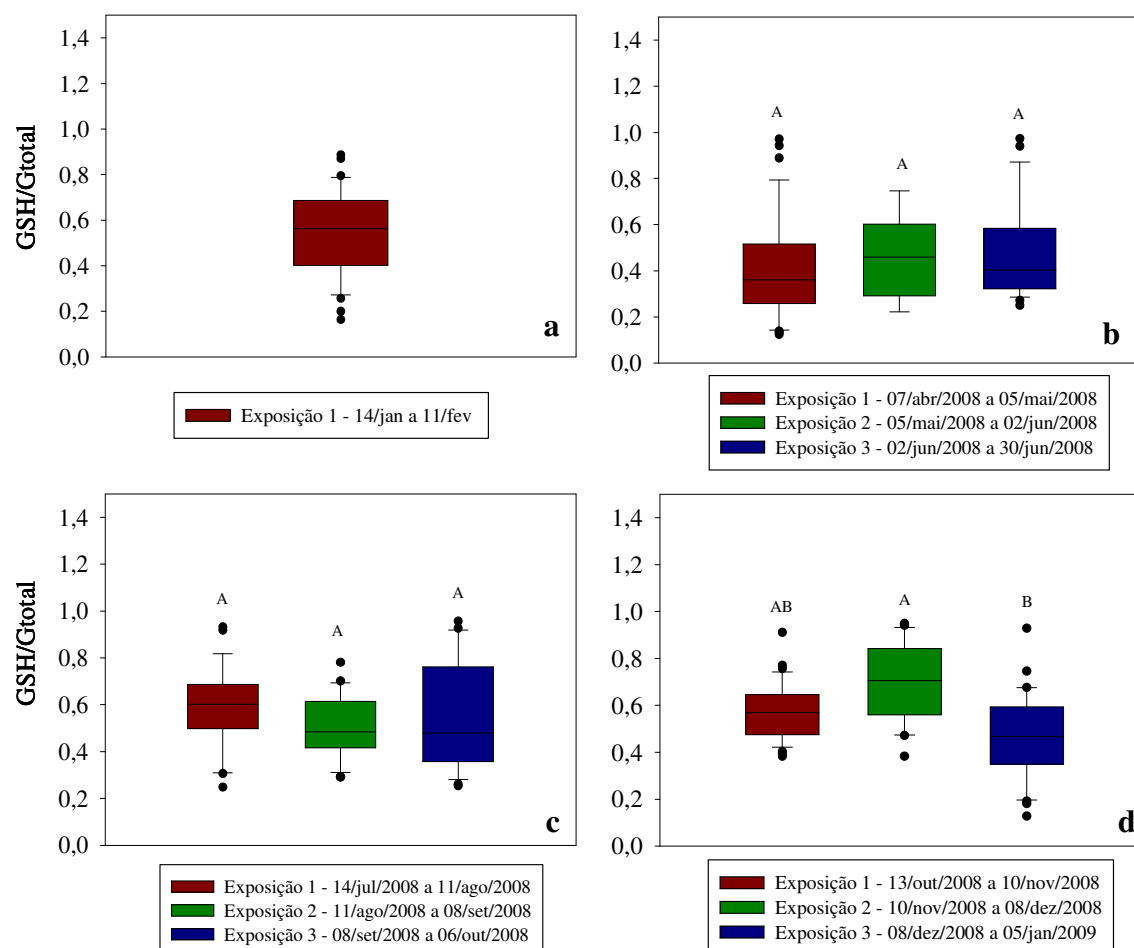


Figura 22. Razões entre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e total (Gtotal) em folhas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ durante as exposições de verão (a), outono (b), inverno (c) e primavera (d). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

As concentrações de AA foram significativamente menores nas plantas da última exposição do verão (fig. 23 a) e aumentaram nas da última exposição das outras estações (fig. 23 b, c, d), em relação aos valores obtidos nas demais exposições de cada estação. As concentrações de AA variaram, considerando todo o conjunto de plantas utilizadas no período experimental, de 0,9 (3ª exposição do inverno) a 12,8 mg g⁻¹ (3ª. exposição do outono).

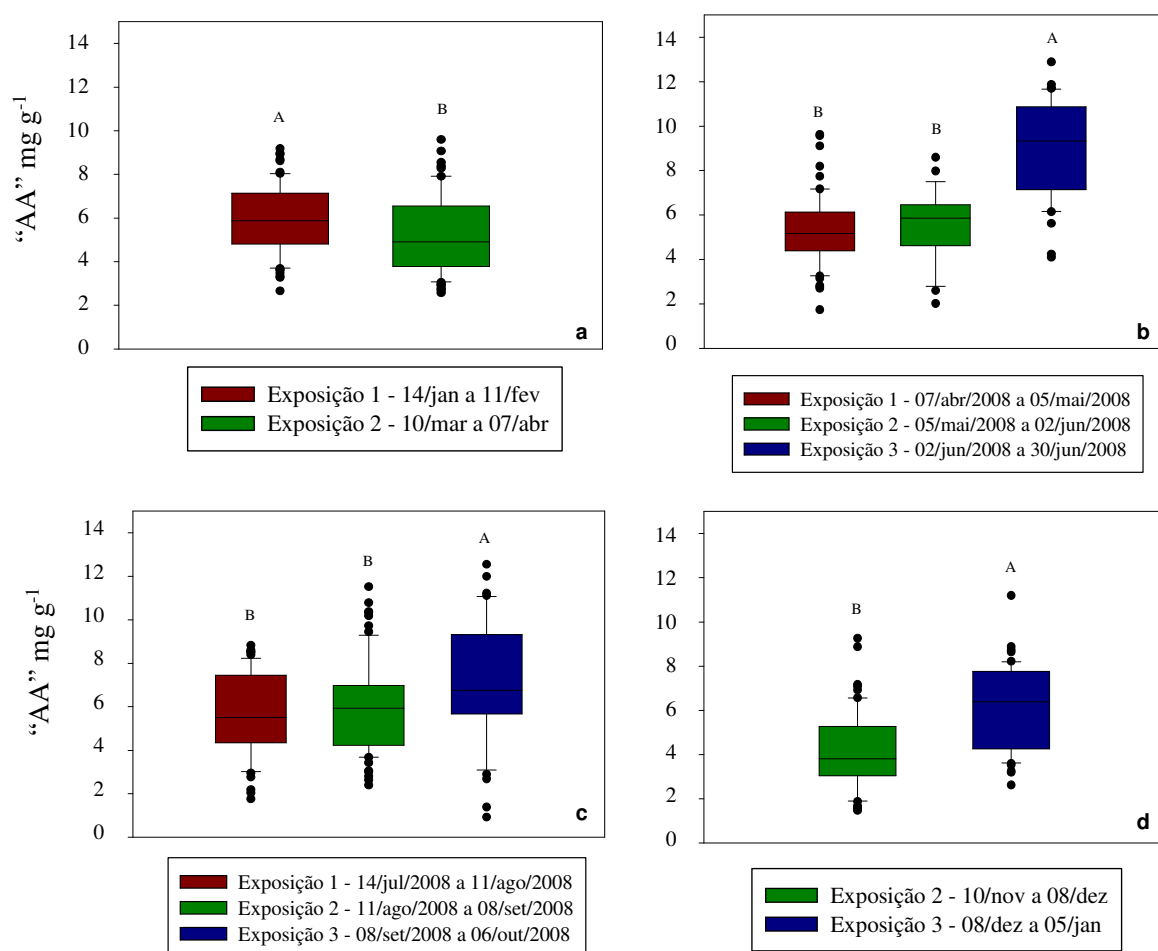


Figura 23. Concentrações de ácido ascórbico reduzido (AA) em folhas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ durante as exposições de verão (a), outono (b), inverno (c) e primavera (d). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

Não houve variação entre exposições no conteúdo foliar de DHA no verão, inverno e primavera (fig. 24 a,c,d). No entanto, os níveis de DHA oscilaram na estação do outono (fig. 24 b), com um aumento significativo na exposição 3. As concentrações de DHA variaram de 0,2 a 6,4 mg g⁻¹ (na exposição 3 de inverno e exposição 1 do verão, respectivamente).

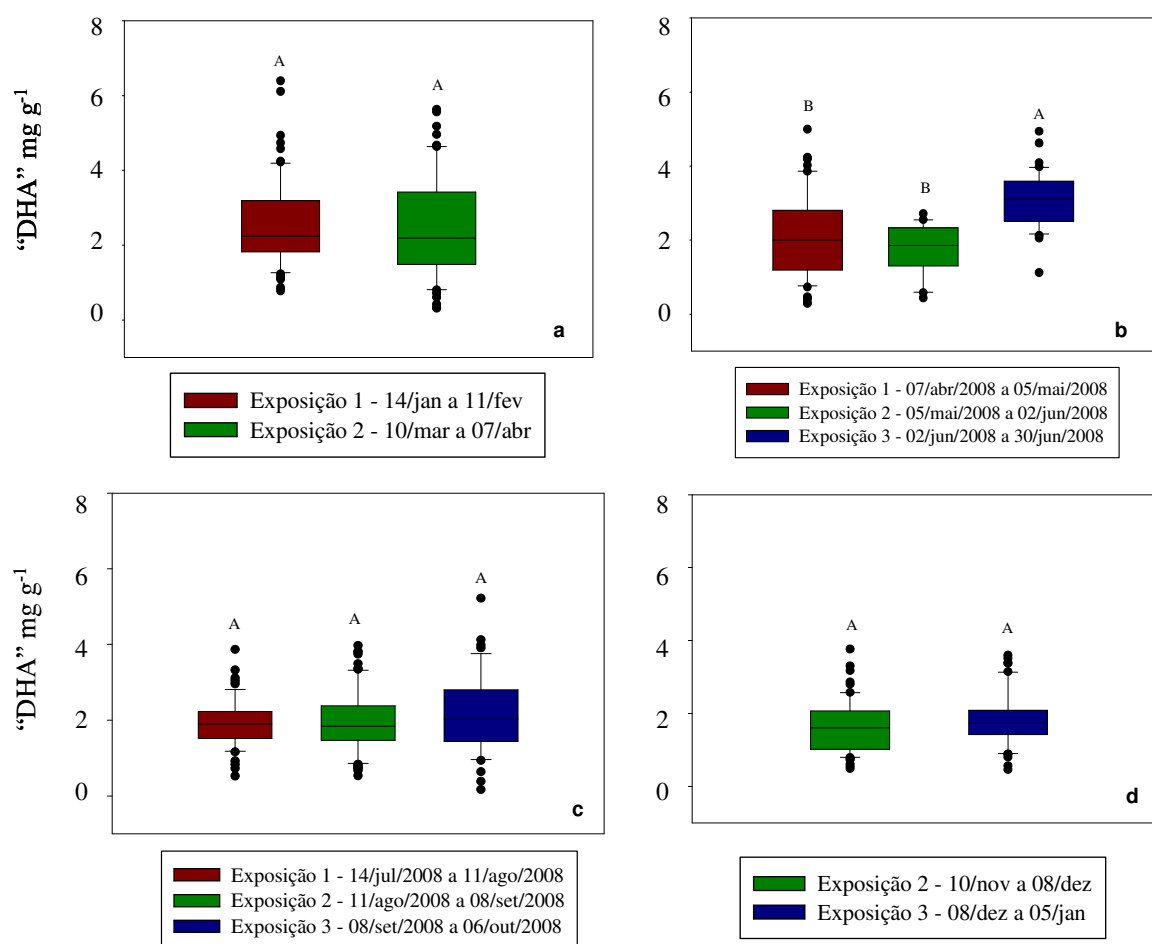


Figura 24. Concentrações de ácido ascórbico oxidado (DHA) em folhas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ durante as exposições de verão (a), outono (b), inverno (c) e primavera (d). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

O estado redox de AA, representado pela razão entre AA e AA_{total}, não variou entre as exposições de verão e outono (fig. 25 a, b), porém nas estações de inverno e primavera (fig. 25 c,d) houve um aumento nestas razões, principalmente nas exposições 3 de cada estação. As razões de AA variaram de 0,43, estimado para uma planta da 2^a. exposição do outono a 0,92 para uma planta da 1^a. exposição do outono e outra da 2^a. exposição do verão.

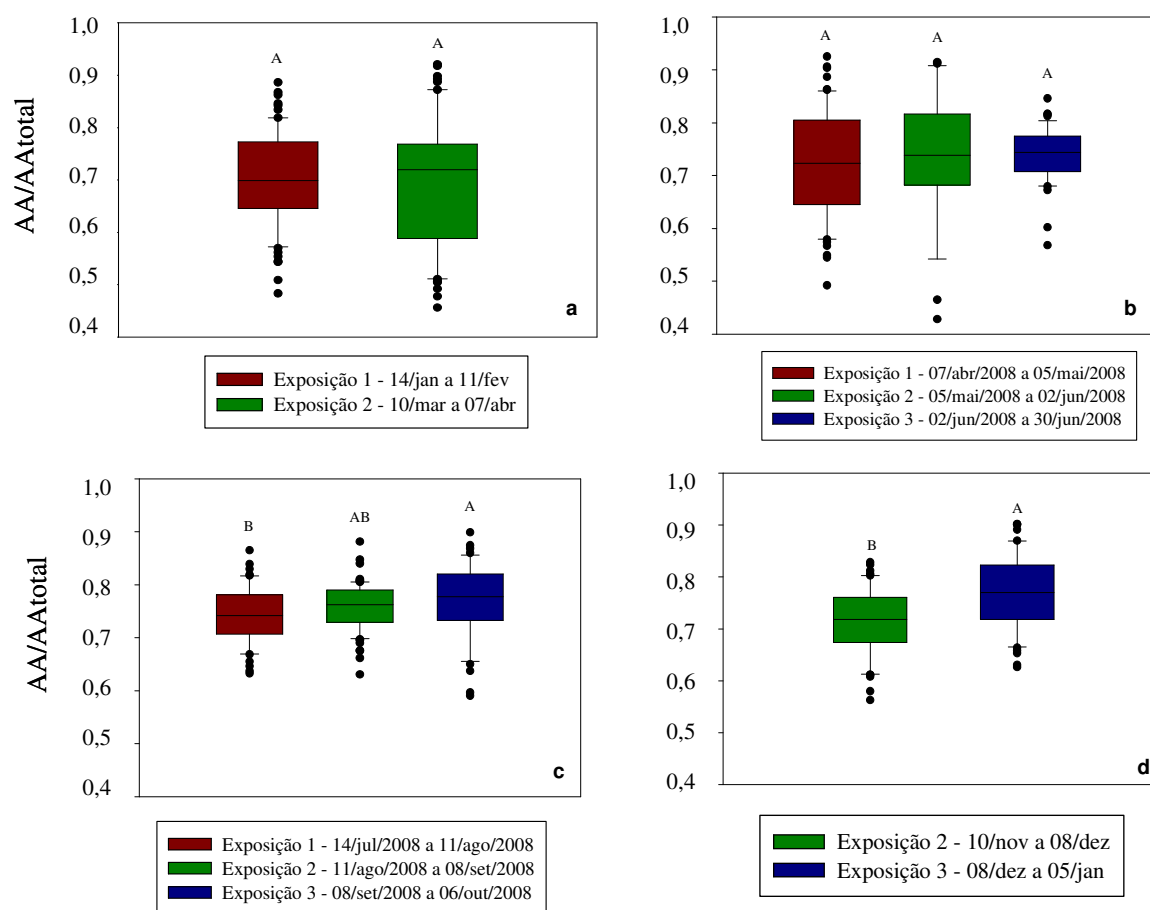


Figura 25. Razões entre de ácido ascórbico reduzido (AA) e ácido ascórbico total (AA total) de folhas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' durante as exposições de verão (a), outono (b), inverno (c) e primavera (d). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

As atividades de APX e SOD (fig. 26 a, c) variaram entre as estações, porém de maneira diferente. Para APX, as menores atividades foram determinadas nas plantas do outono e as maiores nas da primavera. Para SOD, as menores atividades foram obtidas no inverno e as maiores no verão. O perfil da atividade de GR (fig. 26 b) não se alterou significativamente ao longo do período experimental.

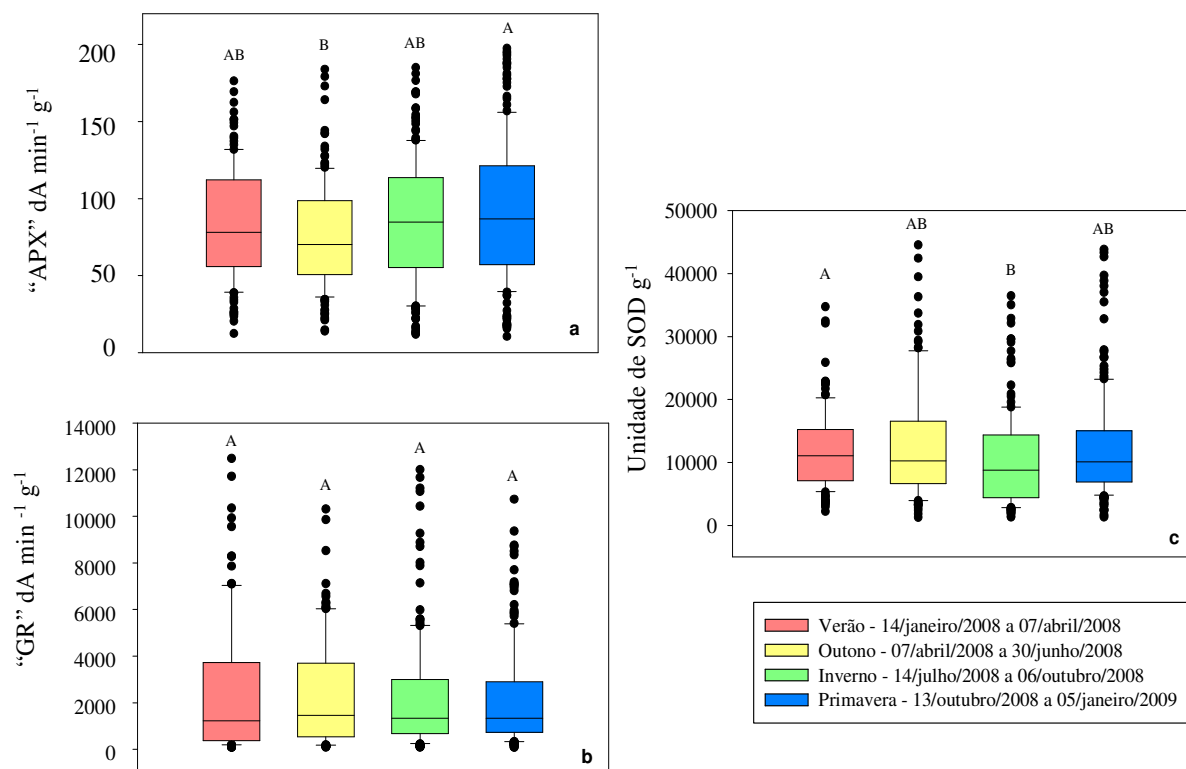


Figura 26. Perfil sazonal das atividades enzimáticas de APX (a), de GR (b) e de SOD (c) em folhas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara'. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições (p < 0,05).

As concentrações de GSH, GSSG e por consequência as razões de GSH por Gtotal (fig. 27 a, b, c) flutuaram durante as estações. GSH e GSSG tiveram suas maiores concentrações no inverno. As menores concentrações de GSH ocorreram no verão e outono e as de GSSG ocorreram na primavera. As razões de GSH por Gtotal se mantiveram altas durante as estações do verão, inverno e primavera e foram significativamente menores no outono.

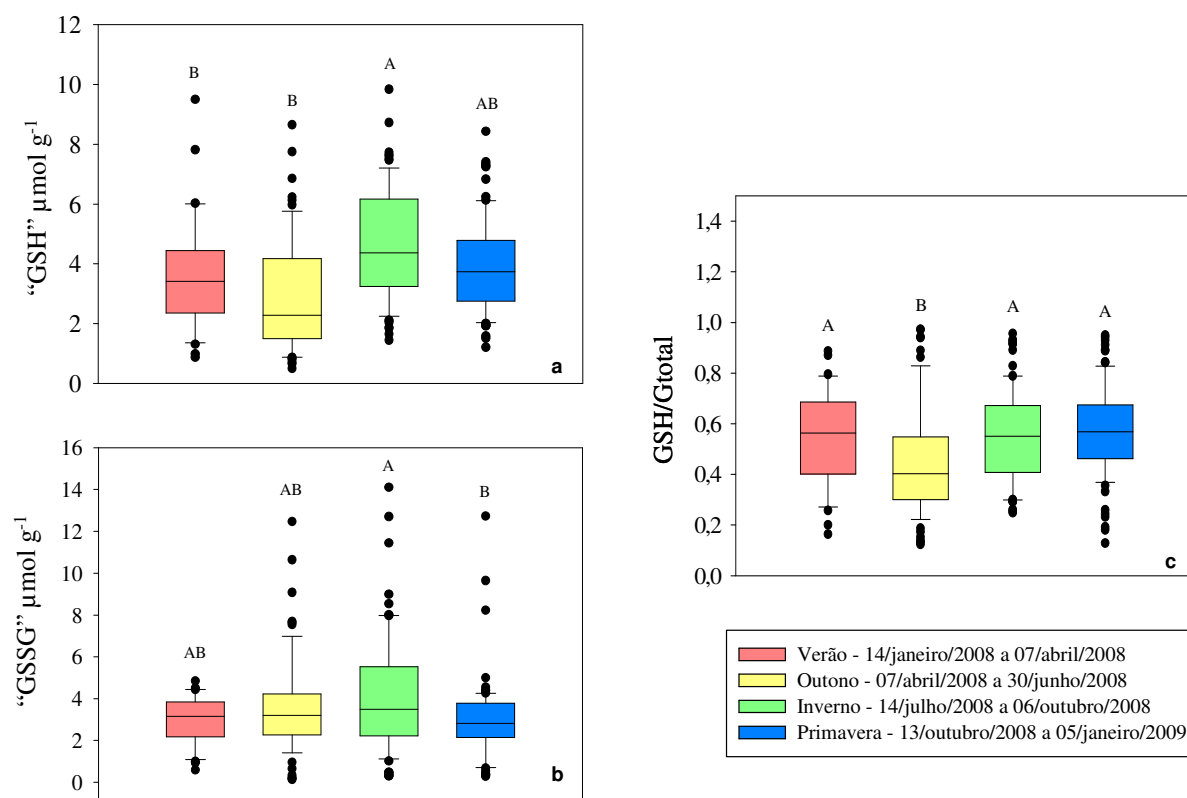


Figura 27. Perfil sazonal das concentrações de glutathiona reduzida (a), glutathiona oxidada (b) e das razões de glutathiona reduzida por glutathiona total (c) em folhas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara'. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições (p < 0,05).

As concentrações de AA, DHA e por consequência as razões de AA por AAtotal (fig. 28 a, b, c) variaram entre as estações. As maiores concentrações de AA ocorreram no outono e inverno e as de DHA no verão e outono. As menores concentrações de AA ocorreram na primavera e as de DHA no inverno e primavera. As razões se mantiveram mais altas durante as estações de outono, inverno e primavera do que durante o verão.

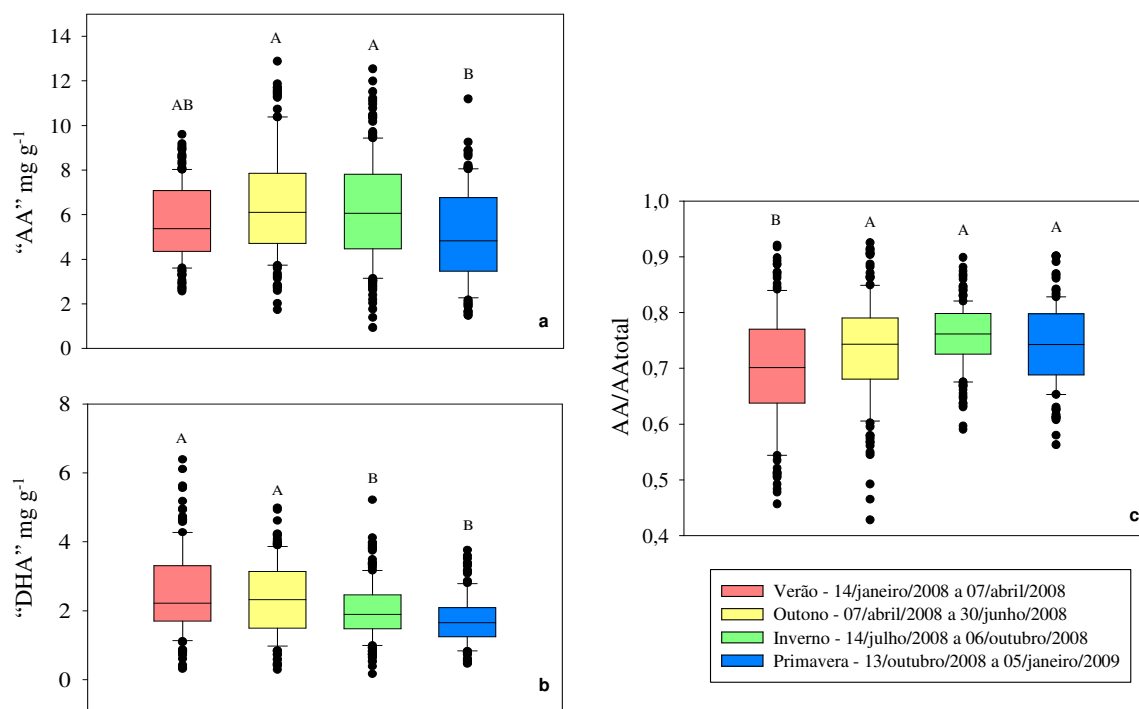


Figura 28. Perfil sazonal das concentrações de ácido ascórbico reduzido (a), ácido ascórbico oxidado (b) e das razões de ácido ascórbico por ácido ascórbico total (c) em folhas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara'. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as exposições ($p < 0,05$).

Danos Foliares Visíveis

Foram verificados danos visíveis, que se assemelham aos induzidos por ozônio em plantas, nas folhas 6 e 7 das plantas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' em todas as exposições realizadas (Tab. 3). Esses danos se caracterizaram principalmente por cloroses entre as nervuras, na superfície adaxial, dando um aspecto zebrado à folha. (fig 30 a). Em alguns momentos, necroses foliares foram observadas entremeadas nas cloroses (fig. 30 b, c). Os danos foliares visíveis verificados no verão não foram característicos de ozônio, já que as necroses foram concêntricas (fig. 31 a, b) e ocorreram nas plantas mantidas dentro e fora da casa de vegetação com ar filtrado (local de referência para danos).

A maior porcentagem média de danos foliares foi verificada na exposição 2 da primavera (17,2%). O valor da maior mediana ocorreu na exposição 3 da primavera (12,5%). Em todas as estações puderam ser observadas folhas 6 e 7 sem danos visíveis, com exceção do que aconteceu na exposição 2 da primavera, em que a porcentagem mínima de danos foi 3. A máxima porcentagem de danos foliares foi 100 e foi observada durante a exposição 1 do outono.

Tabela 3. Valores médios, medianos, mínimos e máximos da porcentagem de área afetada por danos visíveis nas folhas 6 e 7 de plantas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ durante todas as exposições de verão, outono, inverno e primavera. Exposições de verão: 1 (14/01 – 11/02) e 2 (10/03 – 07/04); Exposições de outono: 1 (07/04 - 05/05), 2 (05/05 – 02/06) e 3 (02/06 – 30/06); Exposições de inverno: 1 (14/07 – 11/08), 2 (11/08 – 08/09) e 3 (08/09 – 06/10) e exposições da primavera: 1 (13/10 – 10/11), 2 (10/11 – 08/12) e 3 (08/12 – 05/01/09).

Estação	Exposição	Média	Mediana	Mínima	Máxima
Verão	1	6,0	3,0	0,0	50,0
	2	17,0	3,0	0,0	85,0
Outono	1	13,4	3,0	0,0	100,0
	2	6,1	3,0	0,0	47,5
	3	2,9	3,0	0,0	8,0
Inverno	1	10,7	7,5	0,0	32,5
	2	5,4	0,0	0,0	37,5
	3	5,3	3,0	0,0	22,5
Primavera	1	10,0	7,5	0,0	47,5
	2	17,2	7,5	3,0	77,5
	3	11,7	12,5	0,0	32,5

Apesar da máxima porcentagem de danos foliares visíveis ter ocorrido durante o outono, na estação da primavera ocorreram significativamente mais danos foliares visíveis do que nas outras estações (fig. 29).

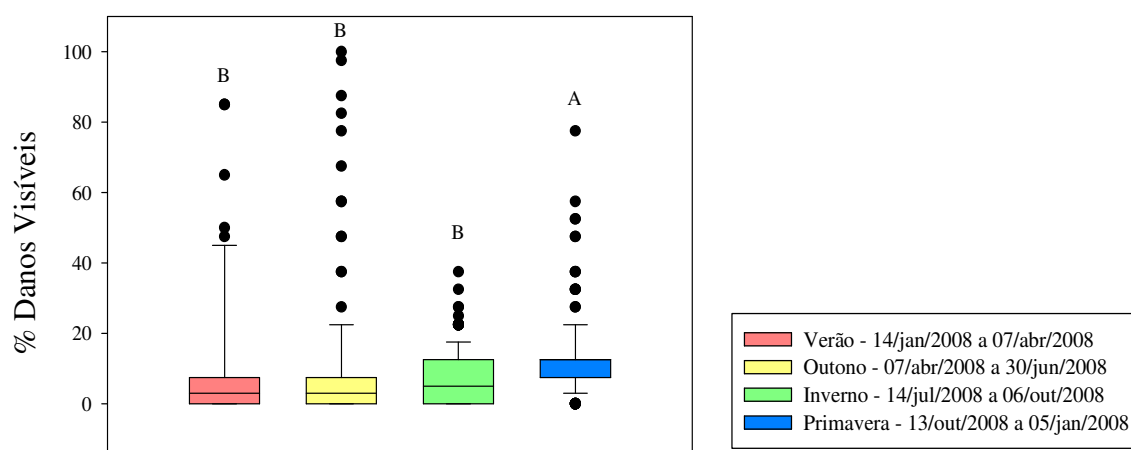


Figura 29. Perfil sazonal de valores percentuais de danos visíveis ocorridos em folhas 6 e 7 de plantas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ durante todas as exposições de verão, outono, inverno e primavera. Letras maiúsculas diferentes significam diferenças estatísticas entre as estações do ano ($p < 0,05$).

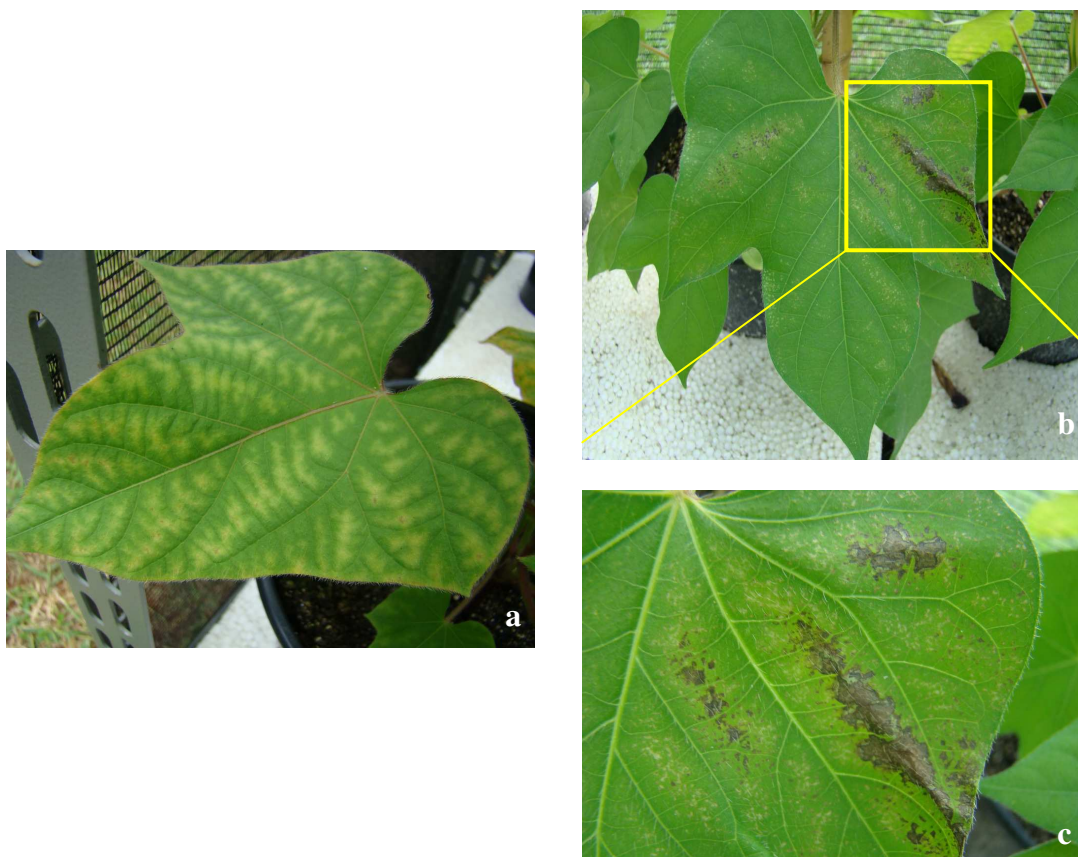


Figura 30. Folhas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ com danos característicos de ozônio: cloroses intervenais (a) e presença de necroses no centro das cloroses (b) foto ampliada destas necroses (c).



Figura 31. Folhas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ com danos não característicos de ozônio em menor grau (a) e com um grau mais avançado de necroses (b) A seta aponta o formato concêntrico da necrose, indicando possível infecção por fungos.

Fatores bióticos x fatores ambientais

Para a realização das análises de correlação de Pearson e das análises de regressão multivariada (tabelas 4 e 5), consideraram-se as concentrações de ácido ascórbico total (AA_{tot}) e de glutathione total (G_{total}), que foram obtidas respectivamente a partir da soma de concentrações de AA e DHA e de GSH e GSSG, além das formas já apresentadas para ácido ascórbico e glutathione (AA, DHA, AA/AA+DHA, GSH, GSSG e GSH/GSH+GSSG). Isto visou explicar de forma mais clara os efeitos dos fatores ambientais sobre esses compostos.

As correlações de Pearson (tabela 4) demonstraram, em geral, uma provável defasagem de tempo entre ocorrência de alteração das condições ambientais (independentemente da variável considerada) e seus reflexos sobre o perfil dos antioxidantes foliares analisados. Em vários casos, dentre as mais intensas (identificadas por maiores valores de r), estão as correlações realizadas entre indicadores do sistema antioxidante e valores médios das diferentes variáveis ambientais entre 4 e 6 dias anteriores às datas de amostragens. Como exemplo, pode-se citar a correlação de AA com a IR média de 6 dias anteriores à amostragem, que foi a maior relação encontrada ($r = -0,49$). Menos freqüentemente foram encontradas relações altamente significativas entre os antioxidantes e as médias das condições ambientais nos 2 ou 3 dias antes da amostragem..

As correlações mais fortes e significativas ocorreram entre os dados climáticos (T, UR, P, IR) e o antioxidante AA, juntamente com todos os fatores associados a este como DHA, AA_{total} e razão de AA por AA_{total}, sendo que a UR sempre esteve associada positivamente a estes enquanto que a T e a IR sempre negativamente.

Em relação aos indicadores de ozônio, como O₃, AOT_{zero}, AOT₂₀ e AOT₄₀, os antioxidantes que obtiveram as relações mais significativas com estes foram APX, GSH e a razão de GSH por G_{total}.

Tabela 4. Correlações de Pearson (r) entre antioxidantes em folhas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ e valores médios de temperatura (T), umidade relativa (UR) e irradiação solar global (IR), precipitação acumulada (P), médias das concentrações máximas horárias de O₃ (O₃) e doses acumuladas de exposição ao O₃ , (AOTzero, 20 e 40) de 2 a 6 dias anteriores às datas de amostragem. Diferenças destacadas (**p < 0,005** e **p < 0,05**).

Antioxidante	Dias	T	UR	P	IR	O ₃	AOT0	AOT20	AOT40
APX	2	-0,05	0,06	0,06	0,05	-0,13	0,05	-0,12	-0,13
	3	-0,01	0,02	0,09	0,13	-0,09	0,13	-0,07	-0,14
	4	0,02	0,00	0,06	0,19	-0,05	0,14	-0,02	-0,11
	5	0,01	0,02	0,11	0,19	-0,10	0,11	-0,07	-0,17
	6	0,00	0,07	0,08	0,18	-0,11	0,10	-0,09	-0,19
SOD	2	-0,02	-0,04	-0,15	-0,01	0,09	0,12	0,07	0,04
	3	-0,02	-0,05	-0,16	-0,04	0,05	0,03	0,03	-0,01
	4	-0,01	-0,08	-0,18	-0,01	0,07	0,05	0,04	0,01
	5	0,04	-0,07	-0,20	-0,01	0,09	0,07	0,06	0,01
	6	0,04	-0,06	-0,20	-0,03	0,11	0,08	0,09	0,03
GR	2	-0,04	0,00	0,02	0,01	0,01	-0,03	-0,03	0,06
	3	-0,03	-0,01	-0,01	-0,01	0,01	0,00	-0,04	0,03
	4	0,00	-0,02	-0,01	-0,01	0,06	-0,01	0,02	0,10
	5	0,00	-0,08	-0,01	0,02	0,04	0,00	0,02	0,08
	6	0,01	-0,10	-0,03	0,02	0,08	0,04	0,07	0,16
GSH	2	-0,22	-0,08	-0,05	0,14	-0,11	0,01	-0,04	-0,07
	3	-0,19	-0,06	0,01	0,12	-0,10	0,00	-0,04	-0,04
	4	-0,13	-0,06	-0,02	0,11	-0,09	-0,06	-0,01	-0,05
	5	-0,14	-0,02	0,00	0,06	-0,15	-0,07	-0,07	-0,13
	6	-0,15	-0,06	0,02	0,09	-0,16	-0,05	-0,07	-0,14
GSSG	2	-0,15	-0,04	-0,10	-0,13	-0,01	-0,10	0,04	0,10
	3	-0,12	-0,07	-0,14	-0,14	0,03	-0,04	0,07	0,14
	4	-0,09	-0,09	-0,14	-0,15	0,05	-0,02	0,09	0,14
	5	-0,06	-0,12	-0,14	-0,16	0,01	-0,04	0,06	0,11
	6	-0,04	-0,18	-0,12	-0,12	0,03	-0,02	0,07	0,12
Gtotal	2	-0,24	-0,07	-0,10	-0,01	-0,07	-0,07	0,00	0,03
	3	-0,20	-0,08	-0,10	-0,03	-0,04	-0,03	0,03	0,08
	4	-0,14	-0,10	-0,12	-0,04	-0,01	-0,05	0,06	0,07
	5	-0,13	-0,10	-0,11	-0,08	-0,08	-0,07	0,00	0,00
	6	-0,12	-0,17	-0,08	-0,03	-0,07	-0,05	0,01	0,00
GSH/Gtotal	2	-0,07	-0,01	0,05	0,19	-0,15	0,03	-0,12	-0,17
	3	-0,10	0,01	0,14	0,22	-0,16	-0,01	-0,13	-0,18
	4	-0,07	0,04	0,10	0,22	-0,17	-0,09	-0,14	-0,19
	5	-0,11	0,10	0,12	0,19	-0,20	-0,08	-0,17	-0,24
	6	-0,13	0,11	0,10	0,17	-0,23	-0,07	-0,19	-0,26
AA	2	-0,28	0,08	-0,09	-0,16	-0,05	0,01	-0,01	-0,03
	3	-0,33	0,18	-0,12	-0,38	-0,14	-0,02	-0,14	-0,13
	4	-0,33	0,18	-0,12	-0,43	-0,09	0,02	-0,09	-0,08
	5	-0,33	0,19	-0,14	-0,47	-0,08	0,03	-0,10	-0,10
	6	-0,28	0,19	-0,10	-0,49	-0,02	0,06	-0,05	-0,08
DHA	2	-0,15	0,01	-0,24	-0,13	-0,06	-0,08	-0,04	-0,03
	3	-0,16	0,06	-0,25	-0,24	-0,12	-0,09	-0,10	-0,10
	4	-0,17	0,06	-0,23	-0,30	-0,06	-0,02	-0,04	-0,03
	5	-0,16	0,07	-0,21	-0,35	-0,06	-0,01	-0,04	-0,04
	6	-0,11	0,06	-0,17	-0,34	-0,03	0,01	-0,01	-0,02
AAtotal	2	-0,26	0,06	-0,14	-0,16	-0,06	-0,02	-0,02	-0,03
	3	-0,30	0,15	-0,16	-0,36	-0,15	-0,04	-0,13	-0,13
	4	-0,30	0,16	-0,16	-0,42	-0,08	0,01	-0,08	-0,07
	5	-0,30	0,17	-0,17	-0,46	-0,08	0,02	-0,09	-0,09
	6	-0,25	0,17	-0,13	-0,48	-0,02	0,05	-0,04	-0,07
AA/AAtotal	2	-0,13	0,07	0,22	-0,02	0,03	0,12	0,04	0,03
	3	-0,16	0,13	0,22	-0,13	0,00	0,10	-0,01	0,01
	4	-0,16	0,12	0,20	-0,12	0,00	0,08	-0,01	-0,01
	5	-0,18	0,11	0,13	-0,10	0,02	0,08	-0,01	-0,02
	6	-0,17	0,14	0,12	-0,14	0,05	0,08	0,00	-0,02

Estes resultados nortearam a análise de regressão, que procurou estabelecer o quanto da variabilidade nos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e no estado redox de ácido ascórbico e glutathiona em plantas de *I. nil* poderiam ser explicadas, de forma combinada, por oscilações nas condições climáticas e nos níveis de contaminação de O₃ entre 2 e 6 dias antes de cada dia de amostragem. Para essa análise, foram considerados fatores climáticos como temperatura, umidade relativa, precipitação, irradiação solar global e um dos indicadores de contaminação atmosférica por ozônio (médias das máximas concentrações horárias, doses acumuladas totais (AOT0) e acima de 20 (AOT20) e 40 ppb (AOT40)).

Na tabela 5, foram apresentados, entre os significativos, apenas os modelos de regressão mais explicativos, ou seja, aqueles com coeficientes de explicação (r^2) mais altos. Verificou-se que as variações nos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e no estado redox em plantas de *I. nil* 'Scarlet O'Hara' foram explicadas significativamente e de forma combinada por oscilações nas condições climáticas e nos níveis de contaminação de ozônio no período entre 3 e 6 dias que antecederam os dias de amostragem.

Os modelos lineares menos explicativos foram propostos para Gtotal (6%), APX e SOD (7%) e os mais explicativos (24%) foram propostos para AA e AAtotal.

A atividade da SOD aumentou na medida em que a temperatura média aumentou e a precipitação foi menor nos 5 dias anteriores à amostragem.

Já a atividade da APX foi influenciada negativamente pela temperatura e positivamente pela umidade relativa, irradiação solar e pela dose total acumulada de ozônio (AOTzero) nos últimos 4 dias anteriores de cada amostragem.

As concentrações de ácido ascórbico reduzido e total aumentaram em resposta à diminuição da irradiação solar e a maiores doses totais acumuladas de ozônio (AOTzero) nos 5 dias anteriores à análise desse composto. A forma oxidada do ácido ascórbico apresentou-se em maiores concentrações quando as plantas estiveram submetidas a menor quantidade de precipitação e a menor intensidade de radiação solar nos 5 dias que antecederam a amostragem. O potencial de oxi-redução do ácido ascórbico, por sua vez, foi maior nas plantas expostas a maior quantidade de chuva, a menores temperaturas e a picos horários de contaminação atmosférica por ozônio nos últimos 5 dias antes de sua retirada do campo.

As variações na atividade da GR não foram significativamente explicadas por oscilações em quaisquer fatores ambientais inseridos na análise de regressão.

As concentrações foliares de glutathiona reduzida diminuíram após períodos de 6 dias com maior temperatura do ar, picos horários de ozônio e menor intensidade da irradiação solar. O mesmo ocorreu para o potencial redox de glutathiona, no entanto a influência destes fatores se deu em períodos de 3 dias. Os níveis de GSSG foram maiores na medida em que o

ar estava menos úmido e a intensidade de luz solar era mais baixa, nos últimos 5 dias de exposição antes da amostragem das plantas. As concentrações de glutathione total foram reduzidas em plantas expostas a uma maior umidade do ar e a picos horários de concentração de ozônio ocorridos nos 6 dias que antecederam a análise desse antioxidante.

Tabela 5. Resultados da análise multivariada entre fatores abióticos e antioxidantes de plantas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ expostas no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) durante os períodos de exposição das estações do ano de 2008. (+): efeito positivo; (-): efeito negativo. (T): Temperatura; (UR): umidade relativa; (P): precipitação; (IR): Irradiação solar global.

Antioxidantes	T	UR	P	IR	Indicador O ₃ ***	r ²	p**	Intervalo de tempo*
log 10 SOD	+		-			0,07	< 0,001	5 dias
raiz quadrada APX	-	+		+	+	0,07	< 0,001	4 dias
AA				-	+	0,24	< 0,001	5 dias
ordenação DHA			-	-		0,19	< 0,001	5 dias
AA _{tot}				-	+	0,24	< 0,001	5 dias
ordenação AA/AA _{tot}	-		+		+	0,10	< 0,001	5 dias
log 10 GR	Modelo não significativo							
log 10 GSH	-			+	-	0,12	< 0,001	6 dias
ordenação GSSG		-		-		0,10	< 0,001	5 dias
log 10 G _{total}		-			-	0,06	0,003	6 dias
raiz quadrada GSH/G _{tot}	-			+	-	0,17	< 0,001	3 dias

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

** Nível de significância.

*** Os sinais destacados em azul referem-se à AOTzero e em vermelho às concentrações máximas horárias de ozônio.

A análise de componentes principais (n =35) explicou 44% da variação total dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (Figura 32 e Tabela 6). As variáveis ácido ascórbico reduzido (AA) e ácido ascórbico oxidado (DHA) estiveram mais fortemente correlacionados com o eixo 1 e APX, GR e GSH com o eixo 2. A variável danos esteve mais relacionada com o eixo 1 do que o eixo 2. Embora a ACP não tenha revelado evidente sazonalidade nos indicadores biológicos que a compuseram, algumas tendências claras podem ser destacadas. A maioria das unidades amostrais da primavera e várias do inverno, localizadas no lado positivo do eixo 1, foram caracterizadas pela presença de danos, em maior ou menor intensidade e por baixos níveis de AA e DHA. Por outro lado, muitas unidades amostrais do outono e do inverno, situadas no lado negativo do eixo 1, foram marcadas pela ausência ou por poucos danos e níveis mais altos de AA e DHA. Além disso, as unidades

amostrais localizadas no lado positivo do eixo 2, entre as quais a maioria das plantas expostas no inverno, foram definidas por níveis mais altos de GSH, maiores atividades de GR e APX e baixa atividade de SOD. Ao contrário, cerca de 75% das unidades amostrais do outono distinguiram-se por maiores atividades de SOD e menores de GR e APX, por baixa concentração de glutathiona (GSH), além de maiores níveis de AA e DHA e não manifestação de danos visíveis, conforme comentado anteriormente.

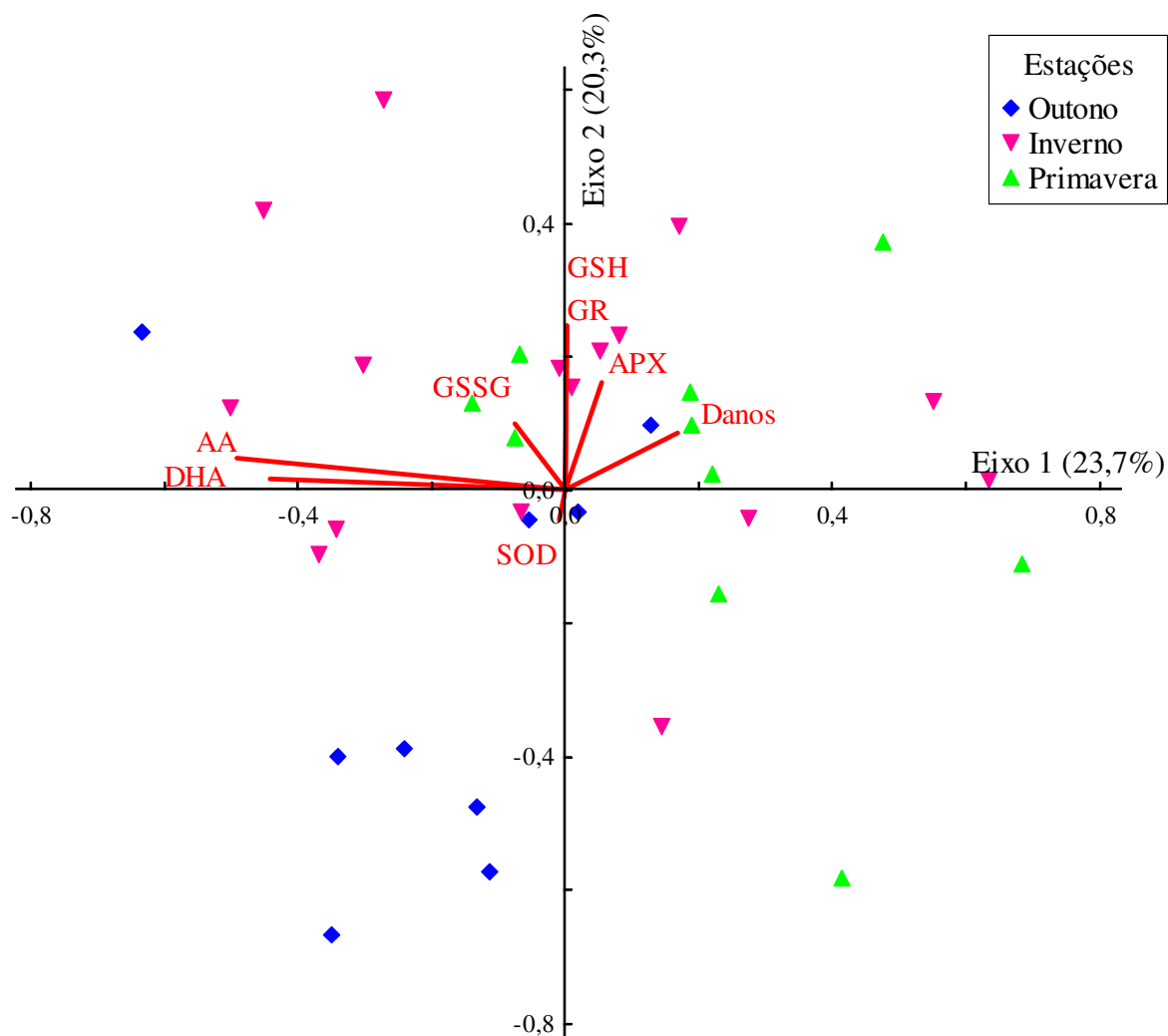


Figura 32. Análise dos componentes principais entre as variáveis biológicas medidas em plantas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ expostas no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), durante o outono, inverno e primavera de 2008: (AA) ácido ascórbico reduzido, (APX) ascorbato peroxidase, (Danos) danos foliares visíveis, (DHA) ácido ascórbico oxidado, (GR) glutathiona redutase, (GSH) glutathiona reduzida, (GSSG) glutathiona oxidada e (SOD) superóxido dismutase. Outono – 07/04/08 a 30/06/08; Inverno – 14/07/08 a 06/10/08 e Primavera – 13/10/08 a 05/01/09.

Tabela 6. Correlação das variáveis biológicas (antioxidantes e danos foliares visíveis) com os componentes principais e variabilidade explicada (44%).

Eixos	APX	AA	DHA	GR	GSH	GSSG	SOD	Danos	%
1	0,2306	-0,6618	-0,5653	0,0563	0,0633	-0,2248	-0,0863	0,3525	23,7
2	0,4324	0,2209	0,1183	0,5124	0,5484	0,2778	-0,1883	0,2726	20,3

Discussão

A atmosfera da área de estudo mostrou-se favorável à formação de oxidantes fotoquímicos, observando-se comportamento similar ao encontrado em estudos anteriormente realizados na mesma região. No decorrer do dia, conforme a intensidade da irradiação solar aumenta, a fotólise do NO_2 e conseqüentemente a concentração de O_3 no sistema aumentam também e a diminuição na concentração de NO_2 somente ocorre após todo NO ter sido consumido (CETESB 2009).

Porém, o ano de 2008 se mostrou atípico em relação à contaminação atmosférica por O_3 , registrando-se menores concentrações do que as obtidas nos estudos realizados em anos anteriores. As concentrações médias de O_3 estiveram em torno de 60 ppb em 2004 (Esposito *et al.* 2009) e de 30 ppb em setembro e outubro de 2002 (Souza *et al.* 2009), enquanto as concentrações médias de ozônio não ultrapassaram 26 ppb durante os períodos de exposição do presente estudo. O Valor de Referência para a Proteção da Produtividade Agrícola (VRPP), que estabelece uma AOT40 trimestral abaixo de 3000 ppb.h (CETESB 2009), também não foi ultrapassado durante o período de exposição das plantas de *I. nil* 'Scarlet O'Hara' (outono 729 ppb.h; inverno: 888 ppb.h; primavera: 721 ppb.h e o verão: 333 ppb.h, para as 2 exposições), confirmando a condição atípica de contaminação atmosférica pelo poluente em 2008 no local de estudo.

Esse fato parece não estar restrito ao local de estudos já que, de acordo com o relatório da CETESB (2009), houve menor ocorrência de eventos de altas concentrações nos locais monitorados na Região Metropolitana de São Paulo do que nos anos anteriores, com exceção dos anos de 2005 e 2006, em virtude de no período de maior ocorrência deste poluente (setembro a março) ter havido muitos dias de precipitação, com um maior número de horas de nebulosidade, principalmente à tarde e, conseqüentemente, redução da radiação solar incidente, que é um dos mais importantes parâmetros na formação de O_3 . Assim as maiores médias e doses acumuladas de ozônio (AOT0 e 20), que foram encontradas na exposição 2 de inverno, podem ser explicadas pelo menor índice de precipitação e maiores concentrações de NO_x . As menores doses acumuladas (AOT0, 20 e 40) de ozônio na exposição 1 do verão podem ser explicadas pelo alto teor de chuvas e por baixas concentrações médias de NO_x , já que são os óxidos de nitrogênio que determinam a taxa total de reação de formação do ozônio (Baird 2002 b).

De qualquer modo, as alterações no ciclo ascorbato glutatona em plantas de *I. nil* 'Scarlet O'Hara' proporcionadas por ozônio durante o período experimental, foram evidentes mesmo considerando que suas concentrações atmosféricas tenham sido atipicamente baixas para a região.

De acordo com Halliwell & Guteridge (2007), os níveis de antioxidantes foliares variam de acordo com a idade foliar. Porém, isto não ocorreu neste estudo, pelo menos considerando as 6ª. e 7ª. folhas analisadas das plantas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara'. Resultado similar também foi obtido por Ferreira (2007). Além disso, os níveis de antioxidantes, em geral, flutuaram ao longo dos dias das exposições e entre as exposições, mas em ambos os casos, não houve uma tendência que caracterizasse o envelhecimento das folhas analisadas ou mesmo das plantas.

Vários autores relatam uma variação sazonal dos antioxidantes foliares (Bulbovas *et al.* 2005; Ferreira 2007; Halliwell & Guteridge 2007), que também ocorreu neste estudo, exceto em relação à atividade de GR, que não oscilou entre as estações. Contudo, isto não impediu a ocorrência de concentrações diferenciadas de GSH e de GSSG e, portanto, do potencial redox de glutathiona (GSH/GSH+GSSG) nas plantas expostas no ambiente ao longo do período experimental. Assim, estas diferenças podem estar associadas à biossíntese de GSH. Noctor & Foyer (1998) relataram que a superexpressão da primeira enzima da biossíntese de GSH em álamos transgênicos, causou o aumento dos níveis de glutathiona total, porém não alterou a razão GSH:GSSG e a atividade de GR. Cabe lembrar que o potencial redox nas plantas de *I. nil* geralmente esteve em torno de 0,5, caracterizando concentrações semelhantes de GSH e GSSG, exceto no outono, situação em que o menor potencial redox ocorreu devido às menores concentrações de glutathiona reduzida registrada durante todo o período de estudo, fato que pode estar associado às concentrações máximas horárias de ozônio obtidas no período.

A variação da atividade de SOD e APX não seguiu uma tendência sazonal clara, bem como as concentrações de AA e DHA, porém o potencial redox de AA (AA/AA+DHA) foi caracteristicamente menor no verão, devido às baixas concentrações de AA e às maiores concentrações de DHA, o que possivelmente está associado à atividade de APX, já que esta enzima reduz H_2O_2 usando ascorbato como um doador de elétrons no ciclo ascorbato-glutathiona (Israr *et al.* 2006). A diminuição do potencial redox de AA no verão pode ter sido em consequência do ataque das plantas por fungos, com manifestação de sintomas não característicos de ozônio. De acordo com Apel & Hirt (2004), a infecção por patógenos leva à produção de EROs no local de invasão, principalmente $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , o que estimula as respostas antioxidativas, como as observadas durante as exposições de verão. Portanto, nessa estação, os efeitos de fatores ambientais, entre os quais ozônio, sobre o sistema antioxidante podem ter sido influenciados por tal infecção, o que motivou a não inclusão dos resultados obtidos nas exposições do verão nas análises de correlação, de regressão e de componentes principais.

Em termos gerais, as concentrações foliares totais de ascorbato da cultivar `Scarlet O'Hara` de *I. nil* (médias geralmente acima de 8 mg.g⁻¹ MS) foram superiores aos obtidos, em espectrofotômetro, em outras plantas: como *Abelmoschus esculentus* (Bulbovas *et al.* 2008) e *Clementina mandarin* (Iglesias *et al.* 2006), que em ambiente com ar filtrado apresentaram em suas folhas, uma média de 0,6 mg.g⁻¹ MS e 0,15 mg.g⁻¹ MS de ascorbato total, respectivamente; e *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' que expostas às condições ambientais no mesmo local deste estudo apresentaram valores médios em torno de 5,5 mg.g⁻¹ MS (Esposito *et al.* 2009).

Os níveis de antioxidantes podem variar de acordo com a exposição a um estresse, que desequilibra a homeostase celular com o aumento da produção de EROs (Dat *et al.* 2000; Mittler 2002). Este excesso de EROs pode estimular a síntese de metabólitos antioxidantes e aumentar a atividade dos antioxidantes enzimáticos, sendo um indicativo de aumento de tolerância ao estresse (Bray *et al.* 2000). Sendo assim, os níveis mais altos de ácido ascórbico encontrados neste estudo, por si só, já podem indicar potencialmente maior tolerância de *I. nil* ao estresse oxidativo, em comparação com as demais espécies citadas.

Os resultados encontrados nas análises de correlação e de regressão multivariada apontam para um aumento da capacidade antioxidativa de plantas de *I. nil* 'Scarlet O'Hara' em resposta a um aumento do estresse oxidativo induzido por variações a fatores ambientais, entre os quais o ozônio.

Parece evidente que as reações que envolvem o ácido ascórbico foram chaves para conferir maior tolerância contra o estresse oxidativo especificamente induzido pelo ozônio, visto que foram encontradas relações positivas da atividade da APX, das concentrações de ácido ascórbico reduzido e total e do potencial de oxi-redução deste composto com o nível de contaminação atmosférica por este poluente. Esses resultados confirmam os de Ferreira (2007), que também verificou uma associação positiva entre os níveis atmosféricos de ozônio e as concentrações de ácido ascórbico total, medidas por técnica espectofotométrica, e a atividade das peroxidases totais, em plantas da mesma cultivar expostas em outro local da cidade de São Paulo.

O ácido ascórbico é um metabólito chave do sistema antioxidante para proteger plantas da ação tóxica de EROs formadas como parte do metabolismo normal de cloroplastos e mitocôndrias ou durante períodos de estresse oxidativo associado com a exposição ao ozônio, participando das reações que resultam na redução do peróxido de hidrogênio em água (Sharma & Davis 1997; Horemans *et al.* 2000; Burkey *et al.* 2006; Severino *et al.* 2006). Burkey *et al.* (2006) particularmente defendem que o AA apoplástico é o primeiro antioxidante utilizado na defesa contra espécies ativas de oxigênio, especialmente em espécies

tolerantes ao ozônio. No entanto, Tauz *et al.* (2007) considera ambígua a relação entre os antioxidantes, como o ascorbato, e a sensibilidade ao ozônio, relatando que, em clones de *Trifolium*, apenas o ácido ascórbico apoplástico não foi suficiente para explicar a tolerância ao ozônio, enquanto que plantas de tabaco transgênicas, que tem seus níveis endógenos de ascorbato aumentados, devido à superexpressão da enzima deidroascorbato redutase, foram mais tolerantes ao ozônio. Assim o status dos antioxidantes, ou seja, suas concentrações e seu estado redox são cruciais para determinar a tolerância das plantas ao ozônio.

O presente estudo, que foi proposto para elucidar dúvidas levantadas por Ferreira (2007), revelou novos aspectos relativos à capacidade antioxidativa do ácido ascórbico em plantas de *I. nil* que crescem em ambiente contaminado por ozônio.

Verificou-se que houve uma potencialização da reação de oxidação do AA, mediada pela maior atividade da APX, na medida em que as plantas estiveram expostas a maiores concentrações de ozônio, resultando na neutralização do peróxido de hidrogênio. Di Baccio *et al.* 2008, em experimento de fumigação com ozônio em clones de choupo sensíveis e tolerantes a este poluente, observaram que as plantas tolerantes, depois de expostas ao ozônio, aumentaram a atividade da enzima APX, enquanto que as sensíveis diminuíram a atividade deste antioxidante.

As relações positivas entre níveis de AA, AAtotal (AA+DHA) e do potencial de oxi-redução (AA/AA+DHA) desse antioxidante com a contaminação atmosférica pelo poluente, apontam para um investimento na síntese de AA, que pode ser resultado do aumento de sua expressão gênica induzido pelo peróxido de hidrogênio. Isto porque, de acordo com Mancini *et al.* 2006, esta ERO atua como sinalizadora capaz de controlar a expressão gênica dos antioxidantes, como o ascorbato. A importância da biossíntese de ascorbato foi verificada por Noctor & Foyer (1998) que observaram que plantas de *Arabidopsis* com mutação nas vias de síntese de ascorbato se tornaram mais sensíveis ao ozônio, já que continham apenas 30% dos níveis de ascorbato foliar se comparada com as plantas não mutantes.

O aumento do potencial de oxi-redução do ácido ascórbico nas plantas de *I. nil* expostas a um gradiente crescente de concentração do ozônio pode ter ocorrido também às expensas da oxidação ou consumo da glutathiona (GSH), já que foi encontrada relação negativa entre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona total (GSH + GSSG) e potencial redox desse composto (GSH/GSH+GSSG) e os níveis de contaminação atmosférica pelo poluente. O mesmo já foi observado em estudo de fumigação com uma cultivar de *Lycopersicon esculentum*, em que doses agudas de ozônio promoveram a diminuição dos níveis de GSH e aumentaram as concentrações de GSSG, o que resultou em menor potencial redox de glutathiona (Nagendra-Prasad *et al.* 2008).

É interessante pontuar que a diminuição de GSH não significa necessariamente aumento de sensibilidade ao estresse oxidativo, sendo provável o aumento de outros antioxidantes (Noctor *et al.* 1998), como parece ter acontecido com AA nesta pesquisa. Em condições normais no estroma, já se verificam maiores concentrações de AA (acima de 25mM) do que de GSH (1 a 5 mM) (Halliwell & Gutteridge 2007). No apoplasto também se verifica um baixo teor de glutathione, o que, segundo Noctor *et al.* (1998), explicaria a ausência de correlação entre metabolismo de glutathione e tolerância ao ozônio.

As taxas de GSH/GSSG funcionam como sensores redox, que permitem a redução de ascorbato (Dizengremel *et al.* 2008). E a regeneração de DHA a AA ocorre rapidamente quando mediada por GSH, através do ciclo ascorbato-glutathione, renovando constantemente o teor de ascorbato (Israr *et al.* 2006; Noctor 2006; Severino *et al.* 2006; Tauz *et al.* 2007). Verifica-se que a conversão de GSH para GSSG, que reduz DHA neste ciclo, pode ocorrer enzimaticamente, através de DHAR (deidroascorbato redutase) ou espontaneamente em altos valores de pH do estroma (Halliwell & Gutteridge 2007). No entanto DHA, pode também ser reduzido por mecanismos independentes de GSH, talvez por tioredoxinas e/ou glutaredoxinas (Noctor 2006). Outros autores como Di Baccio *et al.* (2008) em experimento citado anteriormente, demonstraram que as concentrações de glutathione de plantas de choupo tolerantes e sensíveis ao ozônio não foram afetadas após exposição ao ozônio, mas as concentrações deste antioxidante foram significativamente maiores nas plantas tolerantes.

Verificou-se, ainda, que as alterações no perfil de alguns antioxidantes nas plantas utilizadas no presente estudo ocorreram em resposta a picos médios horários (média das máximas) de concentração de ozônio nos dias que antecederam as amostragens. Nesse caso, incluem-se a glutathione reduzida, total e o estado redox desta e de ácido ascórbico. É importante ressaltar que as máximas concentrações de ozônio obtidas neste estudo (129 e 138 ppb) superaram as máximas encontradas em anos anteriores, que não passaram de 90 ppb (Esposito *et al.* 2009). As mudanças nos padrões dos demais indicadores do sistema antioxidante analisados foram mais evidentemente decorrentes da exposição total ao ozônio (AOTzero).

Com exceção da atividade de GR, as variações em todos os outros antioxidantes analisados nas plantas de *I. nil* foram associadas também às oscilações em fatores climáticos ao longo do período experimental. Sabe-se que os fatores climáticos podem ser fontes adicionais de estresse oxidativo, como alta ou baixa radiação solar, temperaturas excessivamente altas ou baixas, precipitação deficiente e seca (Larcher 2000). Todos estes fatores contribuem para a formação de EROs, podendo levar a um estresse oxidativo e a mudanças antioxidativas (Bray *et al.* 2000; Dat *et al.* 2000; Apel & Hirt 2004).

Fatores como temperatura, radiação solar, umidade relativa do ar e precipitação igualmente são fontes de EROs por serem mediadores de processos fisiológicos naturais como fotossíntese e respiração. Certamente tais fatores influem nos níveis de condutância estomática, modificando não só as taxas fotossintéticas e assimilação de carbono, mas também o fluxo de ozônio para o interior das folhas (Peñuelas *et al.*, 1999).

Em estudo de fumigação com ozônio em plantas de tabaco sensíveis (*Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’) e tolerantes (*Nicotiana tabacum* ‘Bel B’) a este poluente, Pasqualini *et al.* (2002) verificaram que esta diferença de sensibilidade ao ozônio não esteve relacionada ao diferente fluxo de ozônio, estimado através da condutância estomática e dos níveis de ozônio, observado entre as cultivares. Estiveram mais relacionadas com a maior ou menor capacidade antioxidativa, já que o fluxo de ozônio foi maior nas plantas tolerantes. De acordo com o mesmo autor, estas plantas de tabaco ‘Bel B’, em outros estudos, já haviam apresentado alto teor de ascorbato apoplático constitutivo.

Apesar desses indícios de aumento de tolerância ao estresse oxidativo nas plantas de *I. nil* expostas no local de estudo, observou-se a ocorrência de sintomas visíveis típicos induzidos por ozônio, caracterizados por cloroses e necroses na superfície adaxial das folhas, aparecendo entre as nervuras com maior severidade nas folhas mais velhas. Estes mesmos sintomas foram descritos por Ferreira (2007) ao analisar esta cultivar em resposta ao ozônio. Isto indica que o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante não foi mantido durante os 28 dias de exposição. A análise de componentes principais mostrou claramente que plantas (representadas pelos pontos coloridos no gráfico) caracterizadas pela presença de danos continham especialmente baixos níveis de AA e DHA, ressaltando novamente a importância desse composto para o aumento da tolerância destas ao estresse oxidativo.

No entanto, durante todas as estações do ano, as porcentagens médias de danos não ultrapassaram 18%. Essa ocorrência moderada de sintomas visíveis pode tanto indicar que o estímulo do sistema antioxidante atenuou a ocorrência de danos oxidativos como simplesmente refletir a condição atípica de contaminação atmosférica no ano de estudo. Já Ferreira (2007) observou, em seu estudo, que as respostas antioxidativas de plantas de *I. nil* ‘Scarlet O’Hara’ foram menos intensas no verão e mais na primavera, coincidindo com maiores e menores porcentagens de injúrias respectivamente, em resposta a doses equivalentes de exposição acumulada de ozônio. Nesse caso, as respostas antioxidativas mais intensas na primavera aparentemente atenuaram a ocorrência de danos foliares.

Além disso, houve uma relação temporal comprovada entre as mudanças nas condições ambientais e seus reflexos sobre o sistema antioxidante das plantas de *I. nil* mantidas no campo durante o período experimental. Isto pode ajudar a explicar o fato de que

as injúrias visíveis geralmente surgem dias após o início da exposição das plantas no ambiente a ser monitorado. Ferreira (2007), por exemplo, verificou que as injúrias foliares nas plantas de *I. nil* ‘Scarlet O’ Hara’ utilizadas em seu experimento sempre surgiram após a primeira semana do início da exposição. Essa defasagem de tempo pareceu variar em função das condições ambientais como um todo durante o monitoramento, e não somente em função dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio. Sendo assim, pode-se inferir que o aumento da eficiência do sistema antioxidante parece ter resultado pelo menos no retardamento da manifestação dos primeiros sintomas.

Conclusões

Com o presente estudo, conclui-se que:

1. A variação na atividade de ascorbato peroxidase (APX) e de superóxido dismutase (SOD) e das concentrações de ácido ascórbico (AA) e glutathione (GSH), em suas formas reduzida e oxidada, e do potencial oxi-redução do ácido ascórbico e da glutathione em plantas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' expostas em ambiente contaminado por ozônio, foram sazonalmente pouco evidentes.
2. As variações nos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e no estado redox de ácido ascórbico e glutathione foram explicadas significativamente e de forma combinada por oscilações nas condições climáticas (temperatura, umidade relativa do ar, precipitação, irradiação solar) e nos níveis de contaminação de ozônio no período entre 3 a 6 dias que antecederam os dias de amostragem.
3. As reações que envolveram o ácido ascórbico foram chaves para conferir maior tolerância contra o estresse oxidativo especificamente induzido pelo ozônio, aparentemente às expensas da oxidação ou consumo da glutathione, mas não foi suficiente para impedir a ocorrência de sintomas visíveis nas plantas ao longo do período experimental. Plantas caracterizadas pela presença de danos continham, em especial, baixos níveis de AA e DHA, ressaltando novamente a importância desse composto para o aumento da tolerância destas ao estresse oxidativo.
4. Esta cultivar pode ser pouco indicada para o biomonitoramento de ozônio em áreas urbanas brasileiras, pelo menos sob as mesmas condições de contaminação atmosférica ocorridas no presente estudo, uma vez que variações na capacidade de oxi-redução podem alterar a manifestação de sintomas visíveis.

Resumo

O interesse por parte de cientistas e políticos pela poluição por ozônio troposférico (O_3) vem crescendo substancialmente, visto que suas concentrações tendem a aumentar nas próximas décadas, inclusive nos países em desenvolvimento. Além disso, trata-se de um poluente com alto poder oxidativo. Uma vez absorvido pelas plantas, o ozônio reage com água e produz espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). Em excesso, essas EROs podem provocar desde danos biomoleculares até injúrias foliares visíveis, que são comumente observadas em plantas sensíveis ao ozônio, como supostamente é *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’, e são geralmente utilizadas como resposta indicadora da presença do poluente na atmosfera. Para neutralizar estas EROs, as plantas possuem um sistema antioxidante cuja eficiência, determinada pela sua capacidade oxi-redução, pode limitar os danos causados pelo ozônio. Assim, o presente estudo teve como objetivos: avaliar o potencial de oxi-redução, em plantas de *I. nil* expostas em área contaminada por ozônio, por meio de variações na atividade de ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) e nas concentrações de glutathione e de ácido ascórbico, em seus estados reduzidos e oxidados; identificar os fatores ambientais determinantes da variação destes antioxidantes e verificar se a capacidade oxi-redução em plantas desta cultivar interferem no surgimento de danos foliares, influenciando na eficiência desta planta como bioindicadora. Para tal, plântulas da cultivar foram transplantadas para vasos plásticos contendo substrato comercial e cresceram em casa de vegetação (sob ar filtrado), com irrigação contínua e adubação semanal com N:P:K (20:20:20). Cerca de 30 dias após o transplante, 36 plantas foram colocadas no ambiente externo da casa de vegetação, localizada no Instituto de Botânica, no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, caracterizando o início de cada exposição, que teve duração de 28 dias. Realizaram-se 2 exposições no verão (14/01/08 – 11/02/08 e 10/03/08 – 07/04/08); 3 exposições no outono: (07/04/08 - 05/05/08, 05/05/08 – 02/06/08 e 02/06/08 – 30/06/08); 3 exposições no inverno (14/07/08 – 11/08/08, 11/08/08 – 08/09/08 e 08/09/08 – 06/10/08) e 3 exposições na primavera (13/10/08 – 10/11/08, 10/11/08 – 08/12/08 e 08/12/08 – 05/01/09). Em 6 dias sorteados por exposição, foram retiradas 6 plantas das quais as folhas 6 e 7 mais velhas foram analisadas quanto às atividades de SOD, APX e GR e às concentrações de glutathione reduzida (GSH), oxidada (GSSG), por espectrofotometria, e às concentrações de ácido ascórbico reduzido (AA) e oxidado (DHA) por cromatografia líquida de alta eficiência. Estimaram-se, também, o potencial redox da glutathione (GSH/GSH+GSSG) e do ácido ascórbico (AA/AA+DHA). As maiores médias e doses acumuladas de ozônio (AOT0 e 20)

ocorreram na exposição 2 de inverno enquanto o inverso se deu na exposição 1 de verão, incluindo a AOT40. No entanto, as concentrações de ozônio foram atipicamente baixas em 2008 no local, com a maior média de 25,6 ppb. Observaram-se oscilações nos indicadores do sistema de defesa, no entanto a sazonalidade não foi marcante. As variações dos antioxidantes, exceto glutathione redutase, e do estado redox de ácido ascórbico e glutathione foram explicadas de forma combinada por oscilações na temperatura, umidade relativa, precipitação, irradiação solar e nos níveis de contaminação de ozônio no período entre 3 a 6 dias que antecederam os dias de amostragem. As reações que envolvem o ácido ascórbico foram chaves para conferir maior tolerância contra o estresse oxidativo especificamente induzido pelo ozônio, que parece ter ocorrido às expensas da oxidação ou consumo da glutathione (GSH). O aumento da tolerância ao estresse oxidativo não foi suficiente para impedir a ocorrência de sintomas visíveis nas plantas ao longo do período experimental. Os danos foliares ocorreram em todas as estações com porcentagens médias de no máximo 18%, com mais intensidade na primavera. Plantas caracterizadas pela presença de danos continham, em especial, baixos níveis de AA e DHA, o que sugere novamente a importância deste antioxidante para a proteção destas plantas contra este estresse. Assim esta cultivar parece ser pouco indicada para o biomonitoramento de ozônio em áreas urbanas brasileiras, pelo menos sob as mesmas condições de contaminação atmosférica ocorridas no presente estudo, uma vez que variações em sua capacidade de oxi-redução podem alterar a manifestação de sintomas visíveis.

Abstract

The prediction that tropospheric ozone (O_3) concentrations tend to increase substantially during the next decades, inclusively in developing countries, is attracting attention of scientists and politicians. Moreover, it is a pollutant highly oxidative; once absorbed by plants, ozone reacts with water and produces reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ($O_2^{\bullet -}$) and hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$). In excess, these ROS may generate from biomolecular damage to visible leaf injuries, which are commonly observed in plants sensitive to ozone, as presumably is *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara', and are generally used as a response indicator of the presence of the pollutant in the atmosphere. However, the antioxidant system of plants, whose efficiency is determined by its oxidation-reduction capacity, may neutralize these ROS and restrain the occurrence of visible damage caused by ozone. The present study aimed: to evaluate the oxi-reduction potential in plants *I. nil* exposed in an area polluted by ozone, measuring the variations in the activity of ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) and concentrations of glutathione and ascorbic acid in its reduced and oxidized states, identifying environmental factors determining the variation of these antioxidants and to verify whether the redox capacity in plants of this cultivar may interfere with the occurrence of visible leaf damage, thus affecting its efficiency as bioindicator plant. Therefore, seedlings of the cultivar were transplanted to plastic pots containing commercial substrate and grown in a greenhouse under filtered air, receiving continuous irrigation and weekly fertilization with N: P: K (20:20:20). Approximately 30 days after transplanting, 36 plants were exposed under field conditions in an area next to the greenhouse, characterizing the beginning of the exposure period, which lasted 28 days each. Two exposure experiments were held in the summer (14/01/08 - 11/02/08 and 10/03/08 - 07/04/08), 3 experiments in the fall (07/04/08 - 05/05/08, 05/05/08 - 02/06/08 and 02/06/08 - 30/06/08), 3 experiments in the winter (14/07/08 - 11/08/08, 11/08/08 - 08 / 09/08 and 08/09/08 - 06/10/08) and 3 experiments in the spring (13/10/08 - 10/11/08, 10/11/08 - 08/12/08 and 08/12 / 08 - 05/01/09). In each exposure period, at 6 days randomly selected, the activities of SOD, APX and GR and the concentrations of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione (spectrophotometry) and the concentrations of reduced (AA) and oxidized (DHA) ascorbic acid (by liquid chromatography with high efficiency) were determined in the 6th and 7th leaves of 6 plants. The glutathione (GSH/GSH+GSSG) and ascorbic acid (AA/AA+DHA) redox potential was also estimated. The highest average and cumulative doses of ozone (AOT0 and 20) occurred in 2nd exposure of winter. The lowest air contamination by ozone, including the AOT40, occurred during the

1th exposure of summer. However, ozone concentrations were unusually low at the study site in 2008, presenting 25.6 ppb as the highest average. Oscillations were observed in indicators of the defense system, but the seasonality was not outstanding. Except for the glutathione reductase, the changes in the antioxidants and in the redox state of ascorbic acid and glutathione in plants were explained by their combination with the air temperature and relative humidity fluctuations, precipitation, solar radiation and contamination levels of ozone in the period of 3 to 6 days before each sampling day. The reactions involving ascorbic acid seemed to be primordial to increase the plant tolerance against the oxidative stress specifically induced by ozone, which appears to have occurred at the expense of oxidation or consumption of glutathione (GSH). The increased tolerance to oxidative stress was not sufficient to prevent the occurrence of visible symptoms in plants throughout the experimental period. The leaf damage occurred in all seasons with mean percentages of at most 18%, with more intensity in the spring. Plants characterized by the presence of damage contained, in particular, low levels of AA and DHA, which suggests again the importance of this antioxidant to protect this cultivar against this kind of stress. In conclusion, this cultivar seems to be less suitable for the biomonitoring of ozone in urban areas in Brazil, at least under the same conditions of atmospheric contamination occurred in this study, since variations in their ability to redox might alter the expression of visible symptoms.

Referências Bibliográficas

Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 55: 373-399.

Arbaugh, M., Bytnerowicz, A., Grulke, N., Fenn, M., Poth, M., Temple, P. & Miller, P. 2003. Photochemical smog effects in mixed conifer forests along a natural gradient of ozone and nitrogen deposition in the San Bernardino Mountains. *Environment International*, 29: 401-406.

Asada, K. 1984. Assay of ascorbate-specific peroxidase. *Methods Enzymological*, v.105, pp.427-429.

Ashmore, M. R. 2003. Air pollution impacts on vegetation in Europe. *In: L. Emberson, M. Ashmore & F. Murray (eds.). Air pollution on crops and forests, a global assessment.* Imperial College press, London, pp. 59-88.

Ashmore, M. R. 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment*, 28: 949-964.

Baird, C. 2002 (a). A química da estratosfera: a camada de ozônio. *In: C. Baird (ed.) Química Ambiental.* Bookman, Porto Alegre, 2 ed, pp.39-58.

Baird, C. 2002 (b). A química e a poluição do ar na troposfera. *In: C. Baird (ed.) Química Ambiental.* Bookman, Porto Alegre, 2 ed, pp.107-123.

Ballester, F. 2005. Air Pollution and health: an overview with some case studies. *In: P. Nicolopoulou- Stamati, L. Hens & C.V. Howard (eds.). Environmental Health Impacts of Transport and Mobility.* Springer, Netherlands, pp. 53-77.

Barbosa, L.M., Potomati, A. & Peccinini, A. A. 2002. O PEFI: Histórico e legislação. *In: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo.* Imprensa Oficial, São Paulo, pp.17- 28.

Barros, F., Mamede, M. M., Lopes, E.A., Jung-Mendaçoli, S.L., Kirizawa, M., Muniz, C.F.S., Makino-Watanabe, H., Chiea, S.A.C. & Melhem, T.S. 2002. A flora fanerogâmica do PEFI: composição, afinidades e conservação. *In*: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Imprensa Oficial, São Paulo, pp.95-108.

Bassin, S., Kolliker, R., Cretton, C., Bertossa, M., Widmer, F., Bungener, P., Fuhrer, J. 2004. Intra-specific variability of ozone sensitivity in *Centaurea jacea* L., a potencial bioindicator for elevated ozone concentrations. *Environmental Pollution*, 131: 1-12.

Bianchini, R. S. 1998. *Ipomoea* L. (Convolvulaceae) no Sudeste do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, K. V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91:179-194.

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., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C. & Domingos, M. 2005. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasil. Bot.*, v.28, n.4, pp.687-696.

Bulbovas, P., Sant'Anna, S.M.R., Moraes, R.M., Lima, E. S., Pina, J. M., Espósito, M. P., Ferreira, M. L., Spielmann, A. A., Sollito, C. M., Rinnert, C. H, Peralta, D. F., Cardoso, J. S., Carminitti, L., Canêz, L.S., Reis, M.M.S., Benatti, M.N., Souza, S.R. & Domingos, M. 2008. Avaliação da sensibilidade de plantas jovens de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. – Malvaceae) ao ozônio. *Hoehnea* 35(3), pp. 359-366.

Burkey, K.O., Neufeld, H. S., Souza, L., Chappelka, A. H. & Davison, A.W. 2006. Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone-sensitive wildflowers. *Environmental Pollution*, 143: 427-434.

CETESB. 2000. Estudo do comportamento do ozônio na região metropolitana de São Paulo. Série Relatórios. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

CETESB. 2009. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo de 2008. Série Relatórios. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

Colville, R.N. 2003. Emissions, dispersion and atmospheric transformation. *In:* J.N.B. Bell & M. Treshow (eds.). Air Pollution and Plant Life. 2 ed, John Wiley & Sons LTD, England, pp. 24- 41.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova', E., Montagu, M. V., Inzé D. & Breusegem, F. V. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 779–795.

De Temmerman, L., Bell, J.N.B., Garrec, J.P., Klumpp, A., Krause, G.H.M., & Tonneijck, A.E.G. 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. *In:* Klumpp, A., Ansel, W. & Klumpp, G. Urban air pollution, bioindication and environmental awareness. Cuvillier Verlag, Gottingen, pp. 337-342.

Di Baccio, D., Castagna, A., Paoletti, E., Sebastian, L. & Ranieri, A. 2008. Could the differences in O₃ sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O₃ influx? *Tree Physiology*, 28: 1761-1772.

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.

Domingos, M., Bourotte, C., Klumpp, A., Klumpp, G. & Forti, M.C. 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. *In:* D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Imprensa Oficial, São Paulo, p.221-250.

Duarte, D. J., Bianco, S., Melo, M.N. & Carvalho, L.B. 2008. Crescimento e nutrição mineral de *Ipomoea nil*. Planta daninha 26 (3).

Emberson, L. 2003. Air pollution on crops and forests: an introduction. *In*: L. Emberson, M. Ashmore & F. Murray (eds.). Air pollution impacts on crops and forests. A global assessment. Imperial College Press, Singapore, pp. 3-34.

Esposito, M. P., Ferreira, M. L., Sant'Anna, S.M.R., Domingos, M. & Souza, S. R. 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' under environmental conditions in São Paulo, SE – Brazil. Atmospheric Environment, 43: 619–623.

Fernandes, A.J., Reis, L.A.M. & Carvalho, A. 2002. Caracterização do meio físico. *In*: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Imprensa Oficial, São Paulo, pp.49-62.

Ferreira, M. L. 2007. Relações entre antioxidantes e sintomas visíveis bioindicadores de ozônio em *Ipomoea nil* (L.) Roth cv. Scarlet O'Hara sob efeito da poluição aérea urbana de São Paulo. Tese de doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.

Fowler, D., Cape, J.N., Coyle, M., Smith, R.I., Hjellbrekke, A.G., Simpson, D., Derwent, R.G. & Johnson, C.E. 1999. Modelling photochemical oxidant formation, transport, deposition and exposure of terrestrial ecosystems. Environmental Pollution, 100: 43-55.

Franzle, O. 2006. Complex bioindication and environmental stress assessment. Ecological Indicators. 6: 114–136

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

Fundación CEAM. 2009. How to recognize ozone symptoms. Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo. <http://www.ozoneinjury.org> (acesso em 20/10/2009).

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 2007. Reactive species can pose special problems needing special solutions: some examples. *In: Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 4^a ed, pp. 341-394.

Hong-bo, S., Li-ye, C., Ming-an, S., Jaleel, C. A. & Hong-mei, M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 433-441.

Horemans, N., Foyer, C. H., Potters, G. & Asard, H. 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38: pp. 531–540.

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

Iriti, M. & Faoro, F. 2008. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollution* 187: 285-301.

Israr, M., Sahi, S., Datta, R. & Sarkar, D. 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* 65: 591–598.

Karnosky, D. F., Skelly J. M., Percy K.E. & Chappelka, A. H. 2006. Perspectives regarding 50 years of research on effects of tropospheric ozone air pollution on US forests. *Environmental Pollution*, pp. 1-18.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M. J., Rasmussen, S., Ribas, H., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P. & Calatayud, V. 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment*. 40: 7437 – 7448.

Larcher, W. 2000. A planta sob estresse. *In: Ecofisiologia Vegetal*, Rima, São Carlos, pp. 341-437.

- López, A., Montaña, A., Garcia, P. & Garrido A.** 2005. Note: quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fresh olives in commercial presentations of table olives. Food Science. Tech. Int. 11:199-204.
- Mage, D., Ozolins, G., Peterson, P., Webster, A., Orthofer, R., Vandeweerd, V. & Gwynne, M.** 1996. Urban air pollution in megacities of the world. Atmospheric Environment, 30: 681-686.
- Mancini, A., Buschini, A., Restivo, F.M., Rossi, C. & Poli, P.** 2006. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. Plant Science, 170: 845- 852.
- Manes, F., Vitale, M., Fabi, A. M., De Santis, F. & Zona, D.** 2007. Estimates of potential ozone stomatal uptake in mature trees of *Quercus ilex* in a Mediterranean climate. Environmental and Experimental Botany, 59: 235-241.
- Manning, W.J., Cooley, D.R., Tuttle, A.F., Frenkel, M.A., Bergweiler, C.J.** 2004. Assessing plant response to ambient ozone: growth of young apple trees in open-top chambers and corresponding ambient air plots. Environmental Pollution, 132: 503-508.
- Marshall, F.M.** 2003. Effects of air pollutants in developing countries. *In:* J.N.B. Bell & M. Treshow (eds.). Air Pollution and Plant Life. 2 ed, John Wiley & Sons LTD, England, pp. 407-410.
- Massambani, O. & Andrade, F.** 1994. Seasonal behavior of tropospheric ozone in the São Paulo (Brazil) Metropolitan Area. Atmospheric Environment, 28: 3165-3169.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7: 405-410.
- Muggli, R.** 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. *In:* F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi & C. Rice-Evans (eds.). Free radicals and antioxidants in nutrition. Richelieu Press, London, pp. 189-250.

Nagendra-Prasad, D., Sudhakar, N., Murugesan, K. & Mohan, N. 2008. Pre-exposure of calli to ozone promotes tolerance of regenerated *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 plantlets against acute ozone stress. *Journal of Plant Physiology* 165: 1288—1299.

Noctor, G. 2006. Metabolic signaling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environmental*, 29: 409-425.

Noctor, G., Arisi, A. C. M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Rennenberg, H. & Foyer, C.H. 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, vol. 49, n. 321, pp. 623–647.

Noctor, G. & Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 249-279.

Nouchi I & Aoki K. 1979. Morning glory as a photochemical oxidant indicator. *Environmental Pollution* 18: 289-303.

Novak, K., Skelly, J.M., Schaub, M., Krauchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P. 2003. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environmental Pollution* 125: 41–52.

Paoletti, E., Contran, N., Bernasconi, P., Günthardt-Goerg, M.S., Vollenweider, P. 2009. Structural and physiological responses to ozone in Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) leaves of seedlings and mature trees under controlled and ambient conditions. *Science of the Total Environment*, 407: 1631-1643.

Paoletti, E. & Manning, W. J. 2007. Toward a biologically significant and usable standard for ozone that will also protect plants. *Environmental Pollution*, 150: 85-95.

Paoletti, E., Ranieri, A. & Lauteri, M. 2008. Moving toward effective ozone flux assessment. *Environmental Pollution*, 156: 16–19.

Pasqualini, S., Antonielli, M., Ederli, L., Piccioni, C., Loreto, F. 2002. Ozone uptake and its effect on photosynthetic parameters of two tobacco cultivars with contrasting ozone sensitivity. *Plant Physiol Biochem* 40: 599-603.

Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B. S. and Filella, I. 1999, Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (N.E. Spain), Environ. Monitor. Assess. 56, 221–224.

Ramachandra Reddy, A., Chaitanya, K. V., Jutur, P. P. & Sumithra, K. 2004. Diferencial antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. Environmental and Experimental Botany. 52: 33-42.

Sánchez, M.J.S., Peña, G.S., Lorente, V.C., Gallego, M.T.M. & Albert, J.C. 2003. La contaminación atmosférica en los bosques: Guía para la identificación de daños visibles causados por ozono. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid.

Sant’anna, S. M. R. 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo. Tese de doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.

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 : 389-394.

Schaub, M., Bassin, S. & Kräuchi, N. 2001. Assessment of ozone visible injury on 16 ICP-forests level II Plots in Switzerland. www.ozone.wsl.ch/lwf%20assess.pdf (acesso em 30.03.2008).

Severino, J. F., Stich, K. & Soja, G. 2006. Ozone stress and antioxidant substances in *Trifolium repens* and *Centaurea jacea* leaves. Environmental Pollution pp.1-8.

Sharma, Y. K. & Davis, K. R. 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. Free Radical Biology & Medicine, 23: 480–488.

Singh, P., Agrawal, M. & Agrawal, S. B. 2009. Evaluation of physiological, growth and yield responses of a tropical oil crop (*Brassica campestris* L. var. Kranti) under ambient ozone pollution at varying NPK levels. Environmental Pollution, 157: 871-880.

Souza, S. R., Sant'Anna, S. M. R., Rinaldi, M. C. S. & Domingos, M. 2009. Short-term leaf responses of *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' to ozone under the environmental conditions of São Paulo, SE – Brazil. Brazilian Archives of biology and Technology, vol. 52, n.1 : pp. 251-258.

Staehelin, L. A. & Newcomb, E. H. 2000. Membrane Structure and Membranous Organelles. In: B.B. Buchanan, W. Gruissen, R.L. Jones (eds.). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, New York, pp.3.

Tausz, M., Grulke, N.E. & Wieser, G. 2007. Defense and avoidance of ozone under global change. Environmental Pollution 147: 525-531.

Tausz, M., Sircelj, H. & Grill, D. 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? Journal of Experimental Botany, 55: 1955–1962.

VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effect of photooxidants. Method of the standardised tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

Vollenweider, P. & Gunthardt-Goerg, M. 2006. Erratum to “Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage”[Environ. Pollut. 137 (2005) 455e465]. Environmental Pollution 140: 562- 571.

Wittig, V., Ainsworth, E.A. & Long, S.P. 2007. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. Plant, Cell and Environment, 30: 1150-1162.

Wohlgemuth H., Mittelstrass K., Kschieschan S., Bender J., Weigel H.J., Overmyer K., Kangasjärvi J., Langebartels C. & Sandermann H. 2002. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. Plant Cell Environ., 25:717–726.

Yang, W. & Omaye, S.T. 2008. Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutation research: Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, pp. 1-10.