

MARISIA PANNIA ESPOSITO

**CAPACIDADE DE OXI-REDUÇÃO DE  
PLANTAS JOVENS DE *Tibouchina pulchra*  
(CHAM.) COGN. : RESPOSTA  
INDICADORA DE MUDANÇAS NA  
QUALIDADE DO AR NO ENTORNO DE  
UMA REFINARIA DE PETRÓLEO NA  
REGIÃO DE CUBATÃO, SP**

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

SÃO PAULO – 2013

MARISIA PANNIA ESPOSITO

**CAPACIDADE DE OXI-REDUÇÃO DE  
PLANTAS JOVENS DE *Tibouchina pulchra*  
(CHAM.) COGN. : RESPOSTA  
INDICADORA DE MUDANÇAS NA  
QUALIDADE DO AR NO ENTORNO DE  
UMA REFINARIA DE PETRÓLEO NA  
REGIÃO DE CUBATÃO, SP**

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

ORIENTADORA: DRA. MARISA DOMINGOS

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

Esposito, Marisia Pannia

E77c Capacidade de oxi-redução de plantas jovens de *Tibouchina pulchra* (Cham.)

Cogn.: resposta indicadora de mudanças na qualidade do ar no entorno de uma refinaria de petróleo na região de Cubatão, SP / Marisia Pannia Esposito -- São Paulo, 2013.

150 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013

Bibliografia.

1. Poluição atmosférica. 2. Melastomataceae. 3. Antioxidante. I. Título

CDU: 502.55

À minha família: Maria de Lourdes,  
Anielo (*in memoriam*),  
Marco, Breno, Henrique,  
Sheila e Jéssica.

## **Lua de Mel**

(Premeditando o Breque)

.....

Ao lado das montanhas e ao longe oceano  
Brilham luzes eternas, brilha um sonho urbano  
Venha sentir a fragrância no ar, lua de mel

Leve neblina filtra a luz do luar  
E uma lágrima solta foge do teu olhar  
Paira poeira para o pulmão  
Numa lua de mel em Cubatão

.....

Ah! O ar aqui realmente existe, dá até pra pegar  
Ai, o verde, as árvores são verdes, o rio é verde  
O céu, a terra, as estrelas, até os cachorros, tudo verde

.....

Nunvens de enxofre, ver do mangue o entardecer  
E sobre o oleoduto nosso amor vai arder  
Nuvens de cinza, cheiro de gás, lua de mel

.....

## AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora, Dra. Marisa Domingos, pelo vasto conhecimento transmitido, pelo apoio, pela orientação nos momentos que mais precisei, pela amizade, pelo exemplo profissional a ser seguido e constante incentivo. Sou e sempre serei muito grata a você!*

*Às pesquisadoras do Núcleo de Pesquisa em Ecologia, Dra. Regina Maria de Moraes, Dra. Mirian Cilene Spasiani Rinald e Dra. Patrícia Bulbovas, pela constante colaboração, seja em laboratório, no empréstimo de livros e artigos científicos para a escrita de relatórios e até mesmo um bom bate-papo sobre várias dúvidas científicas.*

*Às funcionárias do Núcleo de Pesquisa em Ecologia, Amariles, Waldenice, Dora e Marli, pelo grande apoio em laboratório, pela ajuda nas viagens de campo e pela amizade.*

*Aos alunos do “Projeto Cubatão”: Ricardo(O Preferido), Daiane, Andréa, Jéssica , Simone e Pedro, pessoas essenciais para o bom andamento do projeto. Foi sensacional trabalhar com todos vocês!*

*Aos integrantes do “Projeto Paulínia”: Patrícia Giampaoli (obrigada pelos empréstimos de livros de terror), Andressa, Cristiane, Marcelle, Ana Paula, Dra. Carla Zuliani, Leonardo, Douglas, Marcela, Celina e Solange, pelas melhores conversas do mundo e ajuda sempre que precisei, seja em laboratório, seja na estatística.*

*À minha “aquática” preferida, Pryscilla Denise. Você sempre faz falta em São Paulo!*

*Aos motoristas do Instituto de Botânica, pela colaboração nas viagens à Cubatão.*

*Aos funcionários do Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente da Universidade de São Paulo (CEPEMA), em especial ao Erick*

*e ao Luciano, pelo cuidado com nossas plantas expostas em Cubatão e constante ajuda nos mais diversos problemas técnicos.*

*Ao Instituto de Botânica, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.*

*À Petrobrás, pelo auxílio financeiro ao projeto e por autorizar a instalação do experimento no Caminho do Mar.*

*À FAPESP, pela concessão de minha bolsa de doutorado (Processo 2008/58682-1).*

*À Companhia Energética de São Paulo (CESP), pela doação de mudas de Tibouchina pulchra durante os quatro anos do presente projeto.*

*Ao Instituto Florestal, por permitir a instalação do experimento no Núcleo Pilões do Parque Estadual da Serra do Mar.*

*Às melhores amigas do mundo: Erica, Sheila, Vanessa, Evelin, Aline, Juliana Pina e Silvinha Sant'Anna. Umas estão perto, outras longe, mas são essenciais sempre. Espero que entendam a minha ausência nesse período, e agradeço por sempre continuarem me chamando para sair.*

*Ao Rodrigo Sant'Ana Cabral, pela alegria e leveza que sempre me proporcionou neste último ano. Obrigada pelas palavras de apoio nos meus momentos de "piração", por entender o meu humor (ou falta dele), e por me levar aos lugares, shows e eventos familiares onde sempre me diverti demais!*

*Enfim, agradeço a família mais linda e sensacional da galáxia, meus irmãos Breno e Marco, minha mamis Maria de Lourdes e meu fantástico sobrinho, Henrique, que sempre me deixa feliz quando o vejo. Ao meu pai, Anielo, que deve estar olhando tudo extremamente orgulhoso!*

## ÍNDICE

<b>Resumo</b>	01
<b>Abstract</b>	02
<b>Capítulo I – Introdução Geral</b>	
Introdução	04
Referências bibliográficas	21
<b>Capítulo II – Estado redox de <i>Tibouchina pulchra</i> (Cham). Cogn. exposta no entorno de uma refinaria de petróleo na região de Cubatão</b>	
Resumo	31
Abstract	32
Introdução	33
Materiais e Métodos	36
Resultados	48
Discussão	86
Conclusões	91
Referências bibliográficas	92
<b>Capítulo III – Respostas antioxidativas de plantas de <i>Tibouchina pulchra</i> (Cham). Cogn. expostas sob condições controladas</b>	
Resumo	97
Abstract	98
Introdução	99
Material e Métodos	101
Resultados	108
Discussão	129
Conclusões	134
Referências bibliográficas	134
<b>Capítulo IV – Discussão Geral</b>	
Discussão geral	138
Referências bibliográficas	142

## Resumo

A Floresta Atlântica, que recobre as encostas da Serra do Mar na região de Cubatão, tem sido afetada por poluentes aéreos emitidos pelas indústrias. O impacto dos poluentes na região da Serra do Mar foi intensamente estudado na década de 1990 por meio do monitoramento biológico com diferentes espécies vegetais, como a espécie pioneira da Floresta Atlântica, *Tibouchina pulchra*, conhecida por acumular metais, fluoreto e enxofre em seus tecidos. A espécie foi adotada neste estudo como bioindicadora modelo para monitorar riscos associados a uma nova situação de contaminação atmosférica por poluentes com potencial oxidativo no entorno da Refinaria Presidente Bernardes (RPBC), situada no Complexo Industrial de Cubatão, já que ela mudou seu sistema de geração de energia, da queima de óleo combustível em caldeiras para uma termoeletrica (UTE) movida a gás natural. Os objetivos gerais do estudo realizado foram: 1) Determinar a capacidade de oxi-redução de plantas jovens de *T. pulchra*, quando submetidas a um gradiente de condições ambientais, no entorno da RPBC, na condição de contaminação atmosférica antes e após o início de operação da UTE (capítulo II, em condições de campo); 2) verificar se o impacto dos poluentes observados na região de Cubatão é capaz de alterar os níveis de respostas antioxidativas de *T. pulchra* (capítulo III, em condições de câmaras de topo aberto). A capacidade de oxi-redução de *T. pulchra* foi analisada por meio de componentes do sistema de defesas antioxidativas: concentração de ácido ascórbico e glutatona, atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutatona redutase e também por meio de análises de um indicador de estresse oxidativo em nível celular, o acúmulo de malondialdeído, precursor da peroxidação lipídica. No estudo realizado em campo, houve tendência de variação dos níveis de antioxidantes ao longo dos períodos de exposição que abrangeram todo período de troca do sistema de produção de energia pela refinaria de petróleo, em resposta ao aumento da concentração de poluentes atmosféricos com poder oxidativo. Os antioxidantes não enzimáticos – ácido ascórbico e glutatona – bem como a enzima ascorbato peroxidase foram essenciais para demonstrar o estado redox de *T. pulchra*. No estudo realizado em câmaras de topo aberto, a temperatura afetou a atividade de todos compostos enzimáticos. A concentração da glutatona, principalmente em sua forma reduzida, bem como as enzimas catalase e ascorbato peroxidase foram as principais responsáveis por manter a tolerância de *T. pulchra* ao estresse oxidativo imposto pela poluição atmosférica na região.

## Abstract

The Atlantic Forest, which covers the slopes of the Serra do Mar in the Cubatão region has been affected by air pollutants emitted by industries. The impact of the pollutants at that region was extensively studied during the decade of 1990, by means of the biological monitoring with different plant species, such as the native and pioneer tree species of the Atlantic Rainforest, *Tibouchina pulchra*, known as an accumulator of metals, sulfur and fluoride. This species was the biomonitoring model adopted in the present study in order to monitor risks associated with a new situation of atmospheric contamination by pollutants with oxidative potential surrounding the oil refinery Presidente Bernardes (RPBC), located at Industrial Complex of Cubatão. This new situation was due to the change of the power generation system from burning fuel oil in boilers to a natural gas-powered thermoelectric (UTE). The overall aims of the study were: 1) to determine the redox capacity of young plants of *T. pulchra* subjected to a gradient of environmental conditions, in the surroundings of RPBC, before and after the start-up of the new plant (chapter II, under field conditions); 2) to check whether the impact of the pollutants observed in the region of Cubatão alter the levels of antioxidative responses of *T. pulchra* (chapter III, under conditions of open top chambers). The oxy-reduction ability of *T. pulchra* was determined by measuring the following antioxidants: ascorbic acid and glutathione concentration, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate and glutathione reductase enzymatic activity and one indicator of lipid peroxidation, represented by the accumulation of malondialdehyde. The field studies revealed that the general trend of increased oxidative power of the atmosphere from the start-up of UTE on was followed by varying levels of antioxidants in the plants maintained in the study sites during all the period of exchange of the energy production system. Non-enzymatic antioxidant - glutathione and ascorbic acid- and ascorbate peroxidase were essential antioxidants to indicate the redox state of *T. pulchra*. Temperature variations in the open top chambers affected the activity of all enzymatic compounds. The glutathione concentration, mainly in its reduced form, as well as the enzymes catalase and peroxidase ascorbate were the main responsible antioxidant for keeping the tolerance of *T. pulchra* to oxidative stress imposed by air pollution in the region of Cubatão.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

As atividades humanas muitas vezes acrescentam matéria ao ambiente em intensidade ou quantidade que alteram as características físico-químicas e biológicas da atmosfera, corpos d'água e solo (VanLoon & Duffy 2005).

A essa matéria dá-se o nome de poluente, que é, então, qualquer substância adicionada na troposfera em concentração suficientemente alta para causar efeito mensurável nos seres vivos e em materiais (Freedman 1995). Eles podem ser emitidos por fontes naturais, como processos de emissão vulcânica, ou por fontes antrópicas, como a frota veicular e as indústrias, classificadas respectivamente como fontes móveis e estacionárias (Raven *et al.* 2007).

Compostos diretamente emitidos pelas fontes poluidoras, como óxidos de enxofre (SO), nitrogênio (NO) e carbono (CO), material particulado (MP), entre inúmeros outros, são referidos como poluentes primários e aqueles formados na troposfera, a partir de reações entre poluentes primários e constituintes naturais da atmosfera, como o ozônio (O<sub>3</sub>) e o ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), são denominados poluentes secundários (Mayer 1999, Baird 2002, Domingos *et al.* 2002, Raven *et al.* 2007).

Há três fatores que determinam o nível de poluição na troposfera: *a*) concentração de poluentes adicionados no ar, *b*) volume de ar em que os poluentes são dispersos e *c*) mecanismos de remoção dos poluentes do ar (Nebel & Wright 2000).

A poluição atmosférica tem se tornado um fator de risco extremamente importante para a saúde humana, especialmente nos centros urbanos e industrializados. A partir de meados do século XX, medidas passaram a ser adotadas, em diferentes países, para controle das emissões de poluentes atmosféricos, objetivando, inicialmente, a redução de episódios com excessiva concentração de poluente. Os padrões de qualidade do ar adotados a princípio estabeleciam níveis de concentração de poluentes mais elevados. Entretanto, com o aprimoramento dos recursos de investigação de poluentes, observa-se que mesmo com

concentrações abaixo do limite de segurança estabelecido pela legislação vigente, os poluentes atmosféricos podem acarretar efeitos deletérios à saúde humana e à vegetação (Cançado *et al.* 2006, Samet & Krewski 2007, Moura *et al.* 2008, Jasinski *et al.* 2011).

Um exemplo clássico de alta contaminação atmosférica por poluentes de origem industrial, que levou ao declínio de trechos de Floresta Atlântica no Estado de São Paulo, ocorreu na cidade de Cubatão. Esta localiza-se na Baixada Santista, aproximadamente 16 km de Santos, distando cerca de 40 km da cidade de São Paulo, região sudeste do Brasil (23°45' - 23°55'S e 46°21' - 46°30'W) . Possui uma área de 142 km<sup>2</sup> e aproximadamente 121 mil habitantes. Apresenta clima tropical super úmido sem estiagem, com nebulosidade, umidade relativa e precipitação altas (2600 mm anuais). A temperatura média anual é de 23°C (CETESB 2011). Devido à proximidade do Porto de Santos e da Grande São Paulo, e à disponibilidade de energia e mão-de-obra baratas, combinadas com um terreno de superfície plana, a região sofreu um desenvolvimento industrial rápido e incontrolável, principalmente entre as décadas de 1950 e 1970 (Domingos *et al.* 1998), culminando numa grande concentração de indústrias químicas, petroquímicas, siderúrgicas e de fertilizantes, totalizando 110 unidades de produção e cerca de 260 fontes de emissão de poluentes aéreos, entre os quais destacam-se poluentes orgânicos, compostos de nitrogênio e enxofre e poluentes secundários, como o ozônio e o nitrato de peroxiacetila (PAN) (Jaeschke 1997, Klumpp *et al.* 1998, 2000, Domingos *et al.* 1998, Moraes *et al.* 2002, Furlan *et al.* 2004, Perry *et al.* 2010, CETESB 2011).

A localização da cidade de Cubatão e de seu complexo industrial numa planície litorânea estreita envolvida pelas escarpas da Serra do Mar a norte, leste e oeste não favorece a dispersão de poluentes. O fluxo de ventos e, conseqüentemente, as condições de dispersão dos poluentes dentro da área de Cubatão são fortemente influenciados por essa topografia local, sob todas as condições meteorológicas. Podem ser identificadas duas bacias aéreas

principais na região: a do Vale do Mogi, que se estende de norte para nordeste da Vila Parisi e a área urbana de Cubatão, entre a montanha (Serra do Mar) e a região de manguezal (CETESB 2008).

O rápido desenvolvimento industrial experimentado por Cubatão trouxe sérios problemas de poluição para a cidade. De 1970 a 1980, Cubatão cresceu a um índice de 4,43% ao ano e chegou em 1985 com suas indústrias produzindo algo ao redor de 3% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. Cubatão chegou a ser conhecida como o “Vale da Morte”, na década de 1970, devido às altíssimas emissões de poluentes industriais e aos sérios problemas ambientais decorrentes (CETESB 2008).

Em 1984, as indústrias lançavam diariamente no ar quase 1.000 toneladas de poluentes, produzindo níveis de contaminação atmosférica absolutamente críticos. Para reversão deste quadro, foi implementado um programa para controle da poluição industrial, com o objetivo de reduzir a poluição aos níveis aceitáveis, no prazo de cinco anos. As indústrias de Cubatão foram, então, mobilizadas em um abrangente esforço de redução e monitoramento da poluição. Como consequência, já em 1984, 62 cronogramas de atividades de controle foram estabelecidos entre indústrias e a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB), com vistas à redução da poluição atmosférica. De 1984 a 1994, foram investidos cerca de 700 milhões de dólares por parte das indústrias no controle da poluição ambiental, com resultados altamente positivos. Atualmente, a CETESB desenvolve um programa de aperfeiçoamento do controle de fontes existentes, com ênfase no estabelecimento de novos padrões de emissão de poluentes para a região, com vistas à proteção da Serra do Mar, bem como no ataque às fontes ainda não controladas, constituídas basicamente por áreas contaminadas que exigem estudo e remediação (Petrobrás, comunicação pessoal).

A Floresta Atlântica, que recobre as encostas da Serra do Mar na região de Cubatão, tem sido afetada por esses poluentes aéreos emitidos pelas indústrias. De modo geral, a intensidade de danos à floresta atlântica, nas áreas de maior influência da poluição, acompanhou o perfil de intensidade de contaminação atmosférica relatado anteriormente. Até a implantação do programa efetivo de controle das emissões em 1984, época em que os problemas ambientais causados pela poluição em Cubatão atingiram o seu ponto máximo, havia intensa degradação da floresta, com alta mortalidade de árvores e ocorrência de muitas clareiras. Naquele momento, de tão intensos, os efeitos eram observados em nível de paisagem (Pompéia 1997). Na época, a diminuição significativa da densidade da cobertura arbórea provocou alterações no ciclo hidrológico, particularmente no escoamento e infiltração da água no solo e reduziu a resistência mecânica das raízes, aumentando de forma significativa a ocorrência de escorregamentos de solo nas encostas com maior declividade e mais expostas aos poluentes (Ab'Saber 1987, Troppmair & Ferreira 1987, São Paulo 1990, Gutberlet 1996, Pompéia 1997). As perturbações nesses trechos de floresta foram cada vez menos aparentes após a implantação do programa de controle da qualidade do ar na região (São Paulo 1990, Alonso & Godinho 1992, Gutberlet 1996, Pompéia 1997). Apesar da redução das emissões, o impacto sobre a vegetação ainda existia no final da década de 1990 (Moraes *et al.* 2000b). Ressalta-se que o impacto dos poluentes sobre a vegetação não tem sido homogêneo, variando de acordo com o padrão de circulação e estagnação das massas de ar, características orográficas de cada região e proximidade das diferentes fontes de emissão (CETESB 2010).

O impacto dos poluentes na região da Serra do Mar foi intensamente estudado na década de 1990, por grupos de pesquisa do Instituto de Botânica (São Paulo) e das Universidades de Essen e Kassel (Alemanha), por meio do monitoramento biológico com diferentes espécies vegetais. Segundo Klumpp *et al.* (2001), o biomonitoramento pode ser

conceituado como o uso de seres vivos para a verificação e avaliação dos efeitos da poluição ambiental, seja da água, do ar ou do solo. Esses seres vivos, denominados genericamente bioindicadores, são organismos ou comunidades de organismos que reagem a alterações ambientais com a modificação de suas funções vitais normais e/ou da sua composição química, permitindo assim conclusões a respeito das condições ambientais (Arndt & Schweizer 1991). O biomonitoramento pode ser classificado como qualitativo ou quantitativo. O biomonitoramento qualitativo é aquele baseado em decisões do tipo sim/não, como por exemplo, a presença ou ausência de espécies, ou em atributos que predominantemente mudam em resposta a influências ambientais. Já o biomonitoramento quantitativo, que deve servir, em tese, para indicar níveis de contaminação atmosférica por determinados poluentes, requer mais trabalho, pois envolve medidas de alguma natureza e exige padronizações.

Existem diversas nomenclaturas para classificar as plantas utilizadas em programas de biomonitoramento. Porém, uma das mais recentes, proposta por De Temmerman *et al.* (2004) com base em extensa revisão bibliográfica, parece bastante adequada, por classificá-las de acordo com o tipo de resposta bioindicadora predominante que apresentam. Assim, de acordo com esses autores, temos: a) plantas biosensoras ou biomarcadoras, que são aquelas que mostram danos “invisíveis”, em níveis celular, molecular, bioquímico ou fisiológico (ex: clones de *Tradescantia*, que mostram alterações cromossômicas); b) plantas bioacumuladoras, que são consideradas tolerantes, por acumularem elementos da poluição do ar e partículas em seus tecidos (ex: *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* cv. Lema, cultivar acumuladora de metais pesados, enxofre, flúor); c) comunidades de plantas apontadoras, nas quais observam-se mudanças na composição em espécies ou nas relações fitossociológicas entre as espécies (ex: comunidades de líquens) e d) plantas bioindicadoras, que são sensíveis

e mostram sintomas visíveis, como necroses ou cloroses (ex: *Nicotiana tabacum* Bel W3, bioindicadora de ozônio).

O biomonitoramento é um poderoso aliado na avaliação da saúde ambiental, particularmente em ambientes impactados por poluição, pois está baseado no conceito de que as respostas biológicas selecionadas podem proporcionar indicações seguras de exposição dos organismos ao estresse (Shugart 1994).

Basicamente, é possível realizar o biomonitoramento com plantas de duas maneiras. O referido biomonitoramento ativo é realizado por meio da introdução de plantas indicadoras sensíveis ou acumuladoras no ambiente a ser monitorado, sob condições padronizadas. Objetiva-se, desse modo, obter informações sobre a situação atual da poluição aérea e sobre a distribuição espacial e temporal dos poluentes aéreos na região, podendo-se, assim, determinar as causas dos danos à vegetação e fazer previsões de riscos. O biomonitoramento passivo consiste no uso de espécies vegetais que ocorrem naturalmente no ecossistema, de modo a avaliar o estado atual da vegetação e os efeitos da poluição aérea na vitalidade das plantas, detectando mecanismos de resistência (Arndt & Schweizer 1991, De Temmerman *et al.* 2004).

Nos estudos para verificar a fitotoxicidade dos poluentes aéreos na área de Cubatão, empregaram-se essas duas maneiras. Inicialmente, empregaram-se plantas indicadoras padronizadas, com capacidade bioindicadora conhecida, como *Nicotiana tabacum* (tabaco), híbridos de petúnia, *Urtica urens* (urtiga), híbridos de *Gladiolus* (palma-de-santa-rita) e *Lolium multiflorum* SSP. italicum (azevém) (Klumpp *et al.* 1994, 1996a, b, Domingos *et al.* 1998). Em seqüência, foram realizados experimentos com espécies nativas, como a *Tibouchina pulchra* (manacá-da-serra), *Miconia pyrifolia* (jacatirão) e *Cecropia glazioui* (embaúba), por métodos passivos e ativos, objetivando reforçar as conclusões acerca das causas dos danos à vegetação e facilitar as condutas para prognósticos de risco (Domingos *et*

*al.* 1998, 2003, Klumpp *et al.* 1998, 2000, 2002, Furlan *et al.* 1999, 2004, 2007, Moraes *et al.* 2000, 2003, Szabo *et al.* 2003).

Vale destacar, ainda, que a intensidade das respostas vegetais aos poluentes atmosféricos, que são a base do biomonitoramento, depende da taxa de absorção dos mesmos pelas plantas e somente ocorrem após os mecanismos de desintoxicação terem sido suplantados. Os poluentes gasosos penetram na planta diretamente pelos estômatos, durante o processo de trocas gasosas. Após absorção, o poluente pode reagir rapidamente com água, levando à formação das espécies reativas de oxigênio – EROs - na interface da parede celular e à destruição oxidativa dos lipídios e proteínas da membrana plasmática e a produção em cadeia de outros radicais livres e demais intermediários reativos, processo denominado peroxidação lipídica (Mehlhorn *et al.* 1990, Schraudner *et al.* 1998, Kanofsky & Sima 2005, Pucckette *et al.* 2007).

A peroxidação lipídica foi o primeiro tipo de dano oxidativo a ser estudado. A produção endógena de superóxidos e peróxidos de hidrogênio pode iniciar a peroxidação lipídica em membranas biológicas expostas a estresses. Os radicais de ácidos graxos formados dessa maneira podem reagir espontaneamente com o oxigênio, formando peroxiradical de ácido graxo. Este pode propagar a peroxidação de tais moléculas de ácidos graxos pela retirada de átomos de hidrogênio para formar hidroperóxidos e novos radicais de ácidos graxos e assim por diante, levando a oxidação de muitas moléculas de ácidos graxos (Taylor *et al.* 2002). Como resultado da peroxidação de ácidos graxos, ocorre a produção de malondialdeído (MDA) em tecidos submetidos à peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados dentro das membranas (Morrow 2003).

A planta, sob tal cascata oxidativa, pode tornar-se susceptível ao estresse oxidativo, que se instala por desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos seus formadores (Sreenivasulu *et al.* 2007, Farooq *et al.* 2008, Jaleel *et al.* 2009). Em

consequência, efeitos fisiológicos, metabólicos, ultraestruturais e estruturais passam a ocorrer, levando a danos em membranas, perda das funções de organelas, redução na eficiência do metabolismo e da fixação do carbono, sintomas visíveis como cloroses e necroses em tecidos e órgãos. Estes podem evoluir e levar à morte do indivíduo (Manning & Feder 1980, Larcher 2000). Efeitos oxidativos similares também podem ser observados em plantas expostas a outros fatores de estresse biótico e abiótico, como salinidade, seca, calor e frio, senescência, herbicidas, intensidade luminosa, patógenos e nodulação de raízes (Sreenivasulu *et al.* 2007, Farooq *et al.* 2008, Jaleel *et al.* 2009).

As espécies reativas de oxigênio são formas parcialmente reduzidas de oxigênio atmosférico e, em condições normais, a sua produção em células vegetais é rigorosamente controlada pelo sistema de eliminação. São produzidas pelas plantas em seu metabolismo natural, como ocorre na respiração e na fotossíntese. Elas são formadas durante certas reações redox e durante a redução incompleta do oxigênio ou oxidação da água pela cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto ou na mitocôndria. A formação do oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) estimula subsequentemente a produção de outras EROs, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o ânions superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) e peridroxilas ( $\text{O}_2\text{H}^\bullet$ ). Os ânions superóxido são produzidos nos cloroplastos quando os elétrons são transferidos diretamente do Fotossistema I (PSI) para o oxigênio. Estas moléculas reativas, especialmente  $\text{HO}^\bullet$ , são altamente destrutivas para biomoléculas, como os lipídios, ácidos nucléicos e proteínas. No entanto, EROs como  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  são utilizados na lignificação e funcionam também como um sinal de resposta de defesa contra infecções por patógenos (Bray *et al.* 2000).

As EROs, ao oxidar as biomoléculas, criam uma lesão oxidativa que resulta em redução do crescimento e desenvolvimento das plantas (Hernandez-Jimenez *et al.* 2002). Uma vez que as meia-vidas das EROs são extremamente curtas, são seus produtos finais

estáveis de danos oxidativos em macromoléculas celulares os que podem ser usados para monitoramento do estresse oxidativo (Bhaduri & Fulekar, 2012).

As plantas possuem uma série de moléculas enzimáticas e não enzimáticas antioxidantes, que as protegem contra o dano oxidativo e controlam o nível de efeitos das EROs. Entre os compostos antioxidantes enzimáticos, relacionam-se a superóxido dismutase, peroxidases, e catalases, enquanto glutathiona, carotenoides e ácido ascórbico representam os componentes não-enzimáticos (Caregnato *et al.* 2008). Acima de tudo, a interação entre a produção de EROs e seus consequentes mecanismos de eliminação dependem do estado fisiológico da planta e estímulos de desenvolvimento e bioquímicos (Mittler 2002).

O ácido ascórbico (AA), em particular, é uma pequena molécula antioxidante, não enzimática e hidrossolúvel, que executa funções metabólicas essenciais para a vida de plantas e animais. Alguns fungos podem sintetizar ácido eritro-ascórbico, uma vitamina C análoga com funções metabólicas similares. Entre os procariontes, somente as cianobactérias possuem uma pequena quantidade de ácido ascórbico (Arrigoni & De Tullio 2002). O ácido ascórbico serve como co-fator para muitas enzimas (De Tullio *et al.* 1999, Arrigoni & De Tullio 2000), é capaz de manter a estabilidade das membranas celulares em plantas sob estresse causado por poluentes e contribui para a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (Smirnoff & Wheeler 2000, Conklin 2001, Conklin & Barth, 2004). Essa atividade antioxidante do ácido ascórbico está associada com sua resistência ao estresse oxidativo e longevidade em plantas e animais. Além do mais, tem-se sugerido que os níveis endógenos de ácido ascórbico são importantes na regulação do desenvolvimento da senescência e na defesa das plantas contra patógenos (Pastori *et al.* 2003, Barth *et al.* 2004, 2006, Pavet *et al.* 2005). Evidências recentes sugerem que o ácido ascórbico também desempenha papel na indução floral. Ele pode ser encontrado no citossol, em cloroplastos, nos vacúolos e no

apoplasto (Barth *et al.* 2006). Segundo Smirnoff (1996), o ascorbato é o principal metabólito secundário das plantas. Dentro do aparato fotossintético, o ácido ascórbico participa da remoção do peróxido de hidrogênio, formado na foto-redução do Fotossistema I. Essa reação entre ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio é catalisada pela ascorbato peroxidase, que se encontra na divisa do tilacóide e também pode neutralizar o peróxido de hidrogênio. Segundo Conklin & Barth (2004), o ácido ascórbico atua como primeira linha de defesa nas plantas superiores, uma vez que ele se encontra em grande concentração no apoplasto, apresentando dessa forma um efeito direto na proteção contra o ozônio troposférico. O ácido ascórbico é considerado o antioxidante natural mais estudado na prevenção dos danos provocados pelo ozônio nas plantas. O ácido ascórbico apoplástico participa de uma série de reações na parede celular, orientadas para evitar a propagação de radicais livres derivados do estresse provocado por ozônio (Turcsanyi *et al.* 2000), e pode desintoxicar de 30 a 50% do ozônio captado pelas folhas e o aumento de seu teor proporciona maior proteção contra a oxidação (Chen & Gallie 2005). As diferenças no conteúdo de ácido ascórbico e seu estado redox no apoplasto demonstraram afetar a sensibilidade do ozônio de espécies de plantas (Burkey *et al.* 2006, Severino *et al.* 2007). Uma série de estudos também tem sido dedicada à aplicação exógena de ácido ascórbico e seus sais – aplicação foliar, aplicação de raiz e imersão de órgãos vegetais – para proteger plantas agrícolas sensíveis de danos causados pelo ozônio, tais como o repolho, espinafre, pepino, arroz, tabaco, feijão verde e folhas largas de banana (Didyk & Blum 2011).

A superóxido dismutase (SOD) é uma substância enzimática que catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrogênio e oxigênio (Alscher & Hess 1993, Garg & Manchanda 2009). O  $O_2^-$  é produzido em mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos, apoplasto e citossol, onde a cadeia transportadora de elétrons encontra-se presente e, portanto, a ativação do  $O_2$  pode ocorrer em qualquer um desses compartimentos

da célula (Eltner 1991). Neste caso, não é de se surpreender que a SOD possa ser encontrada em todos esses compartimentos subcelulares. Apesar disso, a formação de  $O_2^-$  ocorre preferencialmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Fridovich 1986). Três classes de SOD foram identificadas, dependendo dos metais presentes em seu sítio ativo: cobre/zinco SOD, manganês SOD e ferro SOD. Em plantas superiores, a FeSOD é encontrada nos plastídios, a MnSOD na matriz mitocondrial e peroxissomos e a Cu/Zn SOD no citossol e cloroplastos (Scandalios 1993, Garg & Manchanda 2009). Em folhas senescentes, as atividades da SOD tendem a diminuir, ao passo que a peroxidação lipídica tende a aumentar.

Entre as peroxidases, a ascorbato-peroxidase é uma substância enzimática que desempenha importante papel na decomposição do peróxido de hidrogênio, utilizando moléculas de ácido ascórbico reduzido como substrato. Segundo Iqbal *et al.* (1996), a atividade das peroxidases aumenta nas plantas à medida que ocorrem choques mecânicos, aumento da poluição aérea e sazonalidade climática. A ascorbato peroxidase compreende uma família de isoenzimas com diferentes características e são distribuídas em pelo menos quatro compartimentos celulares: no estroma (sAPX), nos tilacóides (tAPX), cloroplastos (mAPX) e citossol (cAPX) (Leonardis *et al.* 2000).

A catalase (CAT) é uma enzima que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio, indispensável para a desintoxicação das EROs durante o estresse oxidativo. Ela está localizada principalmente nos peroxissomos. Muitas plantas contêm várias isoenzimas calatase (Frúgoli *et al.* 1996, Willekens *et al.* 1997).

A glutathiona reduzida (GSH) foi reconhecida primeiramente há mais de 100 anos, e sua estrutura foi estabelecida em 1935 (Meister, 1988). É um tripéptido de peso molecular baixo, que consiste em ácido glutâmico, cisteína e glicina. É encontrada em abundância em todas as células vegetais e animais, geralmente em concentração milimolar. Ela desempenha

diversas funções importantes, contribuindo para a redução do dehidroascobato e eliminação de radicais livres diretamente através da doação de seu átomo de hidrogênio, resultando na formação de glutathione oxidada (GSSG) e atuando como um co-substrato para a redução de  $H_2O_2$  e outros hidroperóxidos de glutathione peroxidase (GSH-Px). Pode ser encontrada no citossol, mitocôndrias e núcleo, juntamente com inúmeros outros antioxidantes. A glutathione é mantida sob uma forma reduzida através da glutathione reductase (Garg & Manchada 2009). É também a precursora das fitoquelatinas que agem como peptídeos que complexam metais pesados em plantas (Rosen 2002). Os níveis de GSH em tecidos de plantas são modificados na presença de metais (Kovideva *et al.* 1997).

A glutathione reductase (GR) age conjuntamente com a glutathione peroxidase. Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radiculares, porém é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione. A glutathione reductase pode ser encontrada nos cloroplastos, citoplasma e mitocôndria dos vegetais superiores (Azevedo *et al.* 1998). O aumento da atividade da GR facilita a tolerância das plantas ao estresse oxidativo e tem melhorado a capacidade de alterar o equilíbrio redox de importantes componentes da cadeia transportadora de elétrons (Tyystjarvi *et al.* 1999).

Essas e outras substâncias atuam em conjunto em um ciclo de defesas antioxidativas chamado de Foyer-Halliwell-Asada, conhecido também por ciclo ascorbato-glutathione (Figura 1). Nesse ciclo esquemático, um radical superóxido é eliminado pela superóxido dismutase numa reação que produz peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é consumido através da sua conversão em oxigênio e água pela catalase ou somente em água através da oxidação do ascorbato. O ascorbato é regenerado por meio de dois mecanismos: através da redução enzimática do monodeidroascorbato, que ocorre nos plastídios, ou

alternativamente, o monodeidroascorbato, que é dismutado espontaneamente em deidroascorbato, pode reagir com a glutatona (GHS), produzindo ascorbato e glutatona oxidada (GSSH), numa reação catalisada pela deidroascorbato redutase. A GSSH é reduzida pela glutatona redutase, utilizando o consumo de NADPH. O oxigênio singlete e os íons hidroxila são eliminados no ciclo da glutatona. Os danos provocados pelo oxigênio singlete e íons hidroxila podem ser também minimizados por antioxidantes não enzimáticos, entre os quais a vitamina E e carotenóides (Bray *et al.* 2000).

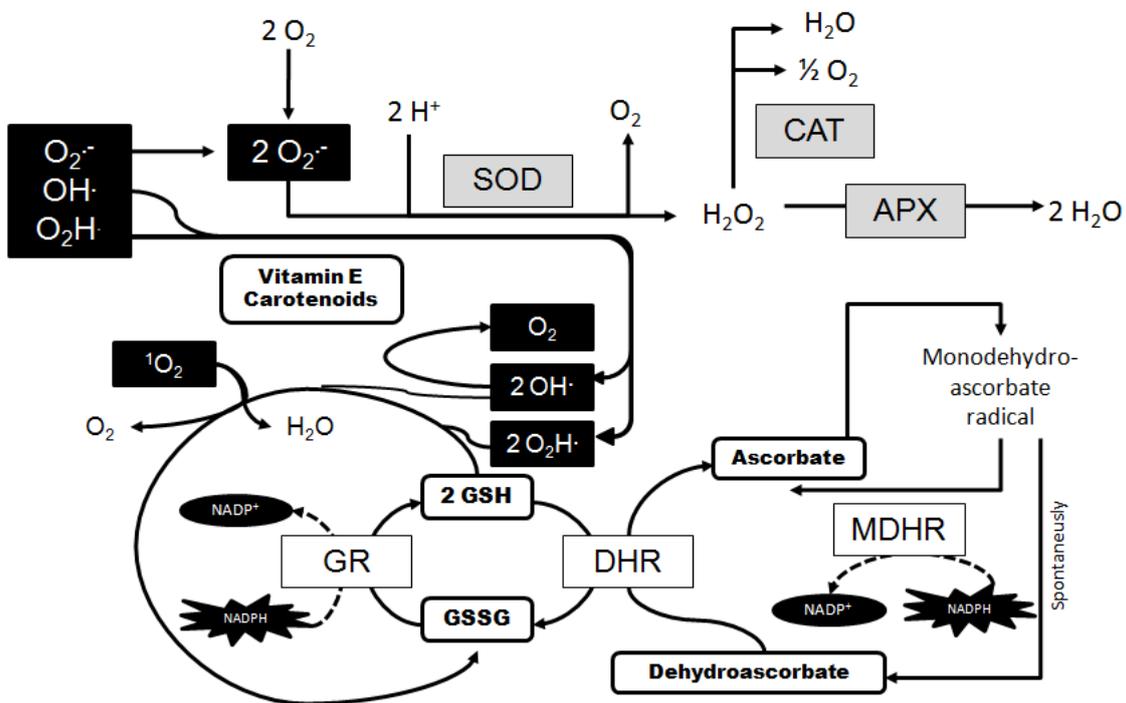


Figura 1: Esquema do ciclo ascorbato-glutationa nos cloroplastos (adaptado de Halliwell 2009).

Esse ciclo, na ausência de espécies reativas de oxigênio em excesso, mantém o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante nas células. Porém, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos mencionados fatores ambientais de estresse oxidativo, pode levar à alteração desse equilíbrio, momento em que os danos oxidativos podem acontecer (Muggli 1993, Bray *et al.* 2000). Porém, plantas que possuem conteúdos altos e/ou alta capacidade de oxi-redução, mantendo maiores proporções de ácido ascórbico e glutatona em suas formas

reduzidas do que oxidadas, são mais tolerantes ao estresse oxidativo imposto pela poluição atmosférica, entre outros fatores de estresse ambientais (Guzy & Heath 1993, Gadallah 2000, Iqbal *et al.* 1996).

*Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., espécie arbórea nativa do sudeste brasileiro, pertencente à família Melastomataceae, considerada pioneira da floresta Atlântica, tem se mostrado tolerante ao estresse oxidativo imposto por poluentes atmosféricos, nos níveis observados na região de Cubatão, contribuindo significativamente para a caracterização fisionômica e estrutural da floresta na região (Leitão Filho 1993). A espécie tem sido intensamente utilizada como árvore ornamental na cidade de São Paulo, onde o ozônio troposférico é um grande problema ambiental (Furlan *et al.* 2008).

Sua tolerância aos poluentes pode resultar de um conjunto de características de defesa, de natureza fisiológica, metabólica e estrutural, conforme foi mostrado por estudos de campo realizados na região de Cubatão. Vários deles mostraram que *T. pulchra* possui alta capacidade de acumular elementos tóxicos, raramente apresentando sintomas visíveis e injúrias. Esta espécie mostrou ser acumuladora de metais, enxofre e flúor (Klumpp *et al.* 1998, 2000, 2002, Furlan *et al.* 1999, 2004, 2007, Moraes *et al.* 2002, 2003, Domingos *et al.* 2003, Szabo *et al.* 2003). Sob o ponto de vista fisiológico, Moraes *et al.* (2003), ao estudarem respostas de *T. pulchra* à exposição aguda com altos níveis de ozônio, observou uma redução da taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração e fluorescência da clorofila *a* medida através da eficiência fotoquímica do Fotossistema II. Furlan *et al.* (2008) observaram o surgimento de injúrias em folhas de *T. pulchra*, apenas quando expostas a uma dose acumulada de ozônio (AOT40) de 6038 ppb.h, após 25 dias do início do experimento em câmaras de topo aberto. Tais sintomas geralmente surgiram em numa tonalidade escura, avermelhada, somente na superfície superior da folha, não ocorrendo em veias ou nervuras e não se caracterizando como necroses, como ocorre em

plantas sensíveis. Ainda, em um estudo realizado por Moraes *et al.* (2000), houve constatação de que a concentração foliar de ácido ascórbico foi reduzida nas plantas de *T. pulchra* que permaneceram expostas no Vale do Rio Mogi, local onde são canalizados os ventos que carregam poluentes de indústrias de fertilizantes, cimentos e siderurgia, causando severos danos à vegetação. Klumpp *et al.* (2000), também realizando experimentos com *T. pulchra* empregando as técnicas de biomonitoramento ativo, demonstraram aumento da atividade da peroxidase nas áreas com maior índice de poluição. Com base nesses resultados, é possível supor que *T. pulchra* possui capacidade de oxi-redução eficiente, que, no entanto, ainda precisa ser caracterizado. Sendo assim, essa espécie foi adotada como espécie bioindicadora modelo para monitorar riscos associados a uma nova situação de contaminação atmosférica por poluentes com potencial oxidativo no entorno da refinaria de petróleo instalada no complexo industrial de Cubatão.

A Refinaria Presidente Bernardes (RPBC), pertencente à Petrobrás, iniciou suas atividades naquela região em 1950 e emite atualmente quantidades ainda significativas de monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>), óxidos de enxofre (SO<sub>x</sub>) e material particulado (MP), devido aos processos do refino do petróleo propriamente dito e ao processo de produção de energia e vapor, viabilizado desde o início pela queima de óleo combustível em caldeiras. A área da refinaria também tem sido atingida por deslizamentos de terras e fluxos de detritos, em decorrência da fragilidade da floresta Atlântica que recobre as encostas da Serra do Mar na região (Kanji *et al.* 2008), aumentando os riscos de ocorrência de danos às instalações industriais e de acidentes. Para diminuir os problemas ambientais decorrentes dessa alta emissão, a Petrobrás trocou tal sistema de caldeiras para geração de energia e vapor por uma termoelétrica movida a gás natural, com início de operação em 2010. Entre os benefícios esperados dessa mudança, inclui-se a

redução dos níveis de compostos gasosos de enxofre e de nitrogênio e de material particulado no ar (Petrobras 2009).

No entorno da RPBC, os estudos de campo com plantas bioindicadoras, realizados na década de 1990, de fato revelaram que as porções da Floresta Atlântica estavam particularmente sob forte estresse causado por  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_x$  e material particulado contendo componentes tóxicos, como metais pesados. Outros resultados, especialmente injúrias visíveis e alterações bioquímicas indicadoras de estresse oxidativo, mostraram que poluentes secundários, como o ozônio e PAN, também estavam em concentrações fitotóxicas naquela época, especialmente nas encostas de montanhas próximas à RBPC, em altitudes ao redor de 400 m. Dessa forma, a mudança do sistema atual de caldeiras da RBPC para o sistema de co-geração de energia a vapor será supostamente benéfica à Floresta Atlântica na região.

Diante do conhecimento descrito anteriormente, levantaram-se as seguintes hipóteses no presente projeto: 1) haverá diminuição de riscos oxidativos impostos por compostos gasosos de enxofre e de nitrogênio e de material particulado à floresta atlântica após o início de operação da termoelétrica, pelo menos na área de influência da RBPC; 2) tal ganho em qualidade ambiental poderá ser dimensionado por meio de biomonitoramento ativo, com *T. pulchra*, analisando-se indicadores de sua capacidade de oxi-redução.

Na presente Tese de Doutorado, geraram-se informações que contribuirão para testar as hipóteses e sanar as dúvidas colocadas. Para tanto, foi realizado um biomonitoramento ativo, com plantas jovens de *T. pulchra*, com início antes e término após o início da operação do novo sistema de co-geração de energia e vapor. Periodicamente, foram analisados indicadores de capacidade de oxi-redução e de danos em membranas, nessas plantas, já que os poluentes emitidos por refinarias de petróleo geralmente causam danos oxidativos às mesmas, conforme descrito anteriormente. Além disso, já que os seres vivos reagem continuamente e de maneira integrada à presença de poluentes no ar e a outros

fatores ambientais, tais como temperatura, umidade relativa do ar e radiação, é esperado que as relações entre níveis de concentração de poluentes no ar e intensidade de respostas vegetais dificilmente serão lineares. Dessa forma, torna-se difícil realizar uma avaliação precisa de riscos associados à contaminação do ar somente com base nas reações de plantas bioindicadoras expostas no ambiente a ser monitorado. Esse problema pode ser contornado complementando-se os estudos de campo com experimentos em câmaras de topo aberto, onde um grupo de plantas é mantido em uma câmara recebendo ar ambiente e outro grupo em outra câmara recebendo ar ambiente limpo obtido a partir de filtração. Assim, na presente Tese, plantas jovens de *T. pulchra* também foram expostas ao ar filtrado e não filtrado, em um sistema de câmaras de topo aberto, instalado na área de influência da RBPC.

Tendo em vista as hipóteses acima descritas, os objetivos gerais do estudo realizado foram: 1) Determinar a capacidade de oxi-redução de plantas jovens de *T. pulchra*, quando submetidas a um gradiente de condições ambientais, no entorno da RPBC, na condição atual de contaminação atmosférica e após o início de operação da nova termoeletrica, momento em que se espera uma redução dessa contaminação; 2) Verificar se o possível ganho na qualidade ambiental na região, com conseqüente diminuição de riscos à Floresta Atlântica, poderá ser dimensionado por mudanças na capacidade de oxi-redução em plantas de *T. pulchra*.

As justificativas, objetivos, descrição de métodos empregados, apresentação e discussão dos resultados obtidos e conclusões das etapas experimentais realizadas em condições de campo e em câmaras de topo aberto serão descritos respectivamente nos **Capítulos II e III**. Ao final, será apresentada uma **Discussão Geral** dos resultados obtidos, visando a verificar se as hipóteses acima foram comprovadas ou não.

## Referências Bibliográficas

- Ab'Saber, A.N.** 1987. A Serra do Mar na região de Cubatão: Avalanches de janeiro de 1985. A ruptura do equilíbrio ecológico na Serra de Paranapiacaba e a poluição industrial. In: Anais do Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira - Síntese de Conhecimentos. Publicação 54, Academia de Ciências do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 74-116.
- Alonso, C.D. & Godinho, R.** 1992. A evolução da qualidade do ar em Cubatão. *Química Nova* 15: 126-136.
- Arndt, U. & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Biological monitoring. Signals from the environment. Ellenberg et al. (eds.). Vieweg, Eschborn, pp. 199 – 298.
- Alscher, R.G. & Hess, J.L.** 1993. Antioxidants in higher plants. Boca Raton: CRC Press.
- Arrigoni O. & De Tullio, M.C.** 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology* 157: 481-488.
- Arrigoni O. & De Tullio, M.C.** 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* 1569: 1 – 9.
- Azevedo, R.A.; Alas, R.M.; Smith, R.J.; Lea, P.J.** 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104 (2): 280-292.
- Baird, C.** 2002. *Química Ambiental*. 2<sup>a</sup> ed. Bookman. pp. 1 – 622.
- Barth C.; Moeder, W.; Klessig, D.F. & Conklin, P.L.** 2004. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1. *Plant Physiology* 134: 1784 – 1792.
- Barth, C.; De Tullio, M. & Conklin, P.L.** 2006. The role of acid ascorbic in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* 57 (8): 1657 – 1665.

- Bhadury, A.M. & Fulekar, M.H.** 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio Technology*, 11 (1): 55 – 69.
- Bray, E.A.; Baylei-Serres, J. & Werentilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. 2000 eds). American Society of Plant Physiologists. USA, New York, pp. 1158 – 1203.
- 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.
- Cançado, J.E.D., Braga, A.L.F., Pereira, L.A.A., Arbex, M.A., Saldiva, P.H.N., Santos, U.P.** 2006. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 32: 5 – 11.
- Caregnato, F.F., Koller, C.E., MacFarlane, G.R., Moreira, J.C.F.** 2008. The glutathione antioxidant system as a biomarker suite for the assessment of heavy metal exposure and effect in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin* 56: 1119 – 1127.
- CETESB.** 2008. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2007. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. P.284.
- CETESB.** 2011. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2010. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. P.309.
- Chen, Z. & Gallie, D.R.** 2005. Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development and function. *Plant Physiology* 142 (2): 775 – 787.
- Conklin, P.L. & Barth, C.** 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment* 27: 959 – 971.
- 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: *Proceedings of Eurobionet 2002 – Urban air pollution, bioindication and environmental awareness*. A. Klumpp, W. Ansel, G. Klumpp (eds). pp. 337 – 373.
- De Tullio, M.C.; Paciolla, C.; Dalla Vecchia, F.; Rascio, N.; D’Emerico, S.; De Gara, L.; Liso, R. & Arrigoni, O.** 1999. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209: 424 – 434.

- Didyk, N.P. & Blum, O.B.** 2011. Natural antioxidants of plant origin against ozone damage of sensitive crops. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33 (1): 25 – 34.
- Domingos, M.; Klumpp, A. & Klumpp, G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230 – 236.
- Domingos, M.; Bourotte, C.; Klumpp, A.; Klumpp, G. & Forti, M. C.** 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo (Bicudo DC, Forti MC & Bicudo CEM, orgs.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo, pp. 221 – 249.
- Domingos, M., Klumpp, A., Rinaldi, M.C.S., Modesto, L., Klumpp, G., Delitti, W.B.C.** 2003. Combined effects of air and soil pollution by fluoride emissions on *Tibouchina pulchra* Cogn. at Cubatão, SE Brazil, and their relations with aluminum. *Plant and Soil* 249, 297 – 308.
- Elstner, E.F.** 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Pell E.J.; Steffen K.L., eds. *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 13 – 25.
- Farooq, M, Basra, S.M.A., Wahid, A., Cheema, Z.A., Khaliq, A.** 2008. Physiological role of exogenously applied glycinebetaine in improving drought tolerance of fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agron. Crop. Sci.* 194: 325 – 333.
- Freedman, B.** 1995. *Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses*. 2nd ed. Academic Press Inc., San Diego.
- Fridovich, I.** 1986. Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 58: 61 – 97.
- Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCourt, P., McPeck, M.A., Thomas, L., McClung, C.R.** 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 112 (1): 327 – 336.
- Furlan, C.M., Salatino, A. & Domingos, M.** 1999. Leaf contents of nitrogen and phenolic compounds and their bearing on the herbivore damage to *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae), under the influence of air pollutants from industries of Cubatão, São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 22: 317–23.
- Furlan, C.M., Salatino, A., Domingos, M.** 2004. Influence of air pollution on leaf chemistry, herbivore feeding and gall frequency on *Tibouchina pulchra* leaves in Cubatão (Brazil). *Biochemical Systematics and Ecology* 32, 253 – 263.

- Furlan, CM, Domingos, M. & Salatino, A.** 2007. Effects of initial climatic conditions on growth and accumulation of fluoride and nitrogen in leaves of two tropical tree species exposed to industrial air pollution. *The Science of the Total Environment* 374: 399-407.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Sanz, M.J., Domingos, M., Salatino, A.** 2008. *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., a native Atlantic Forest species, as a bio-indicator of ozone: visible injury. 2008. *Environmental Pollution* 152, 361 – 365.
- Gadallah, F. M.** 2000. Seed density in relation to germination and seedling quality in cotton *Gossypium barbadense* L. *Alexandria Journal of Agricultural Research (Egypt)* v. 45(2) p. 119-137.
- Garg, N. & Machanda, G.** 2009. ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems*, vol. 143, n<sup>o</sup> 1, March, pp. 81 – 96.
- Gutberlet, J.** 1996. *Cubatão: desenvolvimento, exclusão social e degradação*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, FAPESP.
- Guzy, M.R. & Heath, R.L.** 1993. Responses to ozone of varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytologist* 124, 617 – 625.
- Halliwell, B.** 2009. The wandering of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine* 46 p. 531 – 542.
- Hernandez-Jiménez, M.J., Lucas. M.M., de Felipe, M.R.** 2002. Antioxidant defense and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 645 – 657.
- Iqbal, M.; Abdin, M.Z.; Mahmooduzzafar, M.Y. & Agrawal, M.** 1996. Resistance mechanisms in plant against air pollution. In: *Plant Response to Air Pollution* (M. Yunnus e M. Iqbal eds). John Wiley and Sons, Chischester, p. 195 – 240.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Jaburi, H.J., Somasundaram, R., Panneerselvam, R.** 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 100 – 105.

- Jasinski, R., Pereira, L.A.A., Braga, A.L.F.** 2011. Air pollution and pediatric hospital admissions due to respiratory diseases in Cubatão, São Paulo State, Brazil, from 1997 to 2004. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 27(11): 2242 – 2252.
- Kanji, M.A., Cruz, P.T., Massad, F.** 2008. Debris flow affecting the Cubatão Oil Refinery, Brazil. *Landslides* 5, 71 – 82.
- Kanofsky, J.R. & Sima, P.D.** 2005. Assay for singlet oxygen generation by plant leaves exposed to ozone. *Methods Enzymol.* 319: 512 – 520.
- Klumpp A.; Klumpp G. & Domingos, M.** 1994. Plant as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85: 109 – 116.
- Klumpp, A., Klumpp, G. & Domingos, M.** 1996a. Bio-indication of air pollution in the tropics. The active monitoring programme near Cubatão, Brazil. *Gefahrstoffe Reinhaltung Der Luft* 56: 27-31.
- Klumpp, A., Klumpp, G., Domingos, M. & Silva, M.D.** 1996b. Fluoride impact on native tree species of the Atlantic Forest near Cubatão. *Water, Air, and Soil Pollution* 87: 57-71.
- Klumpp, A., Domingos, M., Moraes, R. M., Klumpp, G.** 1998. Effects of complex air pollution on tree species of the Atlantic rain forest near Cubatão, Brazil. *Chemosphere* 36, 989 – 994.
- Klumpp, G., Furlan, C. M., Domingos, M., Klumpp, A.** 2000. Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Science of Total Environment* 246, 79 – 91.
- Klumpp, A., Klumpp, G. & Domingos, M.** 2002. Foliar nutrient content in tree species of the Atlantic Rain Forest as influenced by air pollution from the industrial complex of Cubatão. *Water, Air and Soil Pollution* 133: 315-333.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. & Fomin, A.** 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (Eurobionet). *Revista Brasileira Botânica* 24 (4): 511 – 518.

- Kovideva, J., Roy, S., Vranjic, J.A., Haukioja, E., Hughes, P.R., Hanminen, O.** 1997. Antioxidants responses to stimulated acid rain and heavy metal deposition in birch seedlings. *Environmental Pollution* (95): 249 – 258.
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Rima, São Carlos.
- Leitão Filho, H.F.** 1993. *Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão (SP)*. EDUNESP/EDUNICAMP, São Paulo, p. 184.
- Leonardis, S.D., Dipierro, N., Dipierro, S.** 2000. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 773 – 779.
- Manning, W.J. & Feder, W.A.** 1980. *Biomonitoring air pollutants with plants*. Applied Science Publishers Ltda. London. 14pp.
- Mayer, H.** 1999. Air pollution in cities. *Atmospheric Environment*. 33: 4029 – 4037.
- Mehlhorn, H.; Tabner, B.J. & Wellburn, A.R.** 1990. Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plantas exposed to ozone. *Physiology Plantarum* 79: 377 – 383.
- Meister, A.** 1988. Glutathione Metabolism and its selective modification. *The Journal of Biogiccahemistry*. 263(33): 17205 – 17208.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405 – 410.
- Moraes, R.M., Delitti, W.B.C., de Moraes, J.A.P.V.** 2000a. Respostas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. à poluição aérea de Cubatão, SP: fotossíntese líquida, crescimento e química foliar. *Revista Brasileira de Botânica* 23, 441 – 447.
- Moraes, R. M., Delliti, B.C., de Moraes, J.A.V.P.** 2000b. Fotossíntese líquida e crescimento de *Tibouchina pulchra* Cogn. nas proximidades de indústrias petroquímicas em Cubatão, SP. *Hoehnea* 27 (1), 77 – 85, 4 tab.
- Moraes, R. M., Klumpp, A., Furlan, C. M., Klumpp, G., Domingos, M., Rinaldi, M. C. S., Modesto, I.** 2002. Tropical fruits trees as bioindicators os industrial air pollution in southeast Brazil. *Environment International* 28, 367 – 374.

- Moraes, R. M., Delitti, W.B.C., Moraes, J.A.P.V.** 2003. Gas exchange, growth and chemical parameters in a native Atlantic Forest tree species in polluted areas of Cubatão, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 339 – 345.
- Morrow, P.E.** 2003. Toxicological data on NO<sub>x</sub>: an overview. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 13, 205 – 230.
- Moura, M., Junger, W.L., Mendonça, G.A.S., De Leon, A.P.** 2008. Qualidade do ar e transtornos respiratórios em crianças. *Revista de Saúde Pública*, 42, n.3, 503 – 511.
- Muggli, R.** 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: *Free radicals and antioxidants in nutrition* (F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi and C. Rice-Evans eds.). Richelieu Press, London, p. 189 – 250.
- Nebel, B.J. & Wright, R. T.** 2000. *Environmental Science: The way the world works*. 7<sup>th</sup> ed. Prentice Hall. pp. 1 – 664.
- Pastori, G.M.; Kiddle, G.; Antoniw, J.; Bernard, S.; Veljovic-Jovanovic, S.; Verrier, P.J.; Noctor, G. & Foyer, C.H.** 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defence transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell* 15: 939 – 951.
- Pavet, V.; Olmos, E.; Kiddle, G.; Mowla, S.; Kummar, S.; Antoniv, J.; Alvarez, M.E. & Foyer, C.H.** 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 1291 – 1303.
- Petrobrás – Petróleo Brasileiro 2009.** Plano de Monitoramento de Emissões Atmosféricas, Cubatão, 34p.
- Perry, C.T., Jr, A.M.D., Rodriguez, M.T.R., Atz, V.L.** 2010. *Psidium guajava* as a bioaccumulator of nickel around na oil refinery, southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 647 - 654.
- Pompéia, S.L.** 1997. Sucessão secundária da Mata Atlântica em áreas afetadas pela poluição atmosférica Cubatão, SP. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Puckette, M.C.; Weng, H. & Mahalingam, R.** 2007. Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 70 – 79.

- Raven, P. H.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. E.** 2007. *Biologia Vegetal*. 7th ed. Guanabara Koogan. pp. 1 – 906.
- Rosen, B.P.** 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529(1): 86 – 92.
- Samet, J. & Krewski, D.** 2007. Health effects associated with exposure to ambient air pollution. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part A*, 70: 227 – 242.
- São Paulo (Estado) Secretaria do Meio Ambiente, Instituto de Botânica, Instituto Florestal, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.** 1990. A Serra do Mar: degradação e recuperação. M.C. Marino (coord.). São Paulo, 56 p. (Série Documentos).
- Scandalios, J.G.** 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7 – 12.
- Schraudner, M.; Moeder, W.; Wiese, C.; Van Camp, W.; Inzé, D.; Langebartels, C. & Sandermann, H.J.** 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The plant journal* 2: 235 – 245.
- Smirnoff, N.** 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661 – 669.
- Smirnoff, N. & Wheeler, G.L.** 2000. AA in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 19: 267 – 290.
- Shugart, L.R.** 1994. Biological Monitoring. In: *Contaminants in the environment. A multidisciplinary assessment of risks to man and other organisms* (A. Renzoni, N. Mattei, L. Lari & M.C. Fossi, eds.). Lewis Publishers, New York, p. 29 – 36.
- Sreenivasulu N., Sopory, S.K.** 2007. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene* 388: 1 – 13.
- Szabo, A.V., Domingos, M., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C.** 2003. Acúmulo foliar de enxofre e suas relações com alterações no crescimento de plantas jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) expostas nas proximidades do pólo industrial de Cubatão, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 26, 379 – 390.

- Taylor, N. L., Day, D.A., Millar, A.H.** 2002. Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 277 (42): 663 – 668.
- Troppmair, H. & Ferreira, M.E.M.C.** 1987. Cobertura vegetal, poluição aérea e deslizamentos na Serra do Mar. *Geografia* 12: 117-129.
- Turcsanyi E., Lyons, T., Plochl, M., Barnes, J.** 2000. Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defense against ozone? Test the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Experimental Botany*, 51, 901 – 910.
- Tyystjarvi, E. Riikonen, M., Arisi, A.C.M., Kettunen, R., Joensuu, L., Foyer, C.H.** 1999. Photoinhibition of photosystem II in tobacco plants overexpressing glutathione reductase and poplars overexpressing superoxide dismutase. *Physiol. Plant.* (105): 409 – 416.
- VanLoon, G.W. & Duffy, S.J.** 2005. *Environmental Chemistry: A global perspective*. 2ed. Oxford University Press, New York, 515p.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M. Langebartels, C.** 1997. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO J.*, 16: 4806 – 4816.

**CAPÍTULO II**

**ESTADO REDOX DE *TIBOUCHINA PULCHRA* (CHAM). COGN. EXPOSTA  
NO ENTORNO DE UMA REFINARIA DE PETRÓLEO NA REGIÃO DE  
CUBATÃO**

## Resumo

É sabido que refinarias de petróleo são fontes relevantes de emissões atmosféricas, principalmente óxidos de enxofre (SO<sub>x</sub>), óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>), monóxido de carbono (CO) e hidrocarbonetos (HC). Elas também podem emitir partículas contendo níquel (Ni) e outros metais pesados em consequência de seus processos de produção. O impacto da multiplicidade de poluentes atmosféricos emitidos pelas refinarias pode ser avaliado por meio de respostas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas de plantas bioindicadoras, como a *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. A Refinaria Presidente Bernardes, situada no complexo industrial de Cubatão, trocou o sistema de caldeiras para geração de energia e vapor por uma termoeletrica (UTE) movida a gás natural, aproximadamente em maio de 2010, visando a uma redução dos níveis de compostos gasosos de enxofre e nitrogênio material particulado e possivelmente ozônio no ar, todos com alto poder oxidativo. Desta forma, o presente estudo foi proposto com o intuito de verificar se haveria um ganho na qualidade ambiental e, particularmente no poder oxidativo atmosférico na região após o início de funcionamento da termoeletrica, por meio de biomonitoramento de *T. pulchra*, analisando-se indicadores de vitalidade de suas plantas, entre os quais sua capacidade de oxi-redução. Os experimentos em campo, em seu conjunto, abrangeram cerca de 40 meses e ao longo desse tempo foram realizadas onze exposições de *T. pulchra*, com duração de 90 dias cada, em três locais no entorno da refinaria e em um local de referência. Esse cronograma de execução das exposições nos locais de estudo coincidiu com o cronograma de mudança do sistema de geração de energia e vapor para a refinaria de petróleo, que foi subdividido em três fases: Pré-UTE, Transição e Pós-UTE. Periodicamente, analisaram-se: concentração de ácido ascórbico e glutatona em suas formas reduzidas, totais, oxidadas e razão reduzido/total; atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona redutase, ascorbato peroxidase; acúmulo de malondialdeído, indicador da peroxidação lipídica. Houve a tendência geral de intensificação do poder oxidativo da atmosfera a partir do início da Fase de Transição, que se manteve mesmo após do desligamento integral das caldeiras movidas a óleo combustível. Com isso, observou-se que a variação dos níveis de antioxidantes ao longo das fases do cronograma da UTE ocorreram em resposta ao aumento da concentração de poluentes atmosféricos com poder oxidativo (O<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub>). As variações climáticas da região afetaram e se correlacionaram com a atividade antioxidativa de *T. pulchra*, interferindo também na formação de poluentes atmosféricos. Os antioxidantes não enzimáticos – ácido ascórbico e glutatona – bem como a enzima ascorbato peroxidase foram essenciais para demonstrar o estado redox de *T. pulchra*.

## Abstract

It is well known that oil refineries are relevant sources of atmospheric emissions, particularly sulfur oxides (SO<sub>x</sub>), nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>), carbon monoxide (CO) and hydrocarbons (HC). They also emit particles containing nickel (Ni) and other heavy metals as a result of their production processes. The impact of the multiplicity of air pollutants emitted by refineries can be evaluated by means of biochemical, physiological and morphological responses of bioindicator plants, such as *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. The Oil Refinery Presidente Bernardes, located in the Industrial Complex of Cubatão, changed its crude oil-powered boilers for steam and power generation by a natural gas-powered thermoelectric (UTE), approximately in May 2010, aiming at reducing the emission levels of gaseous sulphur and nitrogen compounds and particulate matter in the air. Thus, the present study has been proposed in order to verify if a gain on the regional environmental quality and particularly of the atmospheric oxidative power after the start of the thermoelectric will be achieved, by biomonitoring procedures using young plants of *T. pulchra*, and analyzing its redox state. The experiments in the field, as a whole, covered about 40 months. Throughout this period, eleven exposure experiments with potted saplings of *T. pulchra* were performed, which lasted 90 days each, in three sites surrounding the refinery and in one reference site. This schedule of field experiments coincided with the schedule of change of the power generation system, which was subdivided into three phases: Pre-UTE, Transition and Post-UTE. The concentration of ascorbic acid and glutathione, in their reduced, oxidized and total forms; activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, ascorbate peroxidase; leaf accumulation of MDA, an indicator of lipid peroxidation were periodically measured. A general trend of increased oxidative power of the atmosphere from the beginning of the transition phase on was observed, which remained even after the complete shutdown of the boilers. This tendency was followed by varying levels of antioxidants in the plants maintained in the study sites during all the three phases of exchange of the energy production system. These responses were associated with increased concentration of pollutants with oxidative power (O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> and PM<sub>10</sub>). The climatic variations, besides interfering in the formation of atmospheric pollutants, also affected and correlated with the antioxidative activity of *T. pulchra*. The non-enzymatic antioxidant - glutathione and ascorbic acid - as well as the activity of ascorbate peroxidase were essential to demonstrate the redox state of *T. pulchra*.

## Introdução

O município de Cubatão está localizado na Baixada Santista, aproximadamente a 16 km de distância da cidade de Santos, na base da Serra do Mar, estado de São Paulo, na região Sudeste do Brasil ( $23^{\circ}45' - 23^{\circ}55'S$ ;  $46^{\circ}15' - 46^{\circ}30'W$ ). Devido a sua proximidade com o Porto de Santos, que facilita o escoamento de produtos, houve grande desenvolvimento de um polo industrial em Cubatão, composto predominantemente por empresas do setor petroquímico, siderúrgico e de fertilizantes. Na década de 80, Cubatão ficou conhecida como uma área afetada por sérios problemas de poluição atmosférica, em função das altas emissões de poluentes industriais, da sua topografia acidentada e das condições meteorológicas desfavoráveis à dispersão de poluentes (CETESB 2011).

É sabido que refinarias de óleo são fontes relevantes de emissões atmosféricas, principalmente o enxofre (S), óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>), monóxido de carbono (CO) e hidrocarbonetos (HC). Elas também podem emitir partículas contendo níquel (Ni) e outros metais pesados em consequência de seus processos de produção (Perry *et al.* 2010).

Reações entre os constituintes celulares de plantas que crescem em ambientes poluídos e gases poluentes ocorrem inicialmente no espaço extracelular da folha, pela captação do poluente através dos estômatos, dando origem às espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) (Booker *et al.* 2012). Nessa situação, ocorre o estresse oxidativo, um termo que denota um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e o respectivo sistema antioxidante de um organismo (Abuja & Albertini, 2001). Porém cabe ressaltar que a formação destas EROs é um fenômeno natural, resultante do metabolismo do oxigênio, durante os processos de fotossíntese e respiração. A ocorrência de vida no ambiente aéreo, só foi possível devido à evolução de um sistema de defesas antioxidativas, que envolve reações de oxi-redução. Assim, na ausência de fatores de

estresse oxidativo, há um balanço nas células vegetais entre a produção de EROs e o sistema antioxidante, formado por diversos compostos, entre os quais ácido ascórbico, a glutatona e as enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase e catalase. Estes, em conjunto, neutralizam substâncias oxidativas e impedem danos celulares (Burkey *et al.* 2006). A produção endógena de superóxidos e peróxidos de hidrogênio pode também iniciar a peroxidação lipídica em membranas biológicas expostas a fatores de estresse, sendo esta uma indicadora de dano oxidativo ainda em nível celular. Os radicais de ácidos graxos formados dessa maneira podem reagir espontaneamente com o oxigênio formando peroxiradical de ácido graxo e este pode propagar a peroxidação de tais moléculas de ácidos graxos pela retirada de átomos de hidrogênio para formar hidroperóxidos e novos radicais de ácidos graxos, em uma cadeia de reações, levando a oxidação de muitas moléculas de ácidos graxos. Como resultado da peroxidação de ácidos graxos, ocorre a produção de malondialdeído (MDA) em tecidos submetidos à peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados dentro das membranas fosfolipídicas (Song *et al.* 2012). Conseqüentemente, estas reações em cadeia acabam por atingir os diferentes níveis da organização biológica, podendo levar, em casos de exposição a altas doses de poluentes, à morte expressiva de indivíduos, populações e, até, de comunidades vegetais inteiras.

Essa cadeia de eventos multiplicadores ocorreu nitidamente a partir de 1984, no entorno do polo industrial de Cubatão, quando se passou a perceber danos visíveis à Floresta Atlântica, com morte de muitas árvores e conseqüentes deslizamentos de terra, acarretados pelo solo desnudo e pelas chuvas abundantes que ocorrem na região. A partir de 1988, finalmente, as autoridades governamentais constituídas na época passaram a voltar atenção para a área, propondo a realização de estudos que visassem ao entendimento dos fenômenos que atingiam a região, bem como à proposição de medidas para a recuperação daquela exuberante vegetação (Mazzoni-Viveiros & Trufem 2004).

O impacto da multiplicidade de poluentes atmosféricos emitidos por um complexo industrial como o instalado em Cubatão pode ser avaliado por meio de respostas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas de plantas bioindicadoras (Divan *et al.* 2007). Assim sendo, diferentes plantas indicadoras sensíveis e acumuladoras foram expostas na região de Cubatão, em diferentes locais da Serra do Mar, cujas encostas são recobertas pela Floresta Atlântica de Cubatão, para avaliação de tal impacto por pesquisadores do Instituto de Botânica (São Paulo) e das Universidades de Essen e Kassel (Alemanha) (Klumpp *et al.* 1994, Domingos *et al.* 1998).

Dentre os vários estudos realizados no âmbito desse programa de biomonitoramento, constatou-se que, dentre as plantas aparentemente tolerantes aos poluentes da região, encontravam-se principalmente espécies de Melastomataceae, bem representativas naquela floresta, tendo como espécie dominante a *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. Essa espécie, conhecida pelo nome vulgar de manacá-da-serra, tem as vantagens de ser nativa da Serra do Mar, e encontrada tanto nas áreas mais protegidas da ação de poluentes como em áreas sob grandes impactos, sendo considerada como tolerante à poluição (Klumpp *et al.* 2000a, b, Pompéia 2000).

Em particular, a Refinaria Presidente Bernardes (RPBC), pertencente à Petrobrás e localizada no polo industrial de Cubatão, emitia, naquela época do mencionado biomonitoramento, quantidades significativas de monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), óxidos de nitrogênio (NOx), óxidos de enxofre (SOx) e material particulado (MP) por um sistema anterior de produção de energia e vapor por queima de óleo combustível em caldeiras. Visando diminuir os problemas ambientais decorrentes dessa alta emissão de poluentes, a Petrobrás trocou o sistema de caldeiras para geração de energia e vapor por uma termoeletrica movida a gás natural, aproximadamente em maio de 2010, visando a uma redução dos níveis de compostos gasosos de enxofre e de nitrogênio e de

material particulado no ar. Dessa forma, o presente estudo foi proposto com o intuito de verificar se essa hipótese de que haveria um ganho na qualidade ambiental na região após o início de funcionamento da termoeletrica é válida. Assumiu-se, também, com base nos resultados dos estudos relatados anteriormente, que esta poderia ser testada por meio de biomonitoramento com *T. pulchra*, analisando-se indicadores de vitalidade de suas plantas, entre os quais sua capacidade de oxi-redução. Assim, objetivou-se determinar a capacidade de oxi-redução de plantas jovens de *T. pulchra*, quando submetidas a um gradiente de condições ambientais no entorno da RPBC, na condição anterior de contaminação atmosférica e na condição posterior ao início de operação da nova termoeletrica, momento em que se esperaria uma redução dessa contaminação.

## **Materiais e Métodos**

### **a) Locais de estudo**

O presente estudo foi conduzido com plantas jovens da espécie bioindicadora, cultivadas em vasos de forma padronizada e expostas também de forma padronizada em quatro locais estratégicos da Serra do Mar, na área de influência da RPBC. Para tanto, seguiram-se estreitamente os princípios do biomonitoramento ativo.

Assim, para as exposições em campo de *T. pulchra*, foram escolhidos dois pontos situados próximos à Refinaria, localizados na antiga estrada do Caminho do Mar, que ligava as cidades de São Paulo e Santos (Figura 1). O primeiro ponto, denominado **CM1**, está situado em área próxima ao início das encostas das montanhas e está localizado em menor altitude (60m). O segundo ponto de exposição localizado no Caminho do Mar, denominado **CM5**, está situado na subida da serra, em maior altitude (450m). O Caminho do Mar é uma estrada situada próxima às indústrias petroquímicas e comprovadamente afetada por poluentes orgânicos, nitrogênio, enxofre e poluentes secundários, como o ozônio e o nitrato de peroxiacetila (Furlan *et al.* 2004).

Adicionalmente, escolheu-se um ponto localizado no centro da cidade de Cubatão, onde há monitoramento contínuo da qualidade do ar e de variáveis meteorológicas realizado pela CETESB, denominado **Centro** (Figura 1). Esse local, de acordo com a referida Agência, está sob a influência das emissões de poluentes da Refinaria e de emissões veiculares.

O último ponto está localizado no Vale do Rio Pilões, considerado um local de referência, por estar afastado das emissões do complexo industrial de Cubatão, denominado **RP** (Figura 1). O local de referência situa-se a 40m de altitude, em um trecho de floresta a sudoeste do complexo industrial, em uma estreita reentrância da Serra do Mar, perpendicular ao curso do Rio Cubatão. Esta localização o coloca relativamente ao abrigo dos ventos provenientes da área industrial (Moraes *et al.* 2000). Segundo Leitão Filho *et al.* (1993), a Floresta Atlântica no vale do Rio Pilões aparentemente não apresentava danos, na época que realizaram seu levantamento de danos. Era uma floresta secundária densa, em bom estado de conservação e em processo de substituição de espécies. Em comparação com a floresta do Caminho do Mar, a Mata Atlântica do vale do Rio Pilões apresentava maior número de espécies e maiores valores de densidade total, área basal total, diâmetro à altura do peito e altura de seus indivíduos arbóreos. No entanto, atualmente, aquela área não está livre da ação de poluentes atmosféricos emitidos por veículos que circulam na rodovia dos Imigrantes, que cruza o Vale do Pilões.

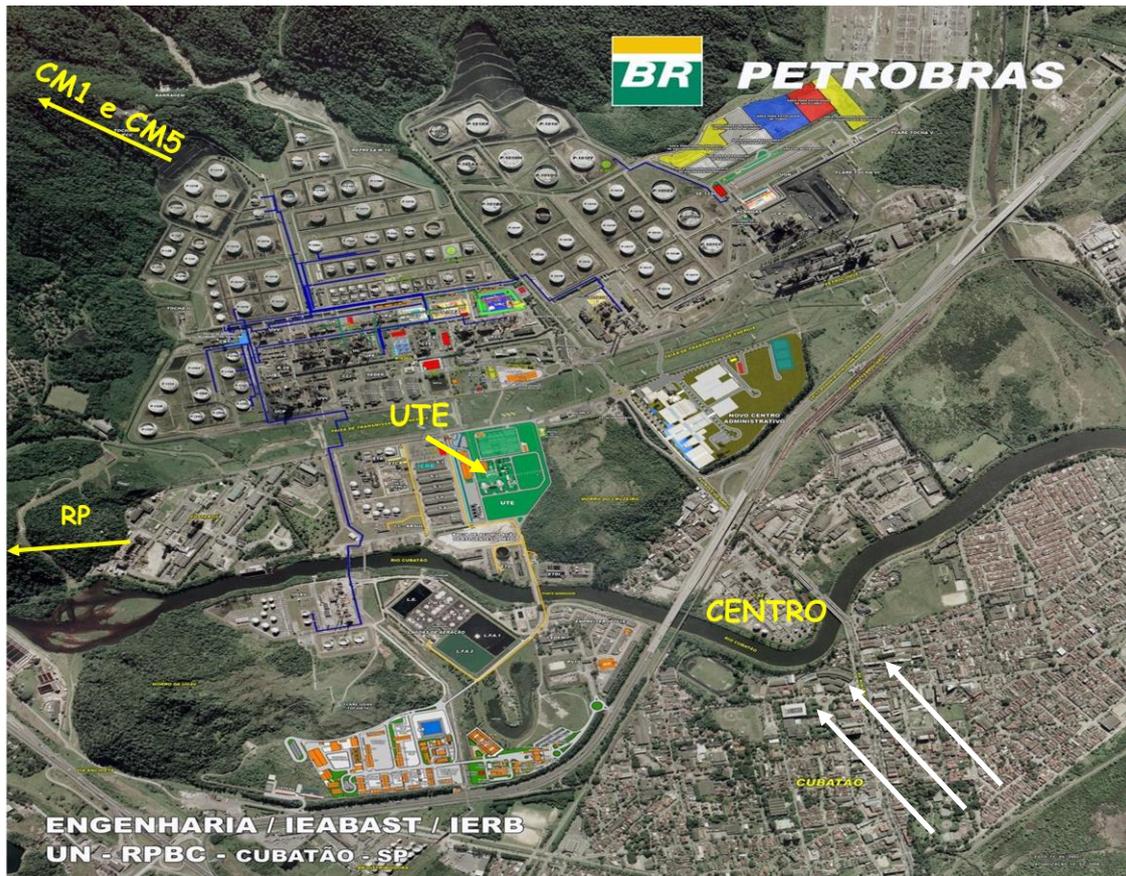


Figura 1: Localização dos pontos de exposição de plantas de *T. pulchra* no entorno da Refinaria Presidente Bernardes, com indicação do local de instalação da termoelétrica (UTE). As setas indicam a direção dos ventos durante o dia, predominantemente do centro para a serra.

### b) Obtenção de plantas jovens de *T. pulchra*

Para realização de todos os experimentos de campo, plantas jovens de *T. pulchra* foram adquiridas, por doação, no viveiro da Companhia Energética de São Paulo (CESP), localizado na cidade de Paraibuna (SP). As mudas apresentavam aproximadamente 20 cm de altura, ausência de ramificações e pelo menos seis folhas no caule principal. Elas foram transplantadas para vasos de 10 litros contendo uma mistura de substrato padronizado constituído predominantemente por casca de *Pinus* (Plantimax/Eucatex) e vermiculita, na proporção de 3:1, adubadas semanalmente com 100 mL solução de Hoagland e mantidas em

casa de vegetação sob ar filtrado e controle de temperatura, no Instituto de Botânica, em São Paulo, por aproximadamente 1 mês até sua utilização nos experimentos de campo.

### **c) Esquema de exposição das plantas nos locais de estudo**

A exposição de *T. pulchra* nos locais já propostos seguiu o modelo proposto por Arndt & Schweizer (1991). Em cada local, os vasos com as plantas foram mantidos sobre caixas contendo água, sendo apoiados por uma tela de aço galvanizado e fixados por placas de isopor. Esse conjunto foi encaixado em um suporte de ferro galvanizado, coberto por uma tela sombreadora (redução de 50% da luminosidade). Em cada suporte, foi possível colocar três caixas, cada uma contendo seis plantas (Figura 3). Barbantes adaptados na base dos vasos foram mantidos mergulhados na água armazenada nas caixas, a fim de garantir um suprimento hídrico adequado para as plantas. Ao longo do período experimental, foram realizadas visitas periódicas aos locais de exposição, para avaliação do andamento dos experimentos e reposição da água de torneira nos reservatórios.

Os experimentos em campo, em seu conjunto, abrangeram 24 meses e ao longo desse tempo foram realizadas 8 exposições de *T. pulchra*, com duração de 90 dias cada. Os períodos de realização das exposições foram:

- 1ª exposição (denominada Expo 1 em Resultados): abril a julho de 2009;
- 2ª exposição (Expo 2): julho a outubro de 2009;
- 3ª exposição (Expo 3): novembro/2009 a fevereiro/2010;
- 4ª exposição (Expo 4): fevereiro a abril/2010;
- 5ª exposição (Expo 5): maio a julho/2010;
- 6ª exposição (Expo 6): julho a outubro/2010;
- 7ª exposição (Expo 7): outubro/2010 a janeiro/2011;
- 8ª exposição (Expo 8): janeiro a março/2011.

Após o término das 8 exposições, houve continuidade dos experimentos realizados em campo com *T. pulchra*, objetivando dar continuidade às análises dos antioxidantes e de indicadores de estresse oxidativo para estender o biomonitoramento a partir do da troca completa do sistema de geração de energia para termoelétrica movida a gás natural. Essa última etapa foi viabilizada, com adaptações necessárias através de colaboração no projeto de pós-doutorado da Dra. Andrea Nunes Vaz Pedroso (“Respostas histoquímicas, estruturais, ultraestruturais e bioquímicas em indivíduos jovens e adultos de *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. expostas no entorno de uma refinaria de petróleo na região de Cubatão – SP” processo FAPESP 2011/11102-3). Essa nova etapa foi realizada em três locais (CM1, Centro e RP) e compreendeu os seguintes períodos:

- 9ª exposição (Expo 9): setembro a novembro/2011;
- 10ª exposição (Expo 10): maio a julho/2012;
- 11ª exposição (Expo 11): agosto a outubro/2012.

Esse cronograma de execução das exposições nos locais de estudo coincidiu com o cronograma de mudança do sistema de geração de energia e vapor para a RPBC.

A mudança do sistema, baseado originalmente na queima de óleo combustível em caldeiras para o sistema de cogeração (termoelétrica) movido a gás natural consistiu de três fases distintas, conforme indicado pelo gráfico abaixo (Figura 2):

1ª Fase (Pré-UTE) - abrangeu o período de abril de 2009 até maio de 2010, quando funcionavam somente duas caldeiras de alta pressão (movida com mistura equitativa de óleo combustível e gás natural; representada em azul na figura 2) e duas de média pressão (movida apenas com óleo combustível, representada em vermelho na figura). Nessa fase, portanto, prevaleceu a emissão de poluentes a partir da queima de óleo combustível. As primeiras quatro exposições foram realizadas ao longo dessa fase;

2ª Fase (Transição, indicada em vermelho): ocorrida de maio de 2010 a agosto de 2011, período em que a UTE entrou em funcionamento (representada em verde na figura), em associação com uma caldeira de média pressão e outra de alta pressão. Nessa fase, já havia o predomínio da emissão de poluentes por queima de gás natural. As exposições 5 a 8 foram realizadas ao longo dessa fase;

3ª Fase (Pós-UTE): iniciada a partir de agosto de 2011, com o total funcionamento da UTE movida a gás natural. As últimas 3 exposições foram realizadas nesse período.

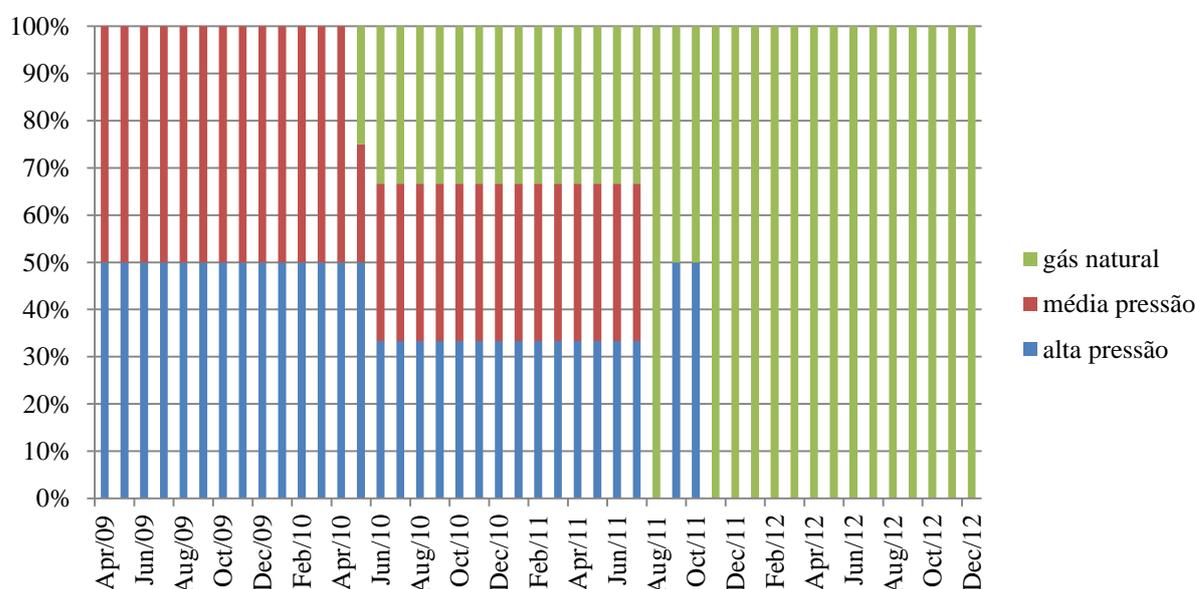


Figura 2: Modelo representativo indicando os períodos de troca do sistema de geração de energia na UTE (Esquema proposto por Ricardo Keiichi Nakazato). Expo 1: abr-jul/09; Expo 2: jul-out/09; Expo 3: nov/09-fev/10; Expo 4: fev-abr/10; Expo 5: mai-jul/10; Expo 6: jul-out/10; Expo 7: out/10-jan11; Expo 8: jan-mar/11; Expo 9: set-nov/11; Expo 10: mai-jul/12; expo 11: ago-out/12.

Cada exposição foi iniciada com 36 plantas em cada local, sendo retiradas 06 plantas por local a cada 15 dias para a realização das análises dos indicadores da capacidade de oxi-

redução e de danos oxidativos, em um total de 144 amostras analisadas em cada experimento com duração de 90 dias.

Os experimentos realizados a partir da 9ª exposição foram iniciados com 12 plantas em cada um dos três locais, sendo retiradas 06 plantas aos 45 e 90 dias para análise dos indicadores da capacidade de oxi-redução e de danos oxidativos.



Figura 3: Esquema de exposição de *T. pulchra* em campo, segundo Arndt & Schweizer (1991).

#### **d) Análise dos indicadores de capacidade de oxi-redução e de danos oxidativos**

Nas 06 plantas retiradas quinzenalmente dos locais de exposição, analisaram-se tais indicadores em amostras mistas por planta, compostas pelas folhas inseridas no 2º e 3º nós, principalmente. Estabeleceu-se que a folha mais jovem, no ápice da planta, pertencia ao 1º nó do caule principal, e as demais, com graus de desenvolvimento crescentes, ao 2º nó em diante, seguindo método adotado por Bulbovas *et al.* (2005). Por apresentarem-se pouco desenvolvidas, as folhas do 1º nó não eram coletadas. As amostras para determinação das

concentrações de ácido ascórbico foram analisadas imediatamente, devido à sua instabilidade química. As demais alíquotas foram apropriadamente armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

Após a coleta de todo material vegetal para as diferentes análises, uma das folhas que havia restado na planta foi pesada para obtenção de massa fresca, e, em seguida, foi colocada em estufa a 70°C, onde permanecia por 7 dias, para a obtenção da massa seca. A razão entre massa seca e fresca foi utilizada para expressar todos os resultados relacionados aos antioxidantes não enzimáticos (ácido ascórbico e glutatona) por grama de massa seca. Os demais antioxidantes enzimáticos (catalase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase e superóxido dismutase) foram expressos por unidade de proteína.

As amostras foliares foram analisadas quanto aos seguintes indicadores:

Concentrações de ácido ascórbico (AA) – As concentrações de ácido ascórbico na forma reduzida (AsA), oxidada (DHA) e total (AsA + DHA) foram obtidas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV, a 245 nm. A separação desses compostos foi realizada em coluna de fase reversa C18, utilizando-se como fase móvel solução aquosa acidificada com ácido ortofosfórico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH=2,3), com um fluxo de 1,00 mL/min. A extração desses compostos do material vegetal foi feita através da homogeneização de folhas frescas com ácido metafosfórico HPO<sub>3</sub> 6% contendo 0,5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e os extratos vegetais obtidos foram centrifugados a 10.000 rpm e filtrados. Para a determinação do ácido ascórbico, 1 mL do extrato foi diluído com 4 mL de água, filtrado em membrana com poro de 0,45 µm e então injetado 20 µL dessa solução no sistema cromatográfico. Quanto à análise do ácido ascórbico total (AA + DHA), adicionaram-se os dois reagentes, 0,2 mL de ditioneitol (DTT) 0,2% em Tampão de Fosfato de Sódio e 0,1 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 45% à mesma quantidade de extrato (1 mL). Estes extratos foram mantidos no escuro por 15 minutos e após esse período,

a reação foi interrompida com 0,2 mL de 2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, adicionando-se, em seguida, 3,5 mL de água. O extrato resultante foi filtrado com membrana com poro de 0,45 µm, injetando-se 20 µL deste no HPLC. O conteúdo de DHA foi calculado pela subtração entre AA total e AA reduzido determinado inicialmente. Essa metodologia foi baseada na descrita por Lopez *et al.* (2005). Com as concentrações em mãos, foram calculadas as razões AsA/AA+DHA, seguindo proposta de Burkey *et al.* (2006).

Concentrações de glutathione (GSH) – o material vegetal armazenado para a determinação de glutathione, aproximadamente 1g, foi triturado com ácido sulfosalicílico 5% e centrifugado a 20 minutos a 10.000 g. Para a obtenção das concentrações de glutathione reduzida (GSH), em uma parcela deste extrato (0,25 mL), foram acrescentados 1,75 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,1 M pH=7,0 e 0,1 mL de ácido ditionitrobenzólico (DTNB) 3 mM. Após 5 minutos de reação em ambiente claro, foi feita a leitura em espectrofotômetro UV/VIS num comprimento de onda de 412 nm. Para determinar a glutathione total (GSH + GSSG), na mistura utilizada anteriormente foram acrescentados 100 µL de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) 0,4 mM e 4 µL de glutathione redutase, para que toda a glutathione oxidada (GSSG) seja reduzida e, após 20 minutos de reação em ambiente claro, foi feita uma nova leitura espectrofotométrica em mesmo comprimento de onda. O conteúdo de GSSG foi calculado pela subtração da glutathione total e da reduzida, determinada inicialmente. Essa metodologia foi baseada em Israr *et al.* (2006), com modificações.

Atividade da superóxido dismutase (SOD) – A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada por método proposto por Reddy *et al.* (2004) com modificações. O material vegetal foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, Triton 0,05%, polivinilpolipirrolidona (PVPP) 10% e 1 mM ácido ascórbico e depois centrifugado por 10 min, a 10.000 rpm. A atividade da enzima SOD foi medida em uma mistura de reação contendo nitro blue tetrazolium (NBT), metionina, EDTA, tampão fosfato 100mM pH 7,0,

riboflavina e o extrato vegetal. Após 30 minutos de exposição à luz fluorescente (80W), a absorbância da mistura foi medida a 560 nm. Os controles de cada amostra foram protegidos da luz. A atividade da enzima foi determinada pela inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido.

Atividade da catalase (CAT) – Atividade da CAT em espectrofotômetro foi determinada como descrito por Kraus *et al.* (1995) com algumas modificações conforme Azevedo *et al.* (1998). À temperatura de 25°C, foi adicionado extrato vegetal em uma mistura de reação de 1 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,5 contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preparado imediatamente antes do uso. A atividade foi determinada seguindo-se a decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por um minuto, através das alterações na absorbância a 240nm.

Atividade da ascorbato peroxidase (APX) – Para determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX), foi utilizada a metodologia proposta por Asada (1984), com modificações. A mistura de reação consistiu de tampão fosfato 80 mM pH 7,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de ácido ascórbico e 2 mM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi iniciada com a adição do extrato vegetal à mistura. A atividade da APX foi medida em um espectrofotômetro UV/VIS a 290 nm, durante 2 minutos, por meio da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Atividade da glutatona redutase (GR) – Para a extração da enzima glutatona redutase (GR), o material vegetal foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 Mm pH 7,8, 5 mM de ácido ascórbico, 5mM de EDTA e PVPP (10%) e, logo após, centrifugado por 10 min, a 10.000 g. A atividade da enzima foi medida em uma mistura de reação contendo o extrato foliar, tampão fosfato 100 mM, pH 7,5, 1 mM de DTNB, 0,1 mM de NADPH e 1 mM de glutatona oxidada (GSSG), a 30 °C (Ramachandra *et al.* 2004). A reação foi iniciada a partir da adição de NADPH, que permite a redução da GSSG pela enzima GR, e a atividade da

enzima foi medida em espectrofotômetro a 412 nm, pela formação de composto formado pelo DTNB na presença de GSSG.

Determinação de proteínas – o método de análise da expressão da atividade enzimática com base no conteúdo de proteína foi o proposto por Bradford (1976). A extração é realizada através de tampão fosfato de potássio 1M (pH 7,5) contendo EDTA (0,372g/L tampão) e DTT (0,462g/L tampão). Foi centrifugado 1g de tecido vegetal + 3mL tampão + PVPP, numa velocidade de 10.000 g durante 30min (4°C). A curva padrão consiste numa solução na concentração de 1mg/mL de BSA em leitura espectrofotométrica de 595 nm.

Determinação da peroxidação lipídica (MDA) – o método utilizado para determinar a peroxidação lipídica é o mesmo proposto por Heath & Packer (1968) e Buege & Aust (1978), com algumas modificações. O material vegetal foi homogeneizado em ácido tricloroacético contendo PVPP, seguido de centrifugação a 10.000 g por 5 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado ácido tricloroacético contendo ácido tiobarbitúrico, que foi mantido por 30 minutos a 95°C em banho-maria. Ao ser retirada do banho, a amostra sofreu rápido resfriamento em gelo. Com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento e também para clarear a amostra, uma alíquota foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm através da concentração de malondialdeído.

Em todas análises foram realizadas réplicas, exceto para o ácido ascórbico e superóxido dismutase.

#### **e) Monitoramento das condições ambientais**

Ao longo das exposições no biomonitoramento ativo, as concentrações atmosféricas de poluentes (ozônio, dióxido de enxofre, material particulado e dióxido de nitrogênio) e

variáveis climáticas (temperatura e umidade relativa), foram monitoradas por estação de monitoramento de qualidade do ar da CETESB presente na região Centro.

#### **f) Apresentação de Resultados e Análises Estatísticas**

Realizou-se inicialmente, uma análise descritiva, por meio de gráficos de contorno, da variação espacial e temporal dos componentes enzimáticos (catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e glutathione redutase), não enzimáticos (ácido ascórbico e glutathione), bem como o indicador de estresse oxidativo (acúmulo de malondialdeído).

Um gráfico de contorno é um subtipo de gráfico de superfície. É uma representação gráfica das relações entre três variáveis numéricas em duas dimensões. Duas variáveis são utilizadas nos eixos x e y, e uma terceira variável (z) é utilizada para os níveis de contorno (SAS 1999). Neste trabalho, os níveis de contorno estão representados como curvas e a área entre as curvas foram codificadas por cores para indicar valores interpolados. O primeiro conjunto de gráficos foi baseado nos resultados das 08 primeiras exposições. Repetiu-se o mesmo formato de apresentação ao final de *Resultados* incluindo as 11 exposições, com vistas a analisar as alterações na capacidade antioxidativa das plantas jovens de *T. pulchra* ao longo do período em que houve a mudança do sistema de geração de energia e vapor.

Em seguida, foram realizadas análises de variância não paramétrica (Teste de Kruskal Wallis), seguida por teste de comparação múltipla (Teste de Tukey) visando a buscar diferenças significativas entre locais e quinzenas dentro da mesma exposição para cada um dos indicadores de defesa antioxidativa. Tais análises foram aplicadas aos dados de quatro exposições, duas realizadas na fase Pré-UTE (exposições 2 e 4) e duas no período de transição (exposições 6 e 8).

Análises de regressão linear múltipla foram realizadas com a finalidade de verificar se as variações de cada indicador biológico analisado poderiam ser explicadas pela mudança do perfil de contaminação atmosférica (determinada pelos níveis de PM<sub>10</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub>)

em função da partida da usina termoelétrica e/ou por oscilações climáticas (temperatura do ar e umidade relativa). Essas análises foram realizadas apenas com os dados biológicos e abióticos obtidos no local Centro, onde se encontra a estação de monitoramento da CETESB. Para as variáveis abióticas, calcularam-se médias quinzenais correspondentes aos intervalos de tempo entre as subamostragens das plantas de *T. pulchra* realizadas durante os oito primeiros períodos de exposição. O método de análise multivariada adotado foi o *stepwise backward*, tomando as respostas antioxidativas e acúmulo de malondialdeído como variáveis dependentes (após transformação dos dados, nos casos não terem distribuição normal e/ou igualdade de variância) e das condições ambientais como variáveis independentes. Cada análise foi iniciada com todas as variáveis independentes, sendo eliminadas, passo a passo, todas aquelas que não explicaram significativamente as oscilações na resposta biológica em questão.

Finalmente, análises de correlação de Pearson foram feitas entre as respostas antioxidativas medidas nas plantas expostas no Centro ao longo do tempo e as observadas nos demais locais, com a finalidade de verificar se os modelos lineares propostos para as plantas do Centro seriam aplicáveis às plantas dos demais locais.

Para todas as análises estatísticas descritas, foi utilizado o programa Sigma Stat 3.5.

## **Resultados**

### **a) Perfil climático e de poluentes**

A figura 4 e a tabela 1 apresentam, respectivamente, o perfil médio dos poluentes e os dados climáticos medidos pela CETESB no Centro de Cubatão, durante as 11 exposições de *T. pulchra* em campo. Essa estação, segundo aquela Companhia, está situada na área urbana e está sob a influência das emissões da refinaria de petróleo alvo deste estudo.

Em geral, verifica-se aumento das concentrações médias de NO<sub>2</sub> e, de forma menos evidente, de MP<sub>10</sub> a partir da fase de transição, mantendo-se no mesmo patamar até o final do período experimental, contrariando aparentemente as previsões iniciais da Petrobrás. Verificou-se, ainda, decréscimo da concentração de SO<sub>2</sub> a partir de janeiro de 2011. Tal decréscimo poderia ser explicado pela redução das emissões desse poluente em função da troca do tipo de combustível para geração de energia (de óleo combustível para gás natural). Os níveis médios de O<sub>3</sub>, por sua vez, aumentaram gradativamente a partir do 3<sup>a</sup> período de exposição, alcançando valores máximos na 7<sup>a</sup> exposição. Nas três últimas exposições, as concentrações médias foram mais baixas.

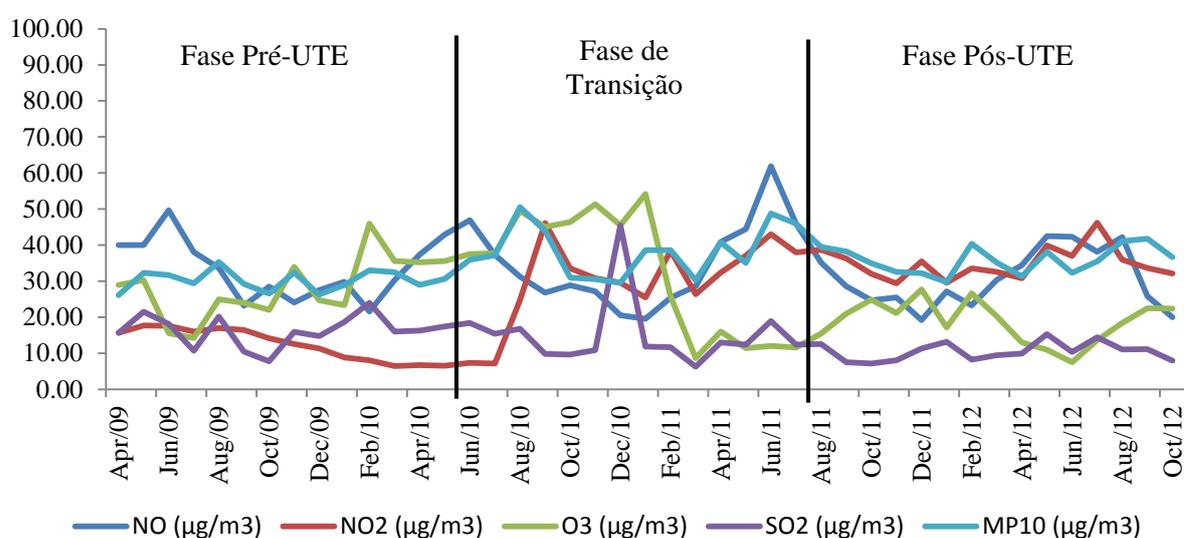


Figura 4: Perfil médio da concentração de poluentes atmosféricos obtidos pela estação de monitoramento da CETESB, localizada no Centro de Cubatão durante as 11 exposições de *T. pulchra*. NO = monóxido de nitrogênio, NO<sub>2</sub> = dióxido de nitrogênio, O<sub>3</sub> = ozônio, SO<sub>2</sub> = dióxido de enxofre, MP10 = material particulado.

Os maiores índices de temperatura foram encontrados na 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> exposições, período relacionado à Fase Pré-UTE e início da Fase de Transição. Os índices de umidade relativa do ar mantiveram-se constantes (Tabela 1).

Tabela 1: Valores mínimos, máximos e médios de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) medidas pela estação de monitoramento móvel da CETESB localizada no Centro de Cubatão durante as 11 exposições de *T. pulchra*.

	T (°C)			UR (%)		
	mínima	máxima	média	mínima	máxima	média
abr-jul/2009	15	32	21	46	100	87
jul-out/2009	16	31	21	52	100	91
nov/2009 a fev/2010	19	37	27	45	100	85
fev-mai/2010	18	36	25	36	100	84
mai-jul/2010	17	34	23	42	100	87
jul-out/2010	13	33	20	29	100	87
out/2010 a jan/2011	16	33	22	41	100	87
jan-mar/2011	14	33	22	23	100	80
set-nov/2011	19	29	21	50	100	81
mai-jul/2012	16	30	19	51	100	93
ago-out/2012	17	31	22	47	100	81

## b) Análise descritiva

Nas figuras 5 a 11, são apresentados os gráficos de contorno que indicam qualitativamente a variação espacial e temporal dos componentes enzimáticos (catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e glutathione redutase), não enzimáticos (ácido ascórbico e glutathione), bem como o indicador de estresse oxidativo (acúmulo de malondialdeído).

A atividade das enzimas CAT, GR e SOD geralmente foram maiores nos locais situados próximos à refinaria (CM1 e CM5), embora tenha havido momentos em que as enzimas GR e SOD estavam mais ativas nas plantas expostas no local referência (RP).

O Centro pareceu ser o local onde se verificou a menor atividade de CAT, GR e SOD em todo o período experimental. A atividade enzimática da APX se mostrou similar em todos os locais de exposição (Figura 5 e 6).

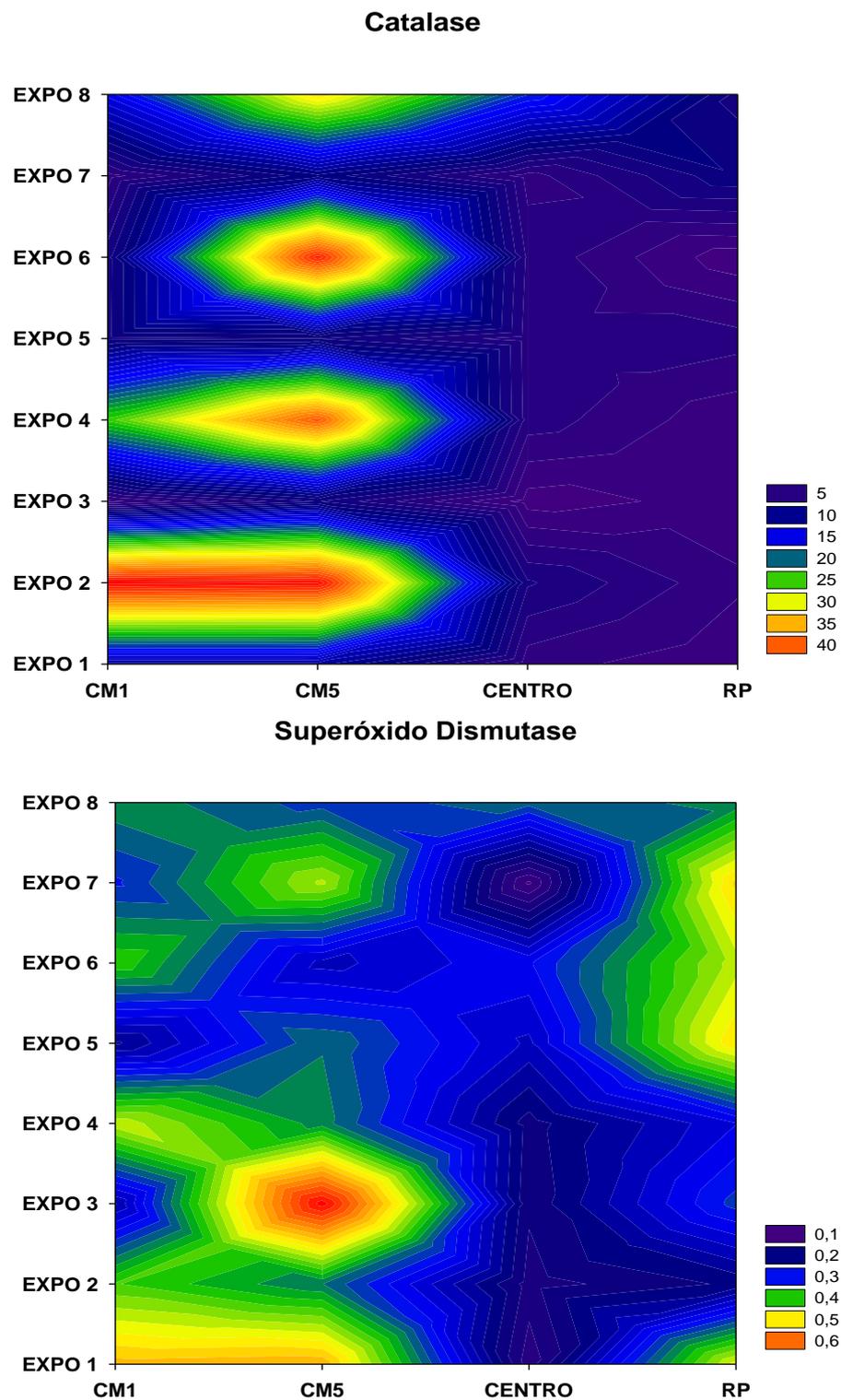
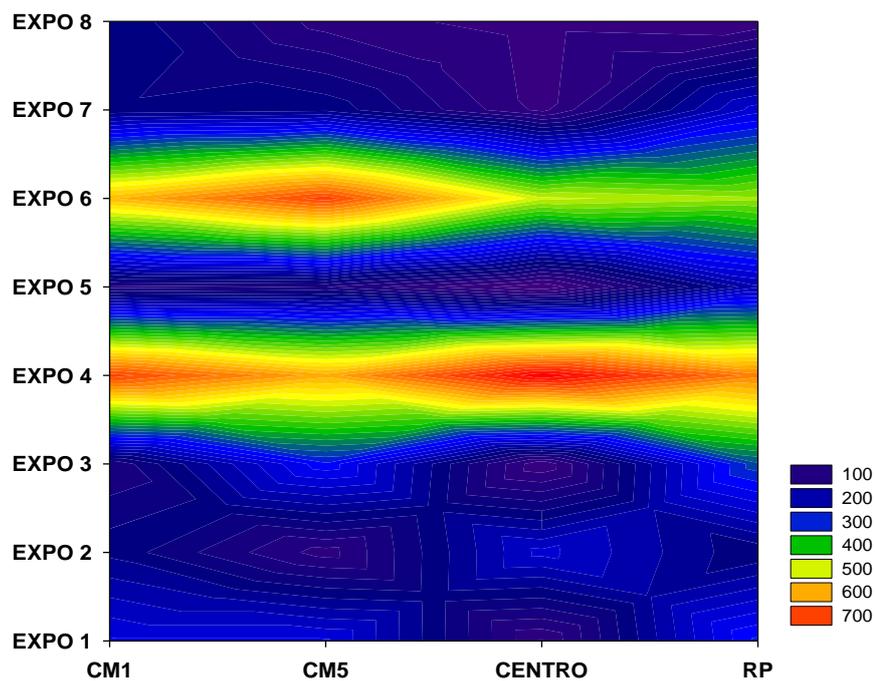


Figura 5. Valores médios (90 dias) da atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD nas plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4) e de Transição (expo 5 a 8) em diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão. Os valores da atividade enzimática são expressos em mg/proteína.

### Ascorbato Peroxidase



### Glutaciona Redutase

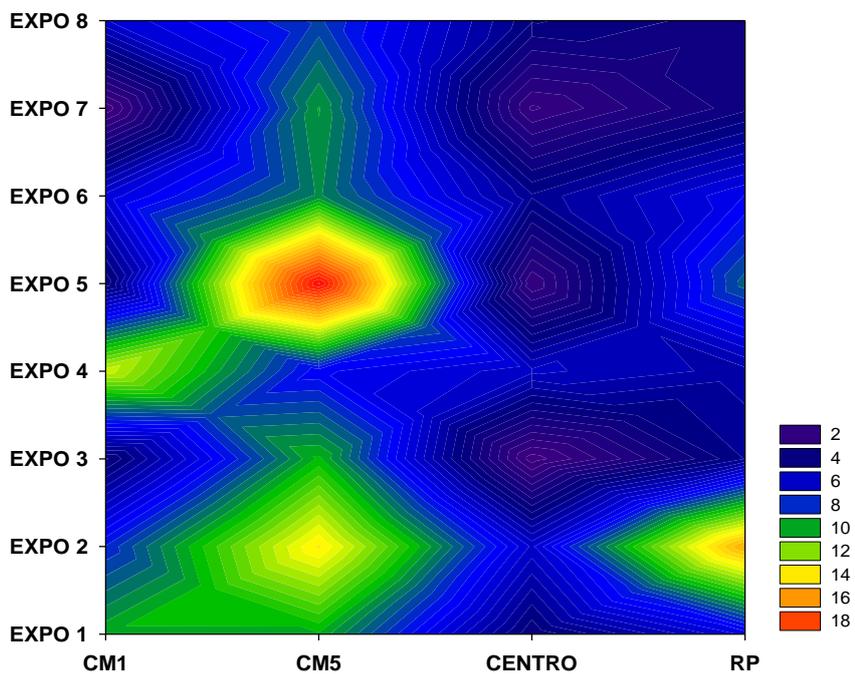
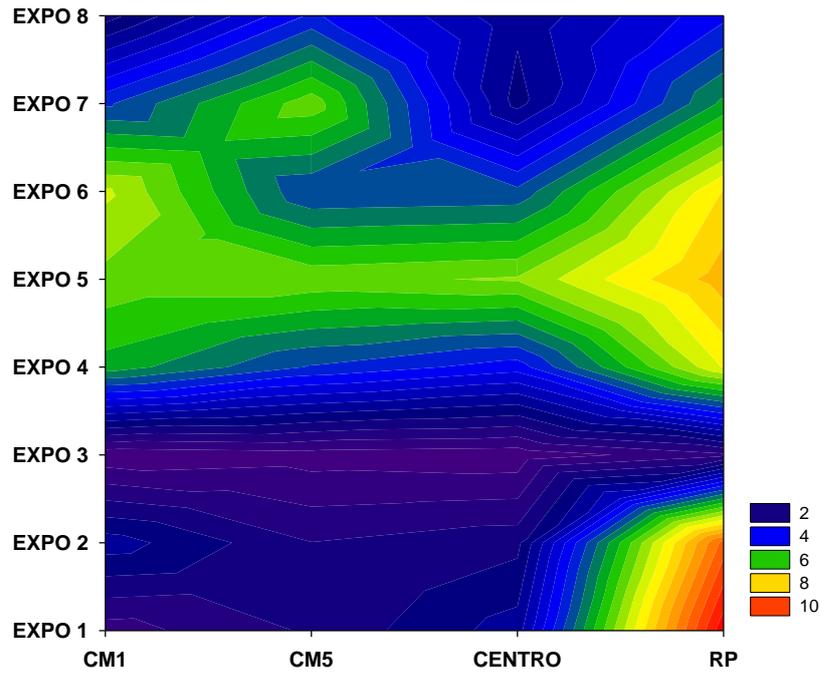


Figura 6: Valores médios (90 dias) da atividade de ascorbato peroxidase (APX) e glutaciona redutase (GR) nas plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4) e de Transição (expo 5 a 8) em diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão. Os valores das enzimas estão expressos em mg/proteína.

O ácido ascórbico, em suas formas reduzida e total, geralmente esteve mais concentrado nas plantas expostas no RP e, em menor proporção nos locais do Caminho do Mar (CM1) (figuras 7 e 8). Já o ácido ascórbico oxidado tendeu a se apresentar em maiores concentrações no CM1 e RP (figura 7). Os valores da razão entre ácido ascórbico reduzido/total foram, em geral, mais baixos nas plantas expostas no CM5 e Centro e mais altos no RP e CM1.

A glutathione, em suas formas reduzida, total e oxidada, apresentaram picos de concentração principalmente nas plantas do CM1, CM5 e Centro. A razão entre concentração da glutathione reduzida/total também tendeu a ser mais alta nesses locais de exposição (figuras 9 e 10).

### Ácido Ascórbico Reduzido



### Acido Ascórbico Oxidado

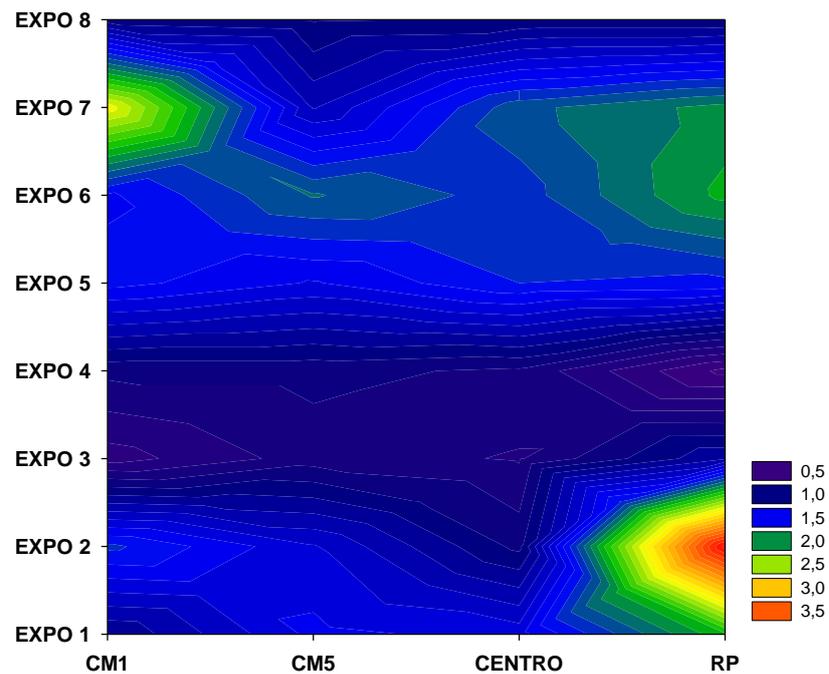


Figura 7: Concentração média (90 dias) de ácido ascórbico nas suas formas reduzida e oxidada, em plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4) e de Transição (expo 5 a 8) em diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão. Os valores de concentração estão expressos em mg/g/ms.

### Ácido Ascórbico Total

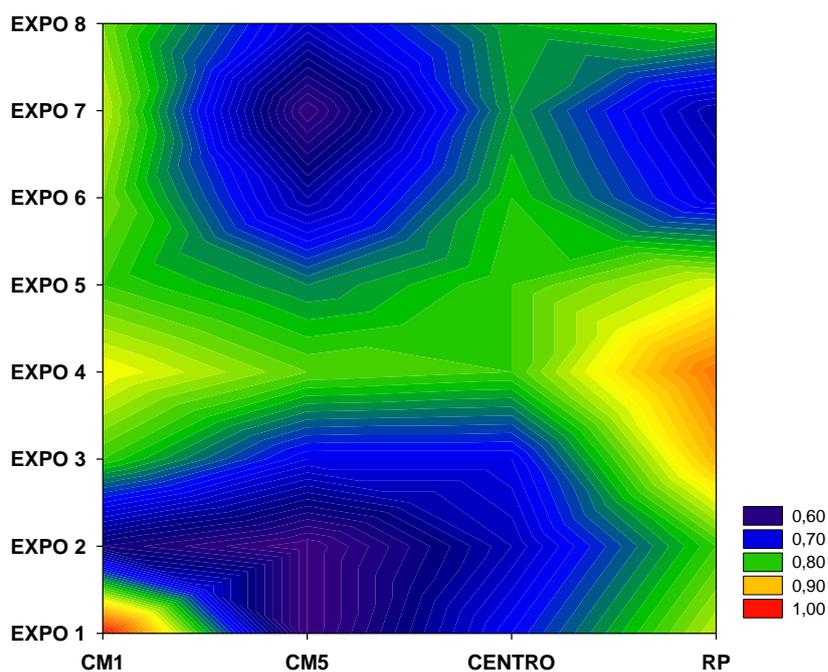
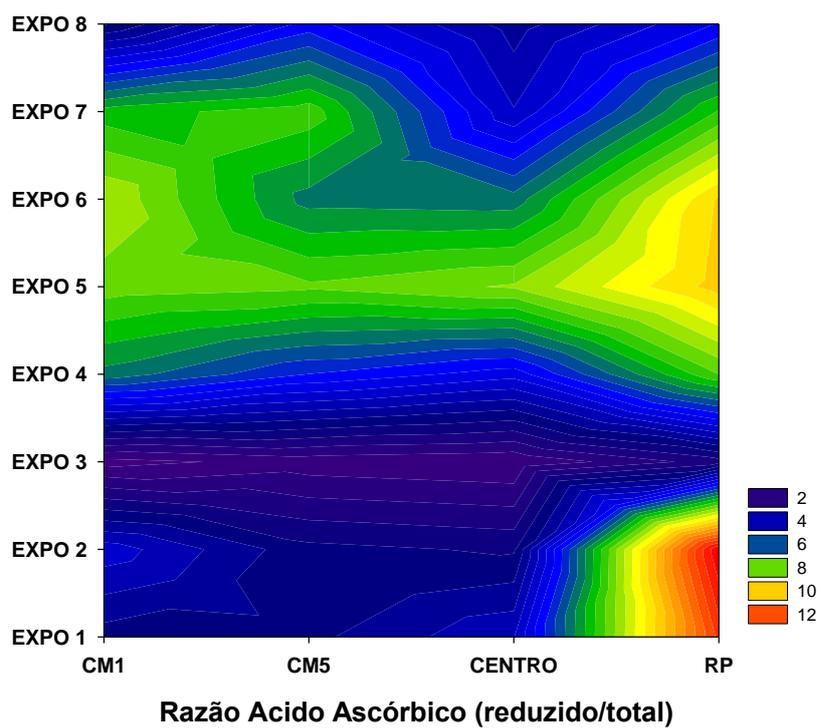


Figura 8: Valores médios (90 dias) da concentração de ácido ascórbico total, bem como da razão entre suas formas reduzida e total, em plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4) e de Transição (expo 5 a 8) em diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão. Os valores de concentração de ácido ascórbico total estão expressos em mg/g.ms.

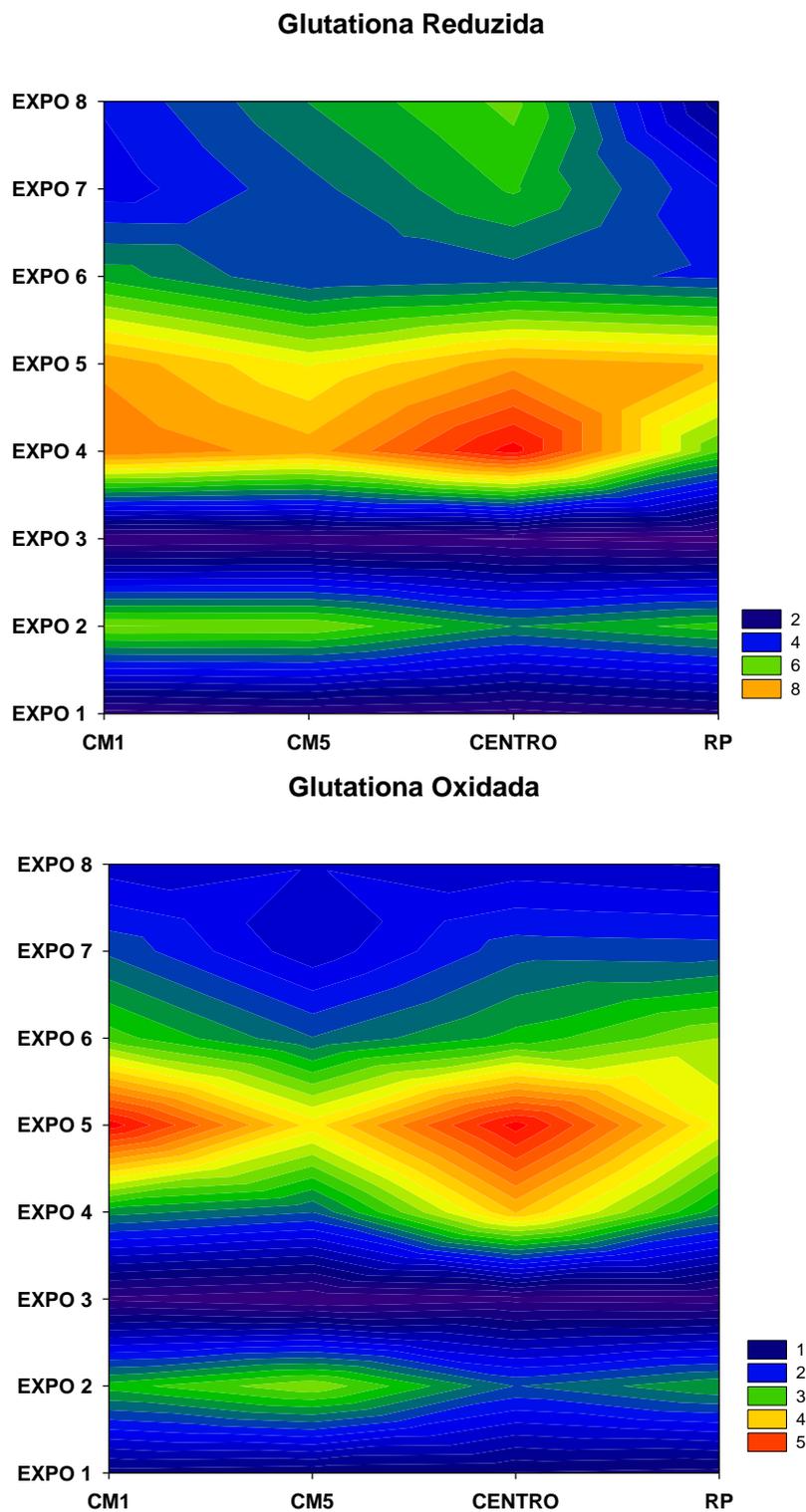


Figura 9: Concentração média (90 dias) de glutaciona, nas suas formas reduzida e oxidada, em plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4) e de Transição (expo 5 a 8) em diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão. Os valores de concentração de glutaciona estão expressos em  $\mu\text{mol/g/ms}$ .

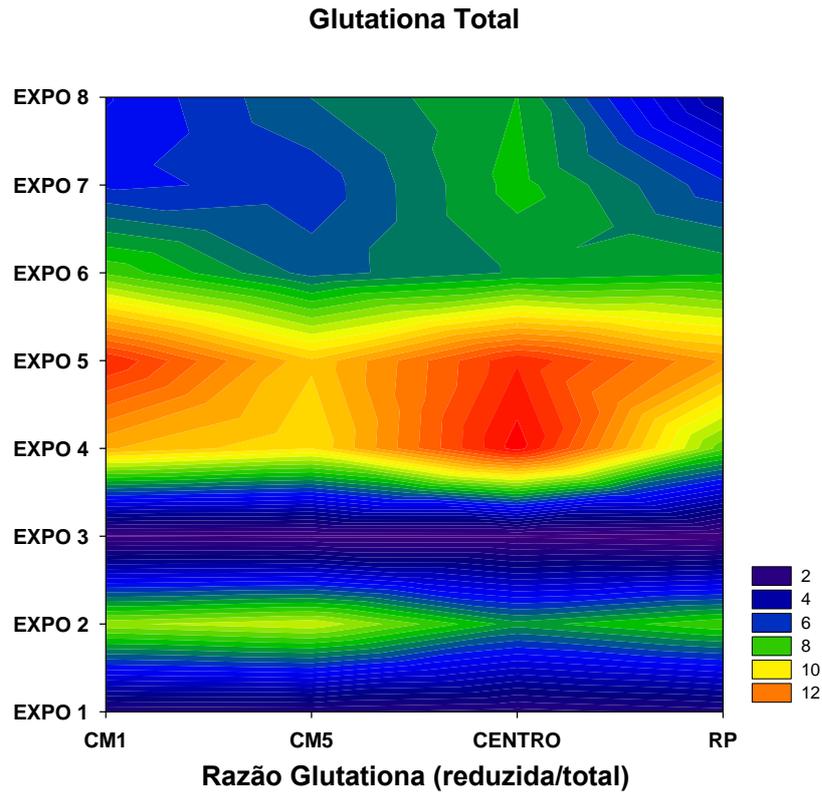


Figura 10: Valores médios (90 dias) da concentração de glutaciona total, bem como a razão entre suas formas reduzida/total, em plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4) e de Transição (expo 5 a 8) em diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão. Os valores de concentração de glutaciona estão expressos em  $\mu\text{mol/g/ms}$ .

O acúmulo de malondialdeído foi maior nas plantas expostas no CM1 e CM5 (figura 11), principalmente nas 3<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> exposições.

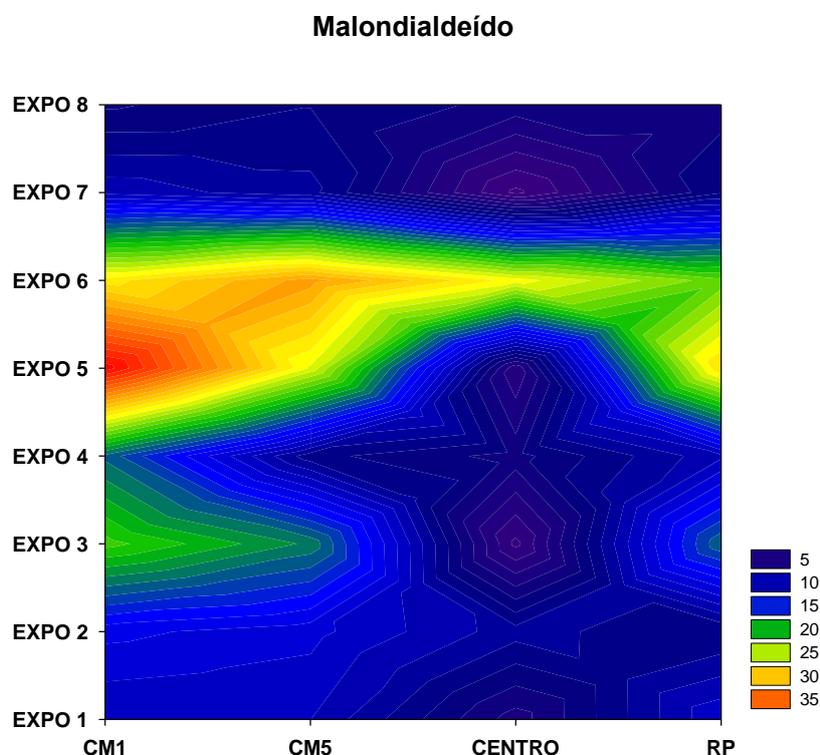


Figura 11: Acúmulo médio de malondialdeído (90 dias) em plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4) e de Transição (expo 5 a 8) em diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão. Os valores de acúmulo estão expressos em mMol/g/mf.

A atividade CAT nas plantas de *T. pulchra*, além de variar espacialmente de forma muito característica, também foi marcada por variações temporais nos locais do Caminho do Mar. Houve alternância entre altas e baixas atividades da CAT, especialmente nas plantas do CM5, ao longo de todo o período experimental (figura 5). A SOD apresentou um pico de atividade entre as 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> exposições, ainda na fase Pré-UTE, nas plantas expostas no CM1 e CM5. Na fase de transição (exposições 5 a 7), observou-se alta atividade da SOD apenas nas plantas mantidas no RP (figura 5). A APX apresentou picos de atividade nas plantas utilizadas nas 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> exposições (figura

6). A atividade de GR foi mais alta nas plantas do CM5, na fase Pré-UTE e no início do período de transição (entre as 2ª e 5ª exposições). O valor máximo de atividade da GR aconteceu na 5ª exposição, também no CM5 (figura 6).

O AA, nas suas formas reduzida e total, tendeu a estar mais concentrado nas plantas expostas introduzidas nos pontos mais próximos da Refinaria (CM1, CM5 e Centro), a partir do início de funcionamento da UTE, ou seja, nas exposições 5 a 7 (figuras 7 e 8). Para DHA (AA na forma oxidada), verificou-se o mesmo padrão temporal, porém de forma menos evidente. Ocasionalmente (por exemplo, exposições 2, 6 e 7), as concentrações de AsA, DHA e AA total foram altas nas plantas expostas no RP. O estado redox de AA, indicado pela razão de concentração entre AsA e AA total, aumentou a partir do 4º período experimental, principalmente nas plantas expostas no CM1 e no Centro. Esse aumento foi verificado nas plantas mantidas do RP na maioria dos períodos experimentais (Figura 8).

Houve picos de concentração de glutathiona reduzida, oxidada e total nas plantas mantidas no CM1 e Centro, durante as 4ª, 5ª e 6ª exposições. O estado redox de glutathiona (razão glutathiona reduzida/glutathiona total) ficou entre 0,7 e 0,8 nas plantas expostas nos pontos mais próximos da refinaria em todo o período experimental, exceto na 3ª exposição cujo valor da razão variou entre 0,3 e 0,5, em todos os locais indiscriminadamente (Figura 10).

A peroxidação lipídica (indicada pela concentração foliar de MDA) ocorreu em maior intensidade nas plantas introduzidas em CM1 e CM5, entre as exposições 3 e 7 (Figura 11).

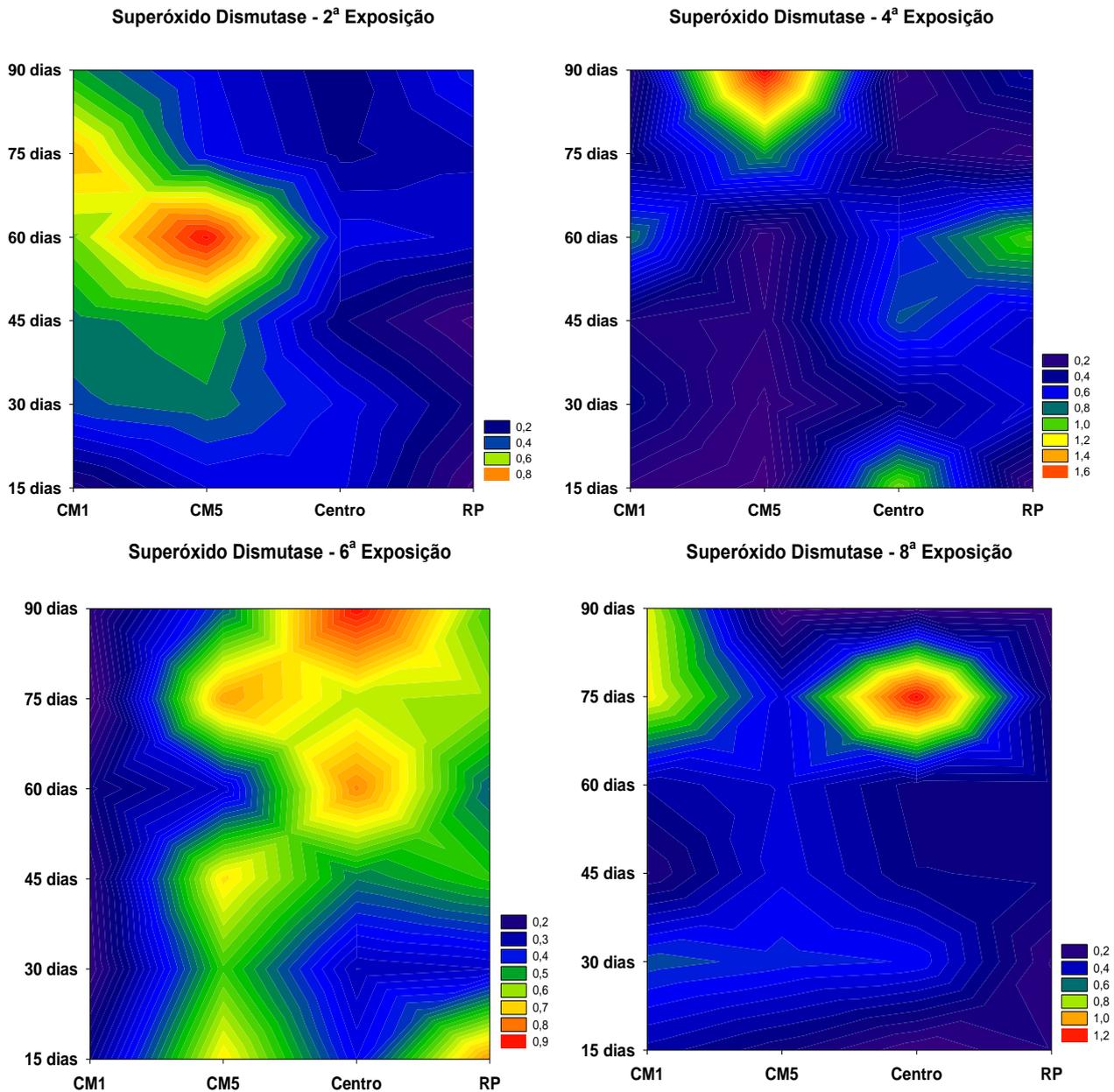
A seguir, será descrita estatisticamente a variação nos níveis dos indicadores de defesas enzimáticos e não-enzimáticos e da peroxidação lipídica ao longo dos 90 dias de duração de cada experimento de campo, tomando por base os resultados obtidos após as

amostragens quinzenais, assim como a variação dos indicadores analisados entre locais de exposição no mesmo experimento. Ambas as abordagens foram aplicadas apenas aos resultados provenientes das 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> exposições, quando não houve falha na periodicidade quinzenal de amostragem de sub-lotes de plantas de todos os 4 locais de estudo. Além disso, as duas primeiras foram realizadas na fase pré-instalação da UTE e as duas últimas na fase de transição, permitindo, assim, verificar se houve mudança no padrão espacial e temporal nas respostas das plantas em função de possíveis alterações no perfil de contaminação atmosférica.

Para facilitar a visualização, os resultados também serão mostrados como gráficos de contorno (Figuras 12 a 19) e as diferenças temporais e espaciais significativas dentro de cada exposição serão apontadas nas tabelas abaixo das figuras, por meio de letras maiúsculas e minúsculas.

Os parâmetros de ácido ascórbico e glutatona em suas formas oxidadas e suas razões, bem como a catalase, foram deixados de fora dessa análise, por não apresentarem diferenças ao longo das exposições, como observado nas figuras anteriores.

Houve diferença estatística entre locais e entre quinzenas de amostragens na atividade da superóxido dismutase na 2<sup>a</sup> exposição, correspondente à Fase Pré-UTE, verificando-se aumento significativo nas plantas do CM5 e aos 60 dias de exposição. Nas 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> exposições, correspondentes à Fase de Transição, houve tendência de aumento da atividade a partir dos 75 dias, especialmente nos locais no entorno da refinaria, porém não comprovada estatisticamente (Figura 12).

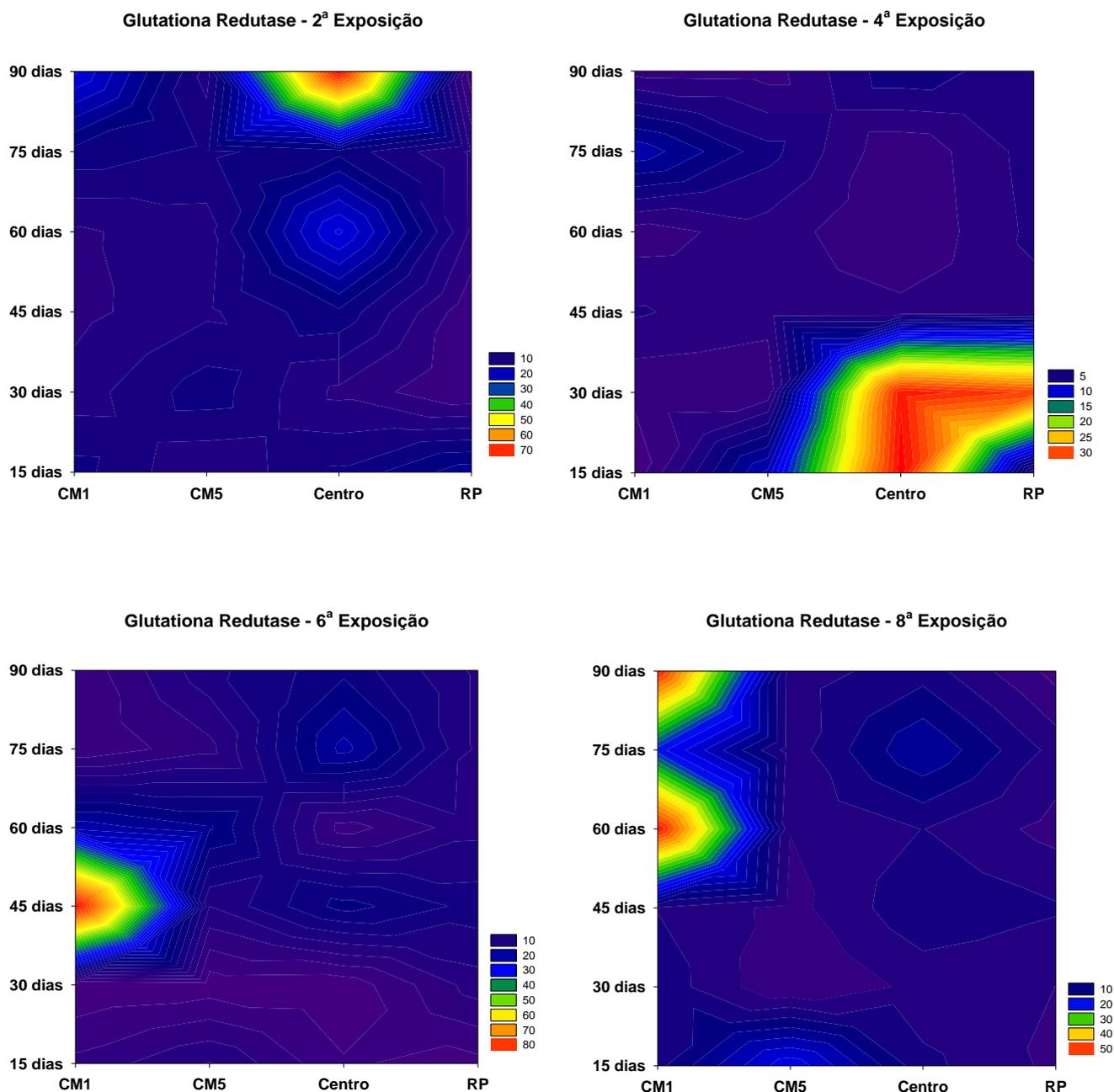


Fase	Locais	15	30	45	60	75	90	Fase	Locais	15	30	45	60	75	90
<b>pré-UTE</b>								<b>Transição</b>							
<b>2ª Expo</b>	CM1 (B)	0,22 b	0,07 b	0,28 b	0,83 a	0,90 b	0,93 b	<b>6ª Expo</b>	CM1 (A)	0,24 a	0,35 a	0,33 a	0,48 a	0,33 a	0,32 a
	CM5 (A)	0,12 b	0,16 b	0,15 b	0,94 a	1,44 b	1,22 b		CM5 (A)	0,47 a	0,45 a	0,33 a	0,31 a	0,31 a	0,23 a
	Centro (B)	0,15 b	0,12 b	0,16 b	0,44 a	0,47 b	0,69 b		Centro (A)	0,46 a	0,34 a	0,07 a	0,21 a	0,16 a	0,16 a
	RP (B)	0,07 b	0,16 b	0,47 b	0,72 a	0,68 b	0,58 b		RP (A)	0,37 a	0,27 a	0,37a	0,49 a	0,22 a	0,17 a
<b>4ª Expo</b>	CM1 (A)	0,43 a	0,22 a	0,40 a	0,60 a	0,60 a	0,57 a	<b>8ª Expo</b>	CM1 (A)	0,20 a	0,17 a	0,12 a	0,18 a	0,23 a	0,21 a
	CM5 (A)	0,59 a	0,10 a	0,14 a	0,10 a	0,10 a	0,43 a		CM5 (A)	0,24 a	0,27 a	0,19 a	0,22 a	0,22 a	0,43 a
	Centro (A)	0,45 a	0,13 a	0,45 a	0,65 a	0,65 a	0,67 a		Centro (A)	0,55 a	0,52 a	0,57 a	0,52 a	0,38 a	0,18 a
	RP (A)	0,28 a	0,26 a	0,78 a	0,78 a	0,61 a	0,32 a		RP (A)	0,32 a	0,27 a	0,44 a	0,33 a	0,34 a	0,38 a

Figura 12: Atividade média da superóxido dismutase (mg/proteína) em plantas de *T. pulchra* retiradas quinzenalmente (15 a 90 dias) dos diferentes locais no entorno da

refinaria de petróleo de Cubatão, durante as exposições realizadas nas fases pré-UTE e de transição. Na tabela, letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam, respectivamente, diferença estatística entre os locais e entre quinzenas em cada local na mesma exposição.

A atividade da glutatona redutase foi significativamente maior nas plantas mantidas no Centro, durante as exposições realizadas na Fase Pré-UTE, e, nas plantas expostas no CM1, durante a Fase de Transição. Houve variação temporal significativa apenas na 4ª exposição, sendo observado pico de atividade dessa enzima aos 15 e 30 dias nas plantas dos 4 locais (Figura 13).

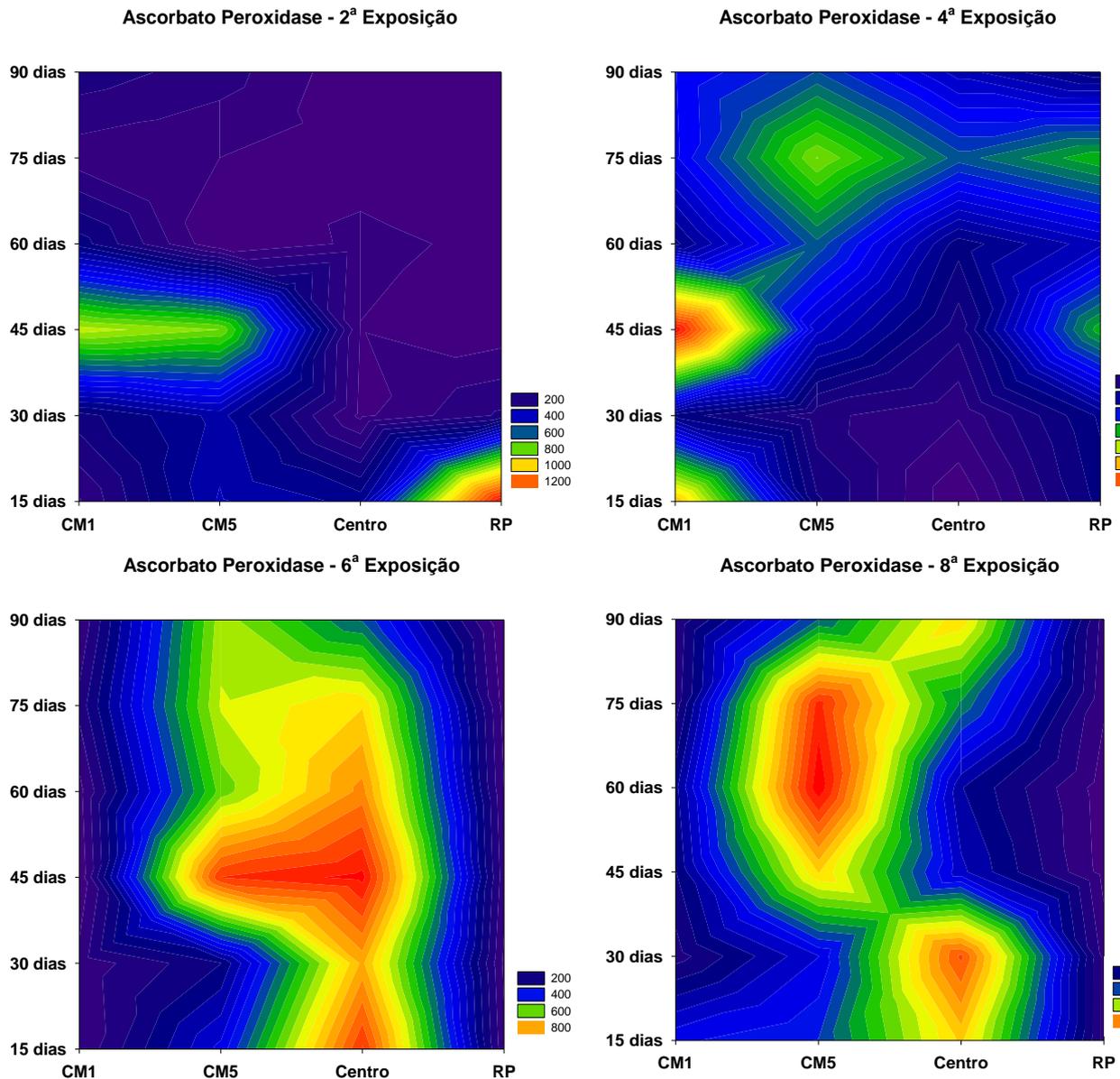


Fase	Locais	15	30	45	60	75	90	Fase	Locais	15	30	45	60	75	90
<b>pré-UTE</b>								<b>Transição</b>							
<b>2ª Expo</b>	CM1 (B)	12,26 a	7,18 a	4,30 a	5,34 a	12,92 a	17,62 a	<b>6ª Expo</b>	CM1 (A)	5,52 a	32,81 a	32,74 a	5,54 a	3,18 a	2,42 a
	CM5 (B)	16,36 a	16,73 a	5,93 a	6,96 a	8,18 a	6,48 a		CM5 (B)	7,31 a	3,85 a	7,89 a	7,79 a	7,01 a	7,59 a
	Centro (A)	24,36 a	18,25 a	13,99 a	24,34 a	14,79 a	19,95 a		Centro (B)	1,67 a	5,50 a	14,21 a	3,54 a	18,36 a	12,51 a
	RP (B)	17,29 a	11,82 a	3,32 a	15,77 a	4,05 a	5,54 a		RP (B)	1,65 a	5,04 a	18,95 a	11,87 a	4,04 a	7,23 a
<b>4ª Expo</b>	CM1 (B)	17,60 a	2,83 b	2,03 c	2,15 c	12,05 c	2,33 c	<b>8ª Expo</b>	CM1 (A)	6,38 a	11,14 a	9,10 a	18,09 a	19,02 a	28,45 a
	CM5 (B)	11,51 a	2,11 b	2,68 c	2,58 c	5,87 c	1,71 c		CM5 (B)	11,33 a	3,20 a	2,34 a	4,06 a	5,03 a	4,28 a
	Centro (A)	21,33 a	7,05 b	6,18 c	2,29 c	2,26 c	12,59 c		Centro (B)	5,70 a	6,46 a	6,47 a	6,66 a	9,12 a	6,57 a
	RP (B)	2,46 a	7,65 b	1,49 c	2,10 c	3,17 c	4,04 c		RP (B)	3,32 a	2,72 a	5,53 a	3,98 a	3,00 a	1,55 a

Figura 13: Atividade média da glutaciona redutase (mg/proteína) em plantas de *T. pulchra* retiradas quinzenalmente (15 a 90 dias) dos diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão, durante as exposições realizadas nas fases pré-UTE e

de transição. Na tabela, letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam, respectivamente, diferença estatística entre os locais e entre quinzenas em cada local, na mesma exposição.

Não se comprovou variação espacial na ascorbato peroxidase em nenhuma das fases, porém, observou-se uma alta atividade dessa enzima ao longo dos 90 dias de exposição após o início de operação da UTE, principalmente no Centro e CM5 (Figura 14).

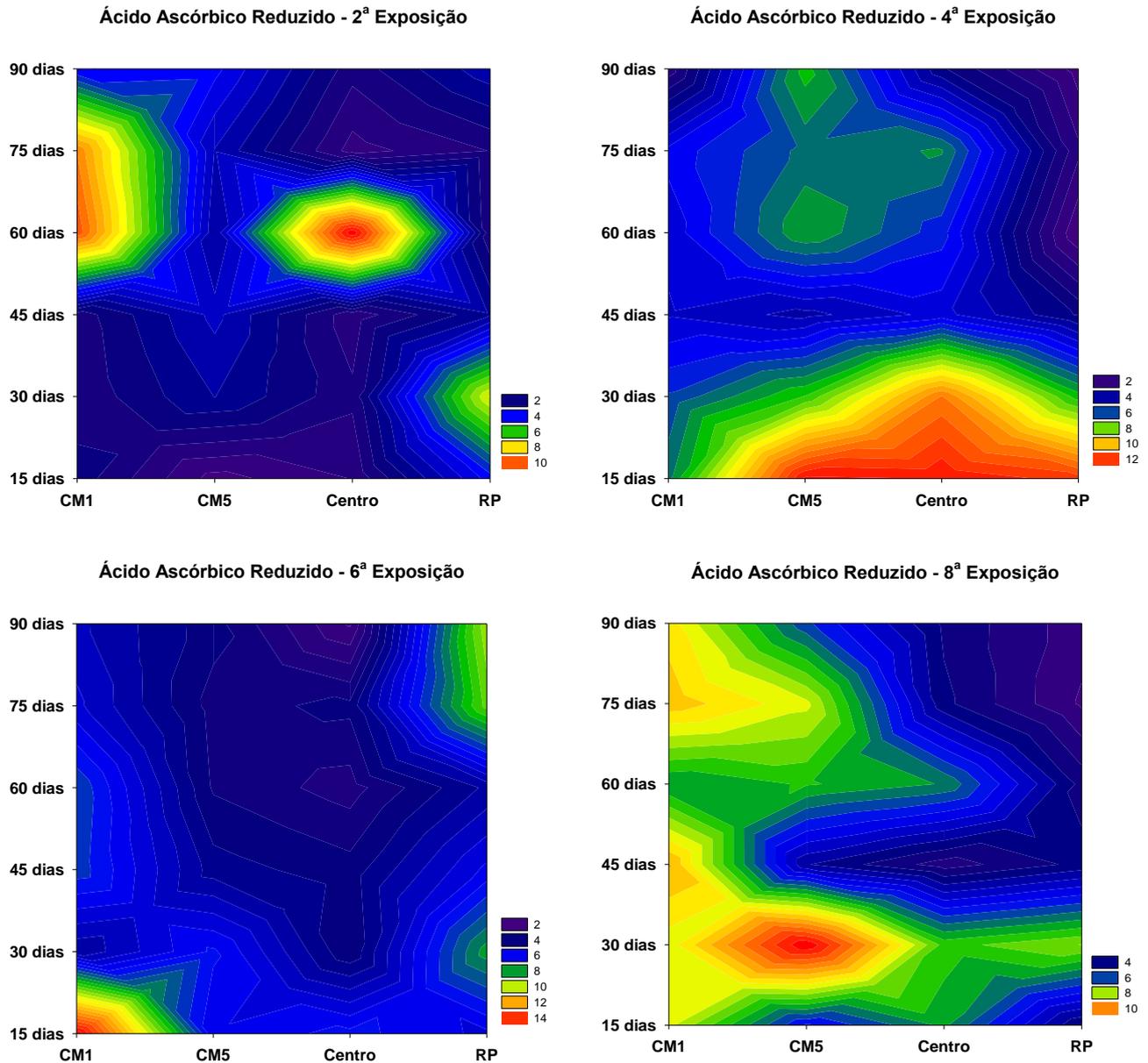


Fase	Locais	15	30	45	60	75	90	Fase	Locais	15	30	45	60	75	90
<b>pré-UTE</b>								<b>Transição</b>							
<b>2ª Expo</b>	CM1 (A)	195,38 a	145,90 a	743,61 a	169,78 a	90,63 a	116,55 a	<b>6ª Expo</b>	CM1 (A)	79,90 a	62,78 a	56,82 a	44,98 a	98,92 a	76,48 a
	CM5 (A)	301,60 a	256,80 a	690,59 a	176,21 a	82,33 a	143,92 a		CM5 (A)	245,21 a	190,61 a	866,91 a	770,17 a	680,82 a	784,13 a
	Centro (A)	206,90 a	147,02 a	67,01 a	78,85 a	49,61 a	51,94 a		Centro (A)	816,09 a	777,92 a	852,76 a	769,41 a	562,96 a	378,32 a
	RP (A)	483,46 a	212,21 a	64,72 a	73,22 a	45,47 a	50,65 a		RP (A)	78,85 a	73,22 a	90,63 a	82,33 a	49,61 a	42,96 a
<b>4ª Expo</b>	CM1 (A)	351,52 a	162,33 a	346,27 a	257,95 a	270,99 a	329,24 a	<b>8ª Expo</b>	CM1 (A)	229,07 a	124,77 a	172,81 a	121,08 a	83,84 a	125,41 a
	CM5 (A)	192,15 a	163,91 a	327,78 a	453,58 a	478,65 a	273,36 a		CM5 (A)	466,74 a	402,55 a	837,80 a	706,71 a	711,26 a	659,51 a
	Centro (A)	65,10 a	76,69 a	220,75 a	192,45 a	304,13 a	312,92 a		Centro (A)	506,01 a	560,58 a	334,46 a	290,38 a	594,59 a	507,76 a
	RP (A)	315,33 a	152,57 a	269,86 a	152,28 a	313,57 a	186,27 a		RP (A)	50,93 a	52,26 a	31,05 a	27,01 a	56,18 a	47,27 a

Figura 14: Atividade média da ascorbato peroxidase (mg/proteína) em plantas de *T. pulchra* retiradas quinzenalmente (15 a 90 dias) dos diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão, durante as exposições realizadas nas fases pré-UTE e de transição. Na tabela, letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam,

respectivamente, diferença estatística entre os locais e entre quinzenas em cada local, na mesma exposição.

O nível de ácido ascórbico reduzido nas plantas do Centro foi significativamente maior do que nos demais locais nos experimentos realizados na fase Pré-UTE. Nas exposições realizadas na Fase de Transição, houve aumento significativo apenas na 8ª exposição nas plantas expostas no CM5. Nas duas primeiras exposições, não houve variação temporal entre as quinzenas de retirada das plantas em todos os locais, mas nas duas últimas a concentração de AsA foi significativamente maior após 30 dias em todos os locais (Figura 15).

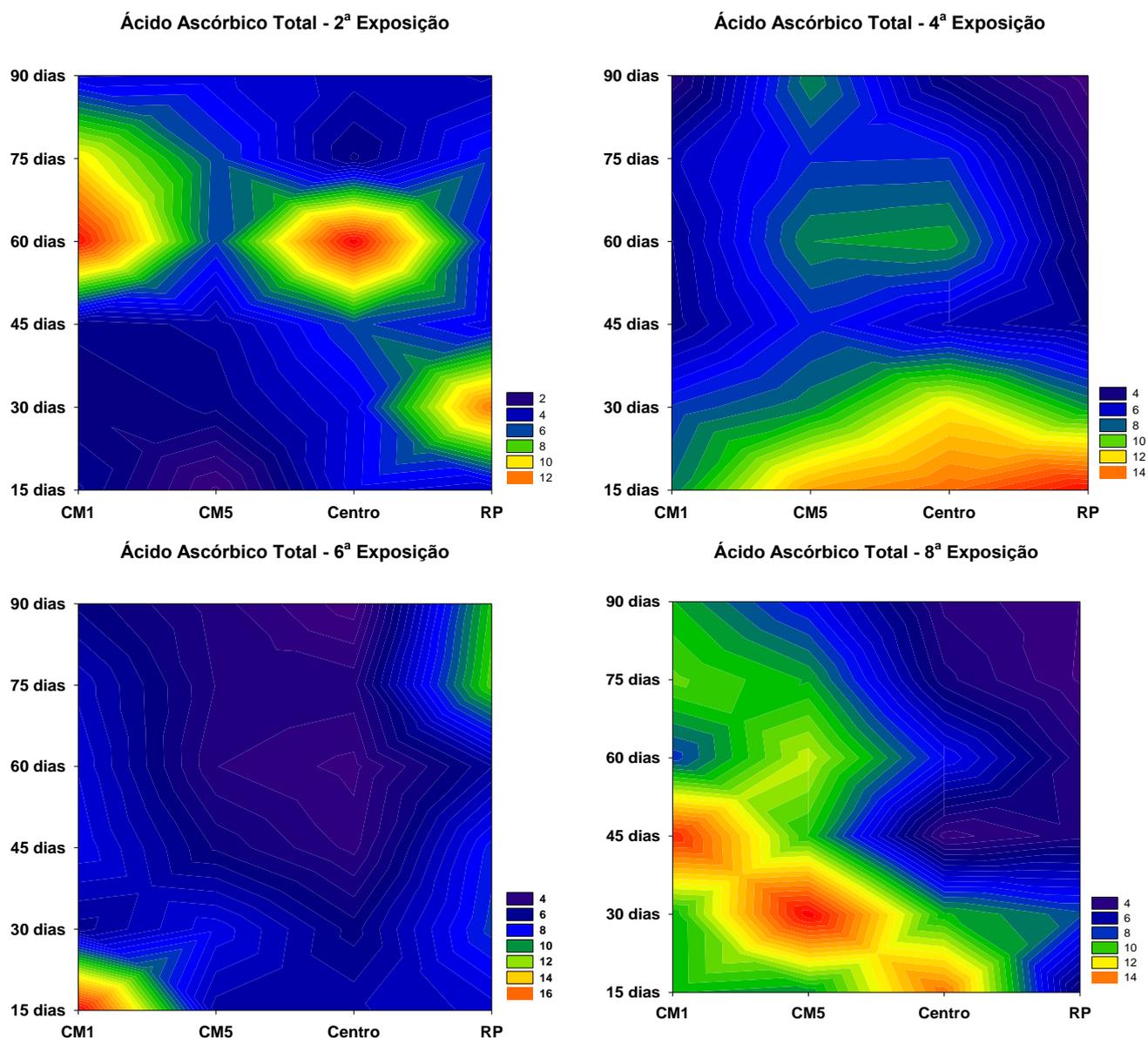


Fase	Locais	15	30	45	60	75	90	Fase	Locais	15	30	45	60	75	90
<b>pré-UTE</b>								<b>Transição</b>							
<b>2ª Expo</b>	CM1 (B)	2,65 a	3,25 a	2,51 a	1,26 a	3,33 a	2,70 a	<b>6ª Expo</b>	CM1 (A)	8,74 b	8,90 a	4,52 b	6,39 b	5,99 b	6,81 b
	CM5 (B)	1,87 a	1,25 a	1,30 a	1,83 a	1,65 a	1,76 a		CM5 (A)	9,00 b	6,73 a	2,92 b	4,23 b	1,24 b	2,44 b
	Centro (A)	1,49 a	0,89 a	2,06 a	1,59 a	4,06 a	1,11 a		Centro (A)	6,51 b	8,25 a	4,91 b	4,37 b	2,71 b	1,82 b
	RP (B)	11,32 a	3,80 a	3,72 a	14,89 a	12,32 a	10,08 a		RP (A)	7,81 b	10,46 a	7,69 b	7,03 b	6,33 b	6,38 b
<b>4ª Expo</b>	CM1 (B)	7,26 a	6,09 a	4,84 a	4,11 a	3,89 a	6,43 a	<b>8ª Expo</b>	CM1 (B)	1,25 b	1,84 a	1,89 b	1,74 b	2,08 b	2,09 b
	CM5 (B)	6,69 a	6,48 a	4,62 a	4,59 a	1,95 a	1,81 a		CM5 (A)	5,34 b	5,42 a	3,97 b	3,51 b	3,24 b	3,01 b
	Centro (A)	6,04 a	3,77 a	3,82 a	4,56 a	1,94 a	2,61 a		Centro (B)	1,94 b	1,38 a	4,95 b	3,36 b	1,68 b	1,61 b
	RP (B)	7,10 a	5,95 a	5,57 a	5,23 a	9,54 a	9,98 a		RP (B)	3,39 b	5,78 a	2,97 b	5,16 b	2,80 b	3,25 b

Figura 15: Concentração média do ácido ascórbico reduzido (mg/g/ms) em plantas de *T. pulchra* retiradas quinzenalmente (15 a 90 dias) dos diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão, durante as exposições realizadas nas fases pré-UTE e

de transição. Na tabela, letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam, respectivamente, diferença estatística entre os locais e entre quinzenas em cada local, na mesma exposição.

Na Fase Pré-UTE, o nível de ácido ascórbico total foi significativamente maior nas plantas expostas no Centro (Expo 2) e no CM5 e Centro (Expo 4). Na Fase de Transição, embora não tenha ocorrido diferenças estatísticas espaciais e temporais, as plantas introduzidas nos locais considerados poluídos – CM1, CM5 e Centro – apresentaram maiores níveis de concentração (Figura 16).

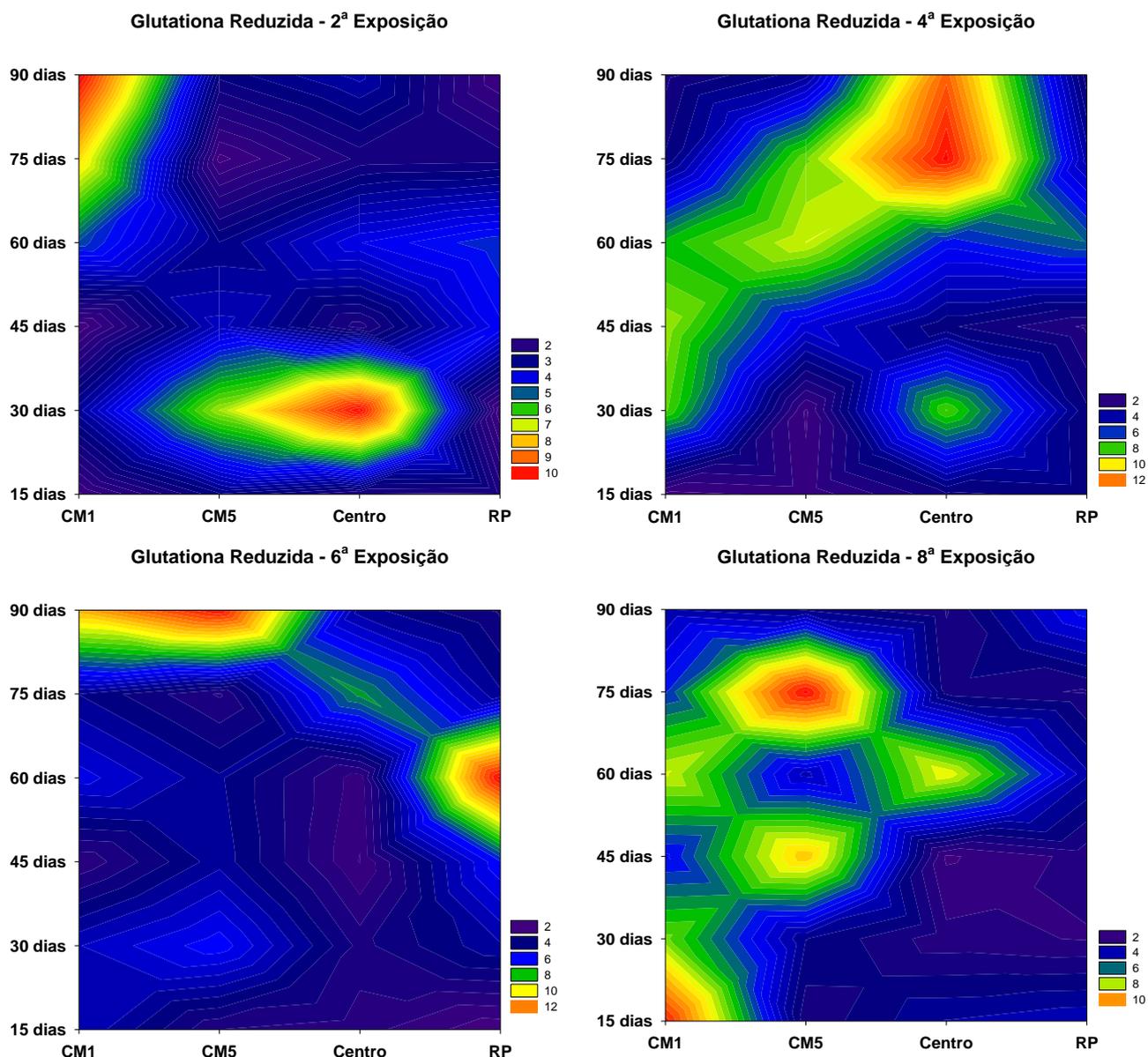


Fase	Locais	15	30	45	60	75	90	Fase	Locais	15	30	45	60	75	90
<b>pré-UTE</b>								<b>Transição</b>							
<b>2ª Expo</b>	CM1 (B)	3,94 a	4,17 a	2,88 a	4,43 a	6,26 a	3,80 a	<b>6ª Expo</b>	CM1 (A)	11,19 a	10,00 b	6,56 b	7,71 b	7,07 b	7,68 b
	CM5 (B)	2,67 a	2,23 a	1,84 a	3,57 a	4,15 a	3,05 a		CM5 (A)	12,18 a	8,83 b	4,71 b	5,75 b	2,36 b	3,60 b
	Centro (A)	2,63 a	1,49 a	2,61 a	2,46 a	4,82 a	2,42 a		Centro (A)	8,26 a	9,94 b	6,87 b	6,53 b	2,40 b	2,99 b
	RP (B)	14,60 a	4,08 a	4,47 a	25,01 a	19,53 a	11,46 a		RP (A)	10,83 a	12,96 b	9,72 b	9,57 b	7,14 b	7,68 b
<b>4ª Expo</b>	CM1 (C)	8,64 a	7,11 a	5,13 a	4,50 a	4,79 a	7,41 a	<b>8ª Expo</b>	CM1 (A)	2,62 b	2,75 a	3,04 b	2,42 b	2,90 b	2,79 b
	CM5 (A)	7,81 a	7,66 a	4,99 a	5,04 a	3,13 a	2,50 a		CM5 (A)	6,10 b	6,39 a	5,13 b	4,42 b	4,12 b	3,69 b
	Centro (B)	6,63 a	4,67 a	4,22 a	5,21 a	2,98 a	3,70 a		Centro (A)	2,73 b	2,60 a	5,61 b	4,28 b	2,55 b	2,62 b
	RP (C)	7,61 a	6,79 a	6,08 a	5,57 a	9,65 a	9,98 a		RP (A)	4,46 b	6,64 a	3,87 b	6,15 b	3,80 b	4,10 b

Figura 16: Concentração média do ácido ascórbico total (mg/g/ms) em plantas de *T. pulchra* retiradas quinzenalmente (15 a 90 dias) dos diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão, durante as exposições realizadas nas fases pré-UTE e de transição. Na tabela, letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam,

respectivamente, diferença estatística entre os locais e entre quinzenas em cada local, na mesma exposição.

A concentração de glutathiona reduzida mostrou-se significativamente mais alta nas plantas expostas no Centro de Cubatão, durante os experimentos conduzidos na Fase Pré-UTE. Na 4ª exposição, as plantas de todos os locais apresentaram um pico de concentração após 75 dias de permanência nos locais. Na Fase de Transição, as maiores concentrações tenderam a ocorrer a partir dos 75 dias, no Centro, CM1 e CM5 (Figura 17).

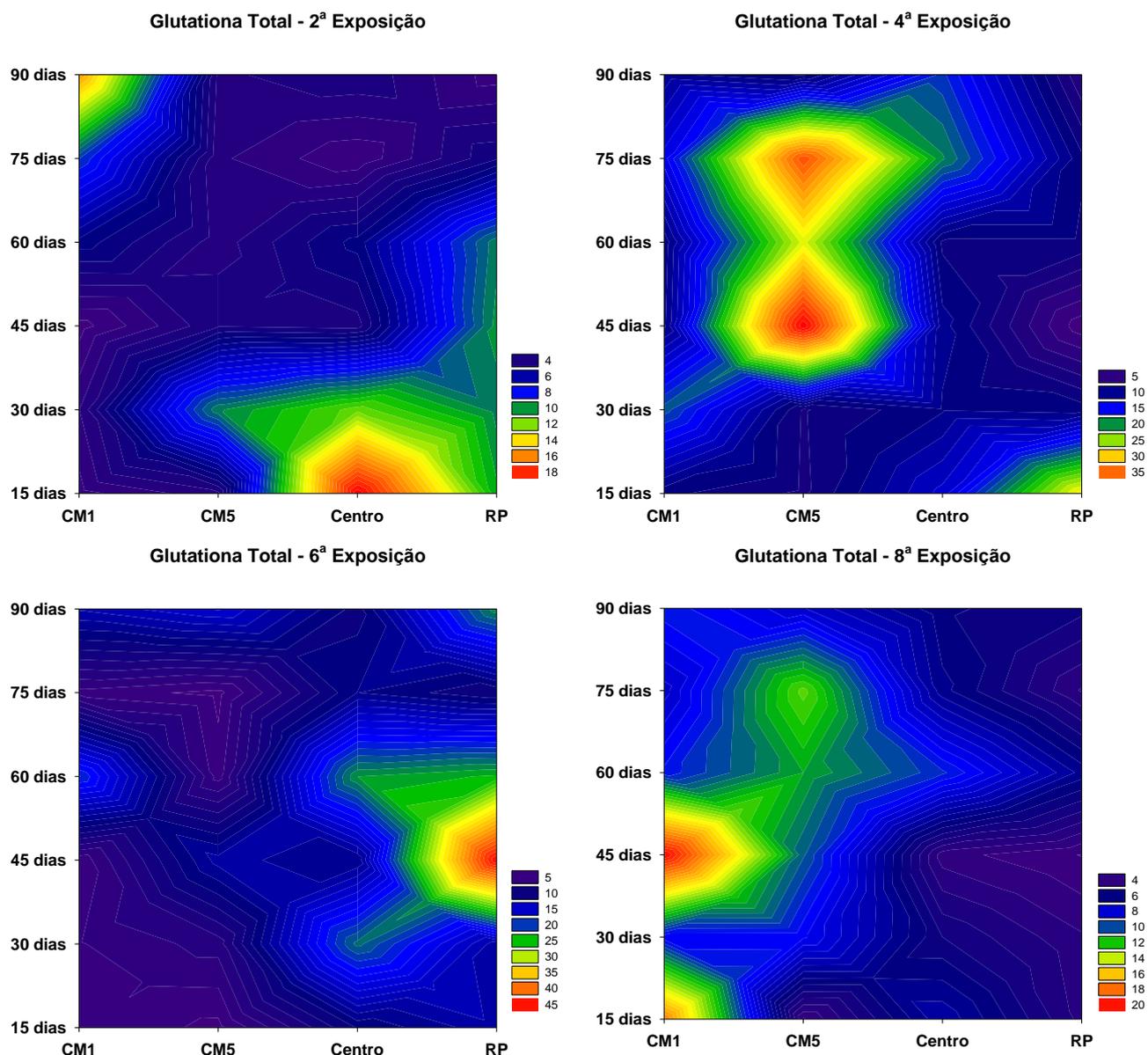


Fase	Locais	15	30	45	60	75	90	Fase	Locais	15	30	45	60	75	90
<b>pré-UTE</b>								<b>Transição</b>							
<b>2ª Expo</b>	CM1 (B)	2,95 a	13,80 a	9,07 a	3,61 a	3,63 a	3,01 a	<b>6ª Expo</b>	CM1 (A)	2,13 a	10,11 a	7,11 a	2,84 a	5,10 a	2,87 a
	CM5 (B)	3,44 a	10,66 a	11,12 a	4,73 a	3,45 a	2,45 a		CM5 (A)	2,74 a	4,50 a	3,53 a	5,23 a	3,73 a	4,33 a
	Centro (A)	2,61 a	10,23 a	7,32 a	3,08 a	2,79 a	2,73 a		Centro (A)	2,38 a	6,16 a	5,00 a	4,89 a	1,81 a	4,89 a
	RP (B)	1,81 a	11,11 a	9,30 a	4,77 a	2,73 a	2,58 a		RP (A)	3,23 a	8,33 a	4,94 a	2,96 a	2,40 a	1,60 a
<b>4ª Expo</b>	CM1 (B)	7,65 b	9,89 b	8,05 b	7,47 b	7,77 a	9,34 b	<b>8ª Expo</b>	CM1 (A)	2,40 a	5,65 a	5,55 a	2,18 a	3,35 a	2,84 a
	CM5 (B)	5,00 b	10,15 b	10,30 b	6,18 b	11,59 a	3,61 b		CM5 (A)	2,60 a	6,25 a	9,23 a	3,55 a	2,95 a	4,31 a
	Centro (A)	7,35 b	9,35 b	7,18 b	15,83 b	5,70 a	13,39 b		Centro (A)	3,00 a	6,40 a	3,78 a	3,67 a	7,14 a	10,37 a
	RP (B)	5,75 b	8,93 b	4,77 b	6,33 b	2,28 a	5,67 b		RP (A)	1,39 a	2,18 a	1,72 a	2,19 a	2,47 a	3,17 a

Figura 17: Concentração média da glutathiona reduzida ( $\mu\text{mol/g/ms}$ ) em plantas de *T. pulchra* retiradas quinzenalmente (15 a 90 dias) dos diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão, durante as exposições realizadas nas fases pré-UTE e de transição. Na tabela, letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam,

respectivamente, diferença estatística entre os locais e entre quinzenas em cada local, na mesma exposição.

A concentração de glutathiona total, na Fase Pré-UTE, foi maior nas plantas expostas no Centro e CM5, na 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> exposições, respectivamente. Na fase de transição, não houve variação espacial comprovada estatisticamente, mas verificou-se pico de concentração aos 45 dias de exposição, especialmente em CM1 e CM5 (Figura 18).



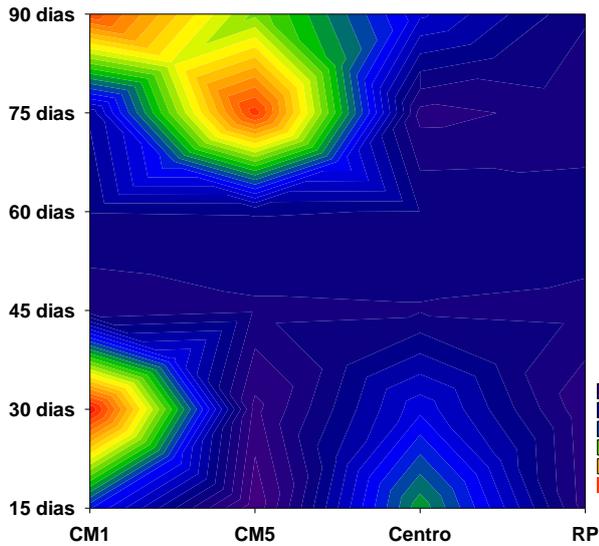
Fase	Locais	15	30	45	60	75	90	Fase	Locais	15	30	45	60	75	90
<b>pré-UTE</b>								<b>Transição</b>							
<b>2ª Expo</b>	CM1 (B)	5,35 a	17,12 a	14,40 a	5,81 a	4,83 a	4,75 a	<b>6ª Expo</b>	CM1 (A)	3,61 b	12,49 b	8,45 a	5,65 b	9,67 b	7,71 b
	CM5 (B)	6,00 a	15,74 a	16,90 a	7,49 a	5,50 a	3,24 a		CM5 (A)	5,61 b	5,74 b	5,82 a	8,69 b	5,47 b	5,99 b
	Centro (A)	4,37 a	14,14 a	10,48 a	3,80 a	5,58 a	3,50 a		Centro (A)	3,64 b	8,25 b	8,70 a	8,15 b	4,93 b	7,45 b
	RP (B)	2,56 a	16,85 a	12,57 a	6,26 a	5,20 a	4,43 a		RP (A)	5,55 b	9,32 b	7,71 a	9,90 b	6,31 b	3,84 b
<b>4ª Expo</b>	CM1 (B)	11,62 a	16,06 a	9,85 a	8,45 a	8,65 a	10,47 a	<b>8ª Expo</b>	CM1 (A)	3,05 b	8,76 b	8,07 a	3,16 b	4,17 b	3,74 b
	CM5 (A)	8,61 a	14,80 a	12,00 a	7,15 a	12,44 a	5,07 a		CM5 (A)	3,17 b	9,36 b	11,49 a	4,64 b	3,98 b	5,80 b
	Centro (B)	10,62 a	13,44 a	8,03 a	29,40 a	6,80 a	14,63 a		Centro (A)	4,78 b	8,37 b	4,91 a	5,38 b	8,17 b	11,64 b
	RP (B)	9,27 a	16,80a	6,74 a	7,96 a	3,32 a	6,61 a		RP (A)	3,46 b	3,50 b	2,87 a	3,57 b	3,86 b	4,09 b

Figura 18: Concentração média da glutathiona total ( $\mu\text{mol/g/ms}$ ) em plantas de *T. pulchra* retiradas quinzenalmente (15 a 90 dias) dos diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão, durante as exposições realizadas nas fases pré-UTE e

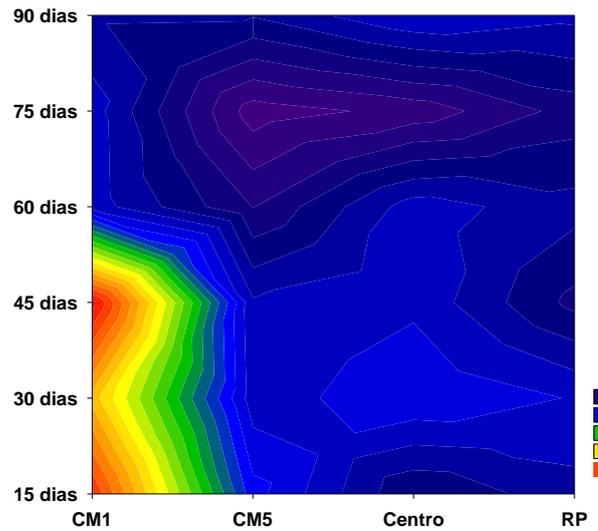
de transição. Na tabela, letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam, respectivamente, diferença estatística entre os locais e entre quinzenas em cada local, na mesma exposição.

Em geral, na Fase Pré-UTE, o acúmulo de MDA foi estatisticamente menor nas plantas do Rio Pilões. Os maiores valores de acúmulo ocorreram no CM1 e CM5. Ao contrário, no 6º período de amostragem, realizado na transição, esse indicador da peroxidação lipídica apresentou-se em maiores níveis nas *T. pulchra* do local de referência. As oscilações temporais dentro de cada período de exposição não foram comprovadas estatisticamente (Figura 19).

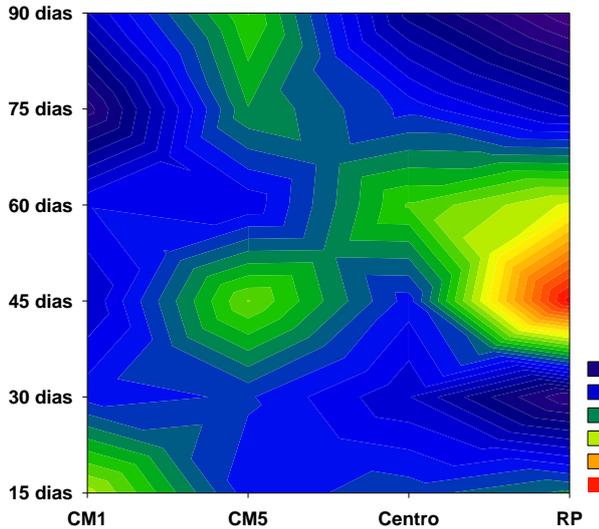
Malondialdeído - 2ª Exposição



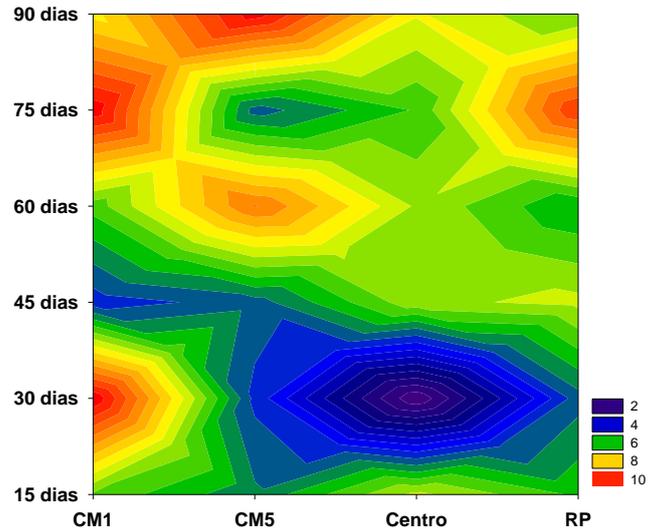
Malondialdeído - 4ª Exposição



Malondialdeído - 6ª Exposição



Malondialdeído - 8ª Exposição



Fase	Locais	15	30	45	60	75	90	Fase	Locais	15	30	45	60	75	90
<b>pré-UTE</b>								<b>Transição</b>							
<b>2ª Expo</b>	CM1 (B)	18,70 a	5,67 a	10,21 a	5,75 a	13,54 a	6,18 a	<b>6ª Expo</b>	CM1 (B)	8,20 a	7,96 a	7,31 a	13,02 a	14,06 a	17,52 a
	CM5 (B)	11,80 a	19,20 a	19,82 a	20,54 a	17,64 a	17,56 a		CM5 (B)	14,28 a	14,11 a	6,51 a	2,29 a	3,96 a	2,86 a
	Centro (B)	13,23 a	41,53 a	30,24 a	19,70 a	20,76 a	29,53 a		Centro (B)	28,64 a	28,64 a	7,41 a	55,78 a	37,54 a	12,29 a
	RP (A)	5,22 a	9,90 a	5,86 a	9,59 a	10,43 a	9,04 a		RP (A)	5,22 a	5,22 a	5,56 a	5,60 a	9,58 a	10,06 a
<b>4ª Expo</b>	CM1 (B)	18,30 a	11,04 a	3,67 a	9,92 a	8,23 a	14,32 a	<b>8ª Expo</b>	CM1 (A)	5,90 a	6,61 a	6,80 a	7,83 a	7,84 a	7,04 a
	CM5 (B)	17,56 a	14,31 a	15,59 a	18,81 a	16,84 a	18,19 a		CM5 (A)	6,31 a	6,70 a	7,30 a	12,26 a	9,45 a	16,50 a
	Centro (B)	21,18 a	22,92 a	28,95 a	31,44 a	32,56 a	31,88 a		Centro (A)	45,40 a	19,30 a	7,08 a	13,69 a	25,29 a	23,77 a
	RP (A)	6,28 a	10,35 a	7,31 a	7,48 a	5,18 a	4,78 a		RP (A)	5,49 a	6,14 a	4,57 a	7,50 a	5,00 a	4,80 a

Figura 19: Acúmulo médio do malondialdeído (mMol/g/mf) em plantas de *T. pulchra* retiradas quinzenalmente (15 a 90 dias) dos diferentes locais no entorno da refinaria de petróleo de Cubatão, durante as exposições realizadas nas fases pré-UTE e de transição.

Na tabela, letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam, respectivamente, diferença estatística entre os locais e mesma exposição.

### **c) Análise multivariada**

Na tabela 2, sintetizaram-se os resultados das análises multivariadas, realizadas com o intuito de identificar quais variáveis abióticas explicariam significativamente o perfil temporal dos indicadores do estado redox e de danos oxidativos nas plantas expostas no local Centro, ao longo de todo o período experimental. Incluíram-se na tabela os coeficientes de explicabilidade ( $R^2$ ), as variáveis que significativamente contribuíram para explicar (positivamente ou negativamente) as oscilações ao longo do tempo no nível de cada indicador biológico e os níveis de significância (valores de  $p$ ) para os modelos lineares propostos.

Todos os modelos propostos foram altamente explicativos ( $p < 0,001$ ), apesar dos valores de  $R^2$  terem sido baixos, o que era esperado em função do grande número de resultados incluídos nas análises. Os modelos mais explicativos foram obtidos para ácido ascórbico reduzido ( $R^2 = 0,363$ ) e total ( $R^2 = 0,286$ ) e para ascorbato peroxidase ( $R^2 = 0,289$ ) e os menos explicativos para as enzimas catalase e glutatona redutase ( $R^2 = 0,096$  e  $0,083$ , respectivamente). As análises multivariadas indicaram, ainda, que os perfis temporais dos indicadores biológicos foram explicados de forma combinada por variações nas condições climáticas e/ou nos níveis de contaminação atmosférica por poluentes gasosos e particulados.

As concentrações foliares de ácido ascórbico reduzido e total foram explicadas somente por variações nos níveis dos poluentes atmosféricos:  $\text{NO}_2$ ,  $\text{SO}_2$  e  $\text{MP}_{10}$  influenciaram positivamente e  $\text{O}_3$  negativamente a concentração de ambas as formas do AA.

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram influenciados positivamente por  $\text{NO}_2$  e  $\text{MP}_{10}$  e da glutathiona total variou positivamente em função de  $\text{NO}_2$ ,  $\text{O}_3$  e  $\text{MP}_{10}$ . Além disso, ambas as formas de glutathiona aumentaram na medida em que a umidade relativa do ar (UR%) diminuiu.

A atividade das quatro enzimas mensuradas foi afetada positivamente pela umidade relativa do ar e as atividades da catalase e superóxido dismutase aumentaram em resposta a reduções na temperatura do ar. Além disso, maiores níveis de  $\text{SO}_2$  na atmosfera resultaram em aumento da atividade da CAT e APX. Aumentos de  $\text{NO}_2$  atmosféricos levaram à redução da atividade de GR e APX e aumento da SOD. Ozônio também contribuiu para explicar a variação nas atividades de APX e SOD. Material particulado apenas afetou (negativamente) o funcionamento da SOD.

Finalmente, a peroxidação lipídica (indicada pela concentração foliar de MDA) aumentou na medida em que a temperatura do ar e os níveis atmosféricos de  $\text{O}_3$  e  $\text{MP}_{10}$  aumentaram e a concentração de  $\text{NO}_2$  diminuiu.

Tabela 2: Resultado das análises lineares multivariadas entre as variações nos indicadores de defesa antioxidativa e de danos oxidativos em plantas de *T. pulchra* e em variáveis ambientais monitoradas no Centro de Cubatão.

<b>Variáveis Dependentes</b>	<b>Variáveis Independentes Significativas</b>	<b>Coefficientes</b>	<b>P</b>	<b>Constante e R<sup>2</sup></b>
<b>Log<sub>10</sub>AsA</b>	NO <sub>2</sub>	0,00925	< 0,001	Cte = - 0,181
	O <sub>3</sub>	-0,0113	< 0,001	
	SO <sub>2</sub>	0,00541	< 0,001	R <sup>2</sup> = 0,363
	MP <sub>10</sub>	0,0139	< 0,001	( <i>p</i> < 0,001)
<b>Log<sub>10</sub>AA total</b>	NO <sub>2</sub>	0,00658	< 0,001	Cte = 0,284
	O <sub>3</sub>	-0,00872	< 0,001	
	SO <sub>2</sub>	0,0029	0,005	R <sup>2</sup> = 0,286
	MP <sub>10</sub>	0,00892	< 0,001	<i>p</i> < 0,001
<b>LnGSH reduzida</b>	U.R.	-0,0138	0,033	Cte = 1,287
	O <sub>3</sub>	0,00676	0,018	R <sup>2</sup> = 0,113
	MP <sub>10</sub>	0,0209	< 0,001	<i>p</i> < 0,001
<b>Log<sub>10</sub>GSH total</b>	U.R.	-0,0067	0,022	Cte = 0,778
	NO <sub>2</sub>	0,00937	< 0,001	
	O <sub>3</sub>	0,00571	< 0,001	R <sup>2</sup> = 0,234
	MP <sub>10</sub>	0,00519	0,0036	<i>p</i> < 0,001
<b>Ordenação CAT</b>	T	-5,388	< 0,001	Cte = - 86,792
	U.R.	1,811	0,016	R <sup>2</sup> = 0,096
	SO <sub>2</sub>	1,67	0,027	<i>p</i> < 0,001
<b>Ordenação GR</b>	U.R.	2,699	< 0,001	Cte = 58,851
	NO <sub>2</sub>	-1,04	0,017	R <sup>2</sup> = 0,083 <i>p</i> < 0,001
<b>Log<sub>10</sub>APX</b>	U.R.	0,0208	< 0,001	Cte = 1,08
	NO <sub>2</sub>	-0,0063	0,011	
	O <sub>3</sub>	0,00802	0,048	R <sup>2</sup> = 0,289
	SO <sub>2</sub>	0,0128	< 0,001	<i>p</i> < 0,001
<b>Log<sub>10</sub>SOD</b>	T	-0,0466	< 0,001	Cte = - 0,114
	U.R.	0,0103	0,003	
	NO <sub>2</sub>	0,059	0,012	
	O <sub>3</sub>	-0,00296	0,0048	R <sup>2</sup> = 0,203
	MP <sub>10</sub>	-0,0109	< 0,001	<i>p</i> < 0,001
<b>Log<sub>10</sub>MDA</b>	T	0,0209	0,005	Cte = - 0,065
	NO <sub>2</sub>	-0,0108	< 0,001	
	O <sub>3</sub>	0,005	< 0,001	R <sup>2</sup> = 0,214
	MP <sub>10</sub>	0,0214	< 0,001	<i>p</i> < 0,001

Como houve somente monitoramento das variáveis abióticas no Centro, visouse, através de análises de correlação de Pearson, verificar se o perfil temporal dos componentes do sistema antioxidativo de *T. pulchra* analisados no Centro coincidiam com os encontrados nos outros locais de exposição: CM1, CM5 e RP (Tabela 3). Em caso positivo, os modelos lineares multivariados seriam aplicáveis às demais áreas.

Os perfis temporais da concentração de ácido ascórbico, glutatona e catalase nas plantas expostas no Centro se correlacionaram positivamente e significativamente com os obtidos nas plantas dos outros dois locais considerados poluídos (CM1 e CM5). Para APX, somente houve correlação positiva similar entre dados obtidos no Centro e no CM5. As oscilações no nível foliar de glutatona reduzida e total e na atividade de GR nas plantas do Centro também foram correlacionadas positivamente com as medidas nas plantas expostas no RP.

Tabela 2: Coeficientes de Correlação de Pearson (R) entre componentes do sistema antioxidativo de plantas de *T. pulchra* expostas no Centro e nos demais locais de exposição. Correlações significativas são destacadas em negrito.

Variáveis	CENTRO <i>versus</i>		
	CM1	CM5	RP
AsA	<b>0,67</b>	<b>0,59</b>	0,16
AA total	<b>0,64</b>	<b>0,73</b>	0,24
GSH reduzida	<b>0,72</b>	<b>0,60</b>	<b>0,76</b>
GSH total	<b>0,71</b>	<b>0,60</b>	<b>0,70</b>
CAT	<b>0,62</b>	<b>0,67</b>	0,30
GR	0,11	0,23	<b>0,50</b>
APX	0,12	<b>0,58</b>	0,27
SOD	0,39	0,44	0,38
MDA	0,23	0,21	0,24

#### d) Análise descritiva após implementação integral da UTE

Os gráficos a seguir (Figuras 20 a 23) apresentam as médias das retiradas de *T. pulchra* ocorrida 45 e 90 dias após o início de todas as 11 exposições realizadas no CM1, Centro e RP, que abrangeram as 3 fases distintas de funcionamento da UTE, nos parâmetros de catalase, ascorbato peroxidase, ácido ascórbico e glutathiona em suas formas totais e reduzidas e conteúdo de malondialdeído.

Os conteúdos de ácido ascórbico reduzido e total, glutathiona reduzida e malondialdeído mostraram-se maiores nas plantas do Centro e CM1 e, algumas vezes também do RP, durante a 9<sup>a</sup> exposição, que corresponde à fase de operação exclusiva da

nova termoelétrica. Além disso, concentrações intermediárias desses indicadores passaram a ser observadas a partir da 4ª exposição, quando a UTE já funcionava.

As enzimas – catalase e ascorbato peroxidase – apresentaram os menores índices a partir da 8ª e 9ª exposições respectivamente, realizadas na fase pós-operação da nova termoelétrica (Figura 20). O pico de atividade da catalase ocorreu nas plantas expostas no Centro, durante o 6º período experimental e da ascorbato peroxidase nas plantas do CM1 e Centro, durante as exposições 4 a 6.

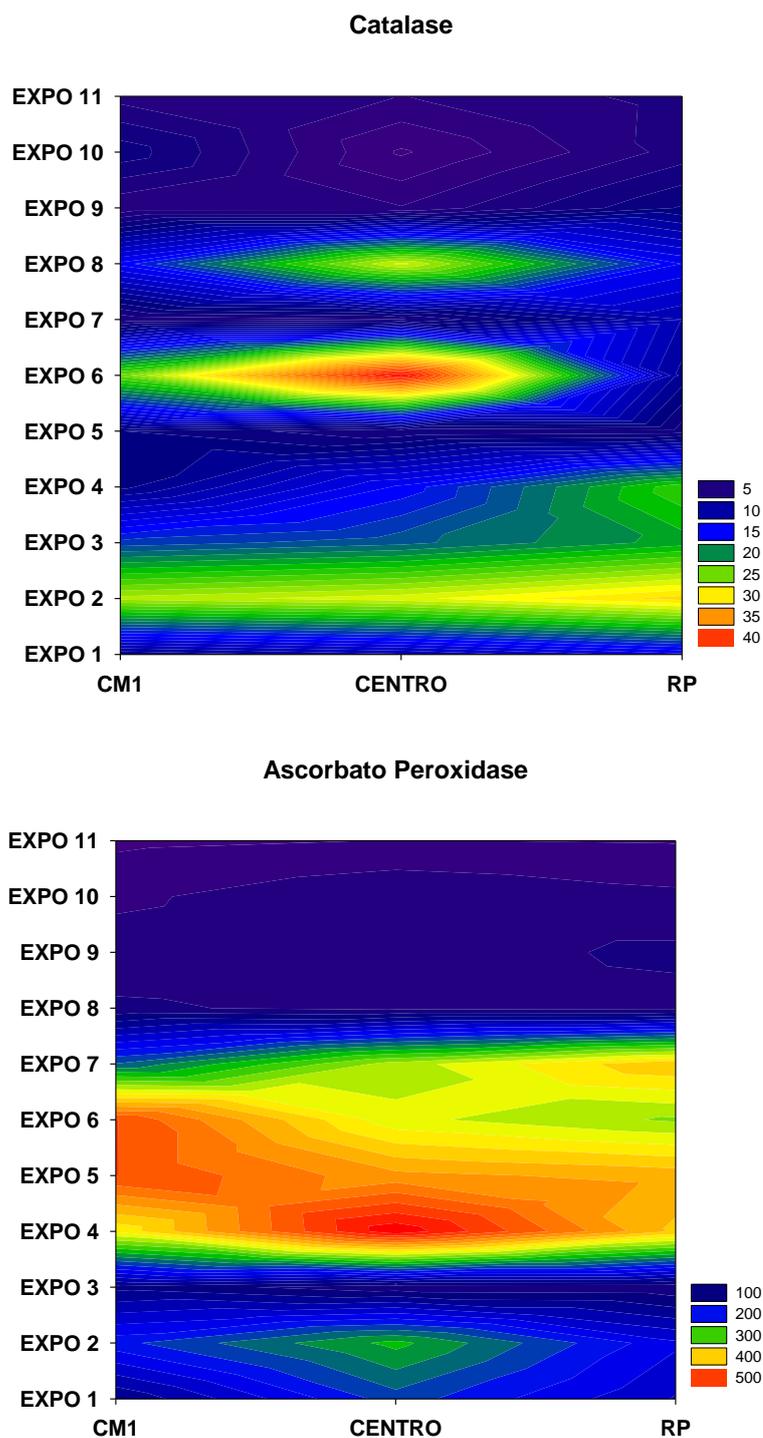


Figura 20: Valores médios da atividade enzimática da catalase e ascorbato peroxidase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ ) em plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4), de Transição (expo 5 a 8) e Pós-UTE (expo 9 a 11) no CM1, Centro e RP. As médias foram calculadas com dados obtidos após 90 dias de cada período de exposição.

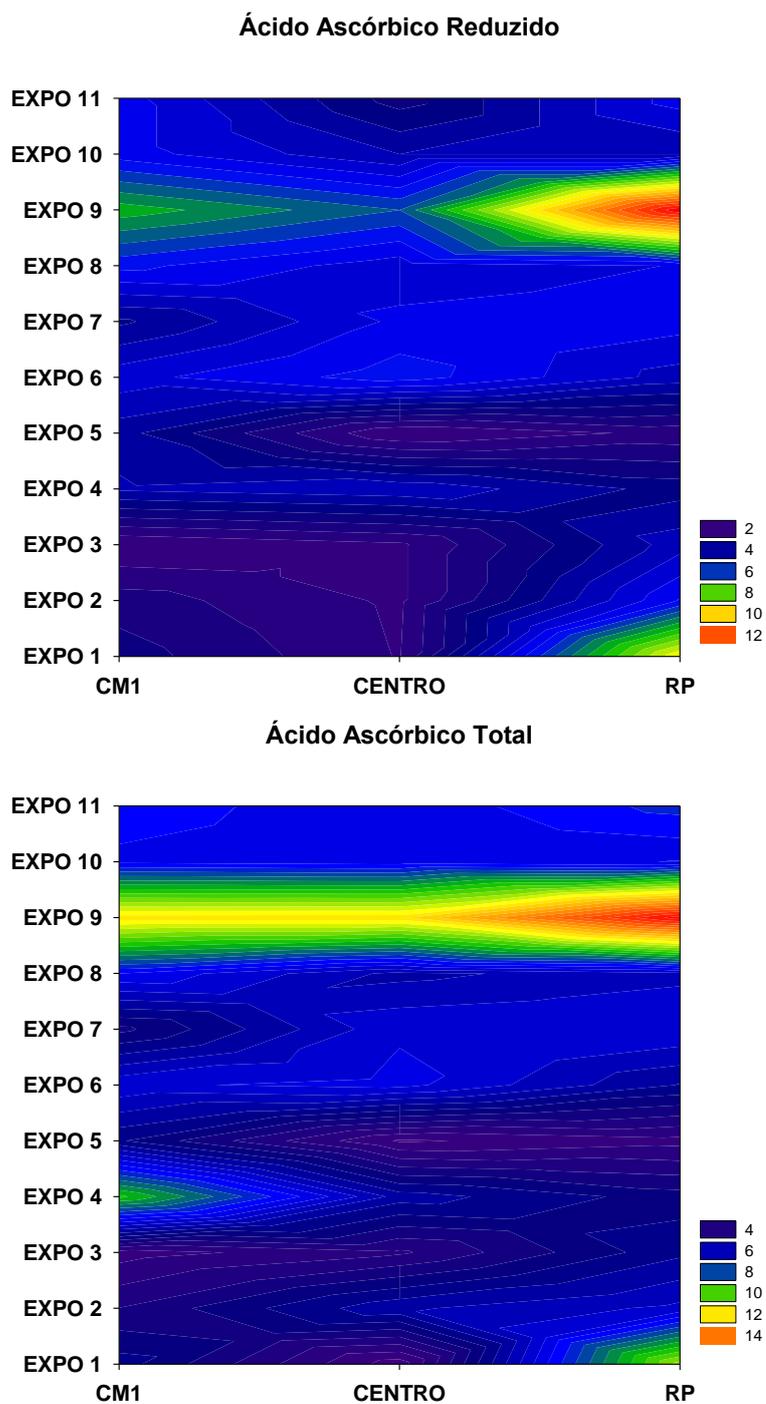


Figura 20: Valores médios da concentração do ácido ascórbico reduzido e total (mg/g/ms) em plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4), de Transição (expo 5 a 8) e Pós-UTE (expo 9 a 11) no CM1, Centro e RP. As médias foram calculadas com dados obtidos após 90 dias de cada período de exposição.

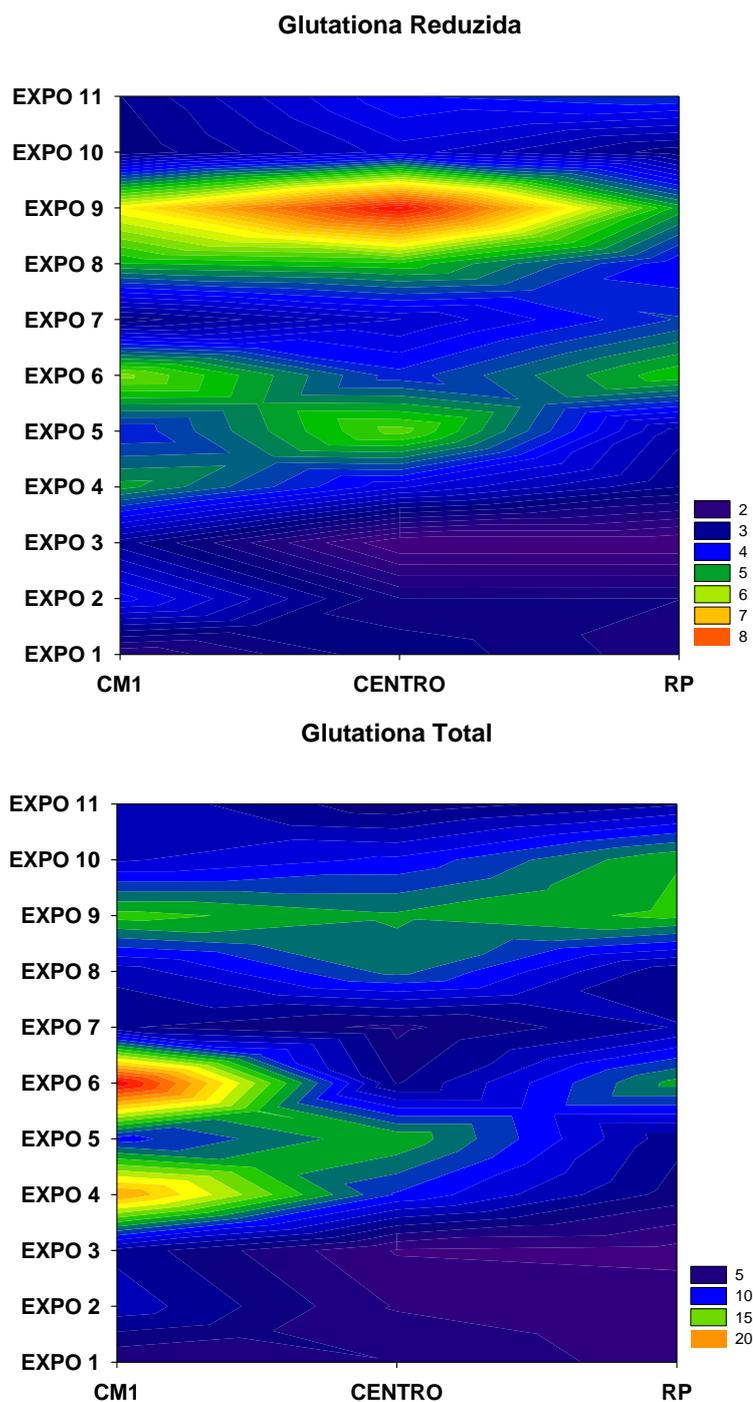


Figura 22: Valores médios da concentração de glutathiona reduzida e total ( $\mu\text{mol/g/ms}$ ) em plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4), de Transição (expo 5 a 8) e Pós-UTE (expo 9 a 11) no CM1, Centro e RP. As médias foram calculadas com dados obtidos após 90 dias de cada período de exposição.

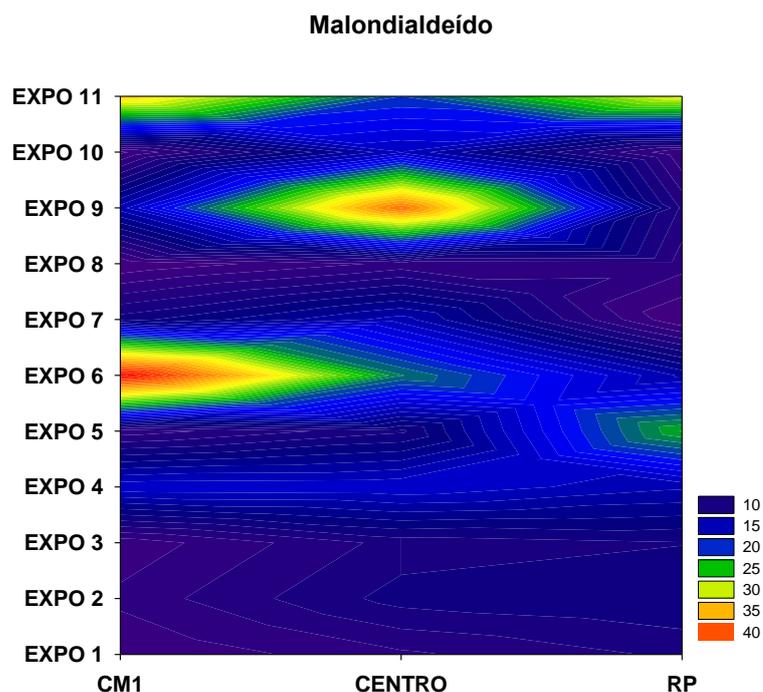


Figura 23: Valores médios do acúmulo de malondialdeído (mMol/g/mf) em plantas de *T. pulchra* expostas durante as fases Pré-UTE (expo 1 a 4), de Transição (expo 5 a 8) e Pós-UTE (expo 9 a 11) no CM1, Centro e RP. As médias foram calculadas com dados obtidos após 90 dias de cada período de exposição.

## Discussão

De acordo com a estatística descritiva mostrada nos gráficos de contorno, os antioxidantes e o indicador de estresse oxidativo (acúmulo de MDA) variaram entre locais e entre as exposições. Em geral, a variação temporal dentro da mesma exposição foi menos evidente.

Durante a Fase Pré-UTE e a Fase de Transição, a atividade da catalase foi similar ao longo dos 90 dias em que as plantas eram mantidas nos locais de estudo (dados não mostrados). Desse modo, a ascorbato peroxidase pareceu preponderar no papel de combater as espécies reativas de oxigênio geradas, resultando na decomposição do  $H_2O_2$  no ciclo ascorbato-glutationa nas plantas de *T. pulchra* expostas sob condições de poluição atmosférica, que também poderia ser realizado pela catalase.

Ácido ascórbico e glutathione mostraram ser, talvez, os indicadores chaves para a manutenção da tolerância de *T. pulchra* contra danos causados pelo estresse oxidativo provocado pela mudança no perfil de contaminação atmosférica, detectada a partir do início da troca do sistema de geração de energia da refinaria de petróleo. Não exatamente por suas concentrações totais, que não indicam necessariamente o estado redox da planta, ou mesmo seu desempenho como bioindicadora de poluentes atmosféricos, pois a característica antioxidante destas substâncias é atribuída especialmente a sua forma reduzida (Burkey *et al.* 2006). Assim, o aumento da tolerância das plantas de *T. pulchra* ao estresse oxidativo se deveu ao fato das formas reduzidas de ambas as substâncias representarem uma alta proporção de suas concentrações totais nestas plantas. Esse fato pode explicar porque os modelos lineares propostos para ácido ascórbico e glutathione totais tenham sido similares aos encontrados para as formas reduzidas. Ainda, a predominância das formas reduzidas de ambos os antioxidantes nas plantas parece ter sido uma condição essencial para a ativação da ascorbato peroxidase nas plantas que estiveram expostas ao gradiente crescente de estresse oxidativo, já que esta enzima utiliza o ácido ascórbico reduzido como substrato para decompor o  $H_2O_2$  em água, e a glutathione reduzida é utilizada como co-substrato para redução do  $H_2O_2$ .

Através do uso da estatística multivariada, procurando relacionar fatores ambientais – clima e poluentes – com as variações nas respostas antioxidativas nas plantas do Centro de Cubatão, verificou-se que o ácido ascórbico e a glutathione relacionaram-se principalmente com os poluentes. Já as enzimas – catalase, glutathione reductase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase – e o indicador de dano oxidativo em nível celular – acúmulo de malondialdeído – também se relacionaram com os poluentes, porém, adicionalmente, aos parâmetros de temperatura e umidade relativa do

ar. Embora a explicabilidade ( $R^2$ ) da análise multivariada não tenha sido alta para nenhuma variável dependente, possivelmente devido à alta diversidade de resultados esperada para plantas não selecionadas geneticamente, os modelos lineares encontrados foram todos altamente significativos, alcançando-se as maiores explicabilidades para o ácido ascórbico reduzido, ascorbato peroxidase e glutathione total. Esse resultado também reforça que a alta capacidade antioxidativa das plantas jovens de *T. pulchra* expostas na região de estudo é conferida por tais antioxidantes.

A interferência da temperatura, umidade relativa e radiação solar sobre o estado redox das plantas expostas sob condições ambientais do local de estudo não deve ser subestimada. Esses fatores podem estar associados também à formação de espécies reativas de oxigênio durante a fotossíntese ou podem ser os fatores que impõem o estresse oxidativo às plantas (Gara *et al.* 2010, Miller *et al.* 2010). Também é importante mencionar que as mesmas variáveis climáticas interferem sobre a condutância estomática, regulando o fluxo de  $CO_2$  para as plantas. Conseqüentemente, a absorção de determinado poluente pela planta também é afetada por estas variáveis desde o caminho primário de entrada de tais poluentes, através dos estômatos (Krupa *et al.* 1995).

A análise multivariada revelou, ainda, que a mudança linear no perfil dos antioxidantes, coincidente com a mudança no perfil de contaminação atmosférica, ocorreu em paralelo ao cronograma de mudança na forma de gerar energia e vapor na refinaria de petróleo. Logo, pode-se supor que houve associação entre a mudança tecnológica naquela empresa e alteração do potencial oxidativo da atmosfera. Desse modo, *T. pulchra* mostrou-se eficiente como espécie bioindicadora. Por exemplo, na Fase de Transição – que abrangeu as exposições 5, 6, 7 e 8 - foram observados os

maiores índices de poluentes atmosféricos e também aumento da atividade antioxidativa nas plantas de *T. pulchra*.

Tendo em vista que houve relação negativa entre os níveis de O<sub>3</sub> atmosférico e concentrações foliares de ácido ascórbico (reduzido e total) e positiva entre esse poluentes e atividade da ascorbato peroxidase nas plantas expostas na área de influência da UTE, pode-se supor que as EROs formadas a partir da absorção do O<sub>3</sub> podem reduzir a capacidade redox dessa molécula. Porém, o conteúdo de glutathione (reduzida e total), ao ser aumentado em resposta a aumento nos níveis de O<sub>3</sub>, como aponta a regressão multivariada, pode compensar a redução do estado redox do ácido ascórbico em plantas de *T. pulchra*.

Na Fase Pós-UTE, quando a nova termoelétrica estava gerando toda energia e vapor para a refinaria, se esperava a diminuição da concentração de poluentes com potencial oxidativo. De fato, as concentrações de SO<sub>2</sub> foram diminuindo gradativamente ao longo do processo de troca do sistema, confirmando a hipótese inicial de melhoria da qualidade do ar. Mas, os níveis de NO, NO<sub>2</sub> e MP<sub>10</sub> não tiveram redução similar. Além disso, os níveis atmosféricos de O<sub>3</sub> estavam mais baixos nos últimos períodos de experimentos do que foi observado na Fase de Transição. Permanece a dúvida se essa redução de O<sub>3</sub> é devido a condições atmosféricas menos favoráveis à sua formação, dado que a concentração de NO tendeu a aumentar na última fase experimental, ou se houve redução na emissão de compostos orgânicos precursores do O<sub>3</sub>. De qualquer maneira, nessa última fase, apesar das enzimas catalase e ascorbato peroxidase estarem menos ativas, novamente, houve aumento do ácido ascórbico e da glutathione, indicando que o poder oxidativo da atmosfera não havia diminuído. Assim, a redução da atividade da ascorbato peroxidase e catalase e acúmulo de ácido ascórbico e glutathione nas plantas de *T. pulchra* nessa última fase poderia ser relacionada ao combate ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em prol da

manutenção do balanço no ciclo ascorbato-glutationa, mecanismo esperado para plantas tolerantes.

Além disso, considerando que os perfis temporais da concentração de ácido ascórbico, glutaciona, ascorbato peroxidase e catalase nas plantas expostas no Centro se correlacionaram positivamente e significativamente com os obtidos nas plantas dos outros locais poluídos (CM1 e/ou CM5), pode-se inferir que também houve aumento do potencial oxidativo da atmosfera nas proximidades das encostas da Serra do Mar recobertas pela floresta Atlântica, a partir do início de funcionamento da usina termoelétrica movida a gás natural.

De fato, os gráficos de contorno, que resumem os resultados obtidos nos 11 períodos de exposição, parecem confirmar a tendência geral de intensificação desse poder oxidativo da atmosfera a partir do início da Fase de Transição, que se manteve mesmo após do desligamento integral das caldeiras movidas a óleo combustível. Essa sequência temporal foi acompanhada por respostas indicadoras de aumento de tolerância ao estresse oxidativo das plantas de *T. pulchra* expostas no entorno daquele empreendimento. Entre as modificações no sistema de defesas antioxidativas, destacam-se: redução da atividade da catalase a partir do 8<sup>a</sup> período experimental (incluído na Fase Pós-UTE), pico da atividade da ascorbato peroxidase nas exposições 4 a 6 (Fase de Transição) e aumento dos níveis foliares de ácido ascórbico e de glutaciona a partir da 6<sup>a</sup> exposição. Essas mudanças no perfil temporal dos antioxidantes pareceram ocorrer nos 3 locais, porém com maior frequência no CM1 e Centro.

Porém, o conteúdo de MDA, indicador de danos oxidativos às membranas celulares, também aumentou a partir da 4<sup>a</sup> ou 5<sup>a</sup> exposições (Fase de Transição), de forma que o equilíbrio pró oxidante-antioxidante, conforme definido por Jaleel *et al.* (2009) pode não ter sido alcançado nas plantas jovens de *T. pulchra* utilizadas nos

experimentos. Resta saber se os danos oxidativos detectados nas membranas celulares foram projetados para os níveis superiores da organização biológica. De acordo com Silva (2012), que desenvolveu seu estudo paralelamente a este, as trocas gasosas não foram reduzidas significativamente ao longo das 8 primeiras exposições, mas houve mudanças na alocação de biomassa entre raízes e parte aérea da plantas. A autora observou proporcionalmente menor biomassa de raízes, em comparação com a biomassa da parte aérea, que é uma resposta indicadora de toxicidade geralmente verificada em árvores que crescem em ambientes poluídos ou de aumento de produtividade, em plantas que crescem em ambientes enriquecidos por nutrientes como o nitrogênio, por exemplo. Naquela região estudada, ambas as hipóteses seriam viáveis e deveriam ser melhor analisadas.

## **Conclusões**

Houve a tendência de variação nos níveis de antioxidantes ao longo dos 11 períodos de exposição de *T. pulchra*, abrangendo todo o período de troca do sistema de produção de energia pela refinaria de petróleo (Fase Pré-UTE, Fase de Transição e Fase Pós-UTE, quando ocorreu a implementação integral), em resposta ao aumento da concentração de poluentes atmosféricos com poder oxidativo (NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub>). As variações climáticas também não podem deixar de se consideradas, pois foi mostrado que afetam e se correlacionam com a atividade antioxidativa de *T. pulchra* e também interferem na formação de poluentes atmosféricos.

Os antioxidantes não-enzimáticos, ácido ascórbico e glutathiona, e a enzima ascorbato peroxidase foram essenciais para demonstrar o estado redox de *T. pulchra*.

Portanto, rejeitou-se a primeira hipótese de trabalho, já que não houve diminuição de riscos oxidativos impostos por compostos gasosos associados à troca do

sistema de geração de energia e vapor para a refinaria de petróleo, pelo menos na área de influência da RBPC. Porém, a segunda hipótese pode ser comprovada, visto que a mudança na qualidade do ar pôde ser dimensionada por meio de biomonitoramento com plantas jovens de *T. pulchra*, analisando-se indicadores de sua capacidade de oxidação-redução.

### Referências Bibliográficas

- Abuja, P.M. & Albertini, R.** 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 306: 1-17.
- Arndt, U. & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: *Biological monitoring. Signals from the environment*. Ellenberg et al. (eds.). Vieweg, Eschborn, pp. 199 – 298.
- Asada, K.** 1984. Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol.* 105: 422 – 429.
- Booker, F.L., Burkey, K.O., Jones, A.L.** 2012. Re-evaluating the role of ascorbic acid and phenolic glycosides in ozone scavenging in the leaf apoplast of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant, Cell & Environment* 35: 1456-1466.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 71: 248 – 254.
- Buege, J.A. & Aust, S.D.** 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
- Bulbovas, P., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C., Domingos, M.** 2005. Variação sazonal em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 28 (4).
- 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.** 2011. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2010. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. P.309.
- Divan, J.A.M., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J.** 2007. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chroris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colonião. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 247-253.
- Domingos, M.; Klumpp, A. & Klumpp, G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230 – 236.
- Furlan, C.M., Salatino, A., Domingos, M.** 2004. Influence of air pollution on leaf chemistry, herbivore feeding and gall frequency on *Tibouchina pulchra* leaves in Cubatão (Brazil). *Biochemical Systematics and Ecology* 32, 253 – 263.
- Gara, L. Locato, V., Dipierro, S., De Pinto, S.C.** 2010. Redox homeostasis in plants: the challenge of living with endogenous oxygen production. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 173: 13 – 19.
- Heath, R.L. & Packer, L.** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochemistry Biophysic* 125: 189-198.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Jaburi, H.J., Somasundaram, R., Panneerselvam, R.** 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 100 – 105.
- Israr, M.; Sahi, S.; Datta, R.; Sarkar, D.** 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere.* 65: 591 – 598.
- Klumpp, A., Klumpp, G., Domingos, M.** 1994. Plants as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85: 109 – 116.
- Klumpp, A., Klumpp, G. & Domingos, M.** 1996a. Bio-indication of air pollution in the tropics. The active monitoring programme near Cubatão, Brazil. *Gefahrstoffe Reinhaltung Der Luft* 56: 27-31.
- Klumpp, A., Klumpp, G., Domingos, M. & Silva, M.D.** 1996b. Fluoride impact on native tree species of the Atlantic Forest near Cubatão. *Water, Air, and Soil Pollution* 87: 57-71.

- Klumpp, G., Furlan, C. M., Domingos, M., Klumpp, A.** 2000. Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Science of Total Environment* 246, 79 – 91.
- Kraus, T.E.; Evans, R.C.; Fletcher, R.A.; Paul, S.K.P.** 1995. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Canadian Journal Botany* 73(6): 797-806.
- Krupa, S.V.; Grunhage, L.; Janger, H.J.; Nosal, M.; Manning, W.J.; Legge, A.H.; Hanewald, K.** 1995. Ambient ozone and adverse crop response: a unified view of cause and effect. *Environmental Pollution*. 87: 119 – 126.
- Leitão-Filho, H.F., Pagano, S.N., Cesar, O., Timoni, J.L., Rueda, J.J.** 1993. *Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão (SP)*. EDUNESP/EDUNICAMP, São Paulo.
- Lopez, 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*. 11: 199 – 204.
- Mazzoni-Viveiros, S. & Trufem, S.F.B.** 2004. Efeitos da poluição aérea e edáfica no sistema radicular de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) em área de Mata Atlântica: associações micorrízicas e morfologia. *Revista Brasileira de Botânica* 27 (2): 337-348.
- Miller, C., Suzuki, N., Ciftici-Yilmaz, S., Mittler, R.** 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* 33: 405-410.
- Moraes, R.M., Delitti, W.B.C., Moraes, A.P.V.** 2000. Fotossíntese líquida e crescimento de *Tibouchina pulchra* Cogn. nas proximidades de indústrias petroquímicas em Cubatão, SP. *Hoehnea* 27 (1): 77-85, 4 tab.
- Perry, C.T., Jr, A.M.D., Rodriguez, M.T.R., Atz, V.L.** 2010. *Psidium guajava* as a bioaccumulator of nickel around an oil refinery, southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 647 - 654.
- Ramachandra R., 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.

- Reddy, A.R.; Chaitanya, K.V.; Jutur, P.P.; Sumithra, K.** 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 52: 33 – 42.
- SAS/Insight User's Guide, Version 8.** 1999. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA. 752 pp.
- Silva, D.T.** 2012. Respostas fisiológicas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. expostos à contaminação atmosférica no entorno de uma refinaria de petróleo em Cubatão, SP. Dissertação de mestrado. 129 p.
- Song, H., Wang, Y.S., Sun, C.C., Wang, Y.T., Peng, Y.L., Cheng, H.** 2012. Effects of pyrene on antioxidant systems and lipid peroxidation level in mangrove plants, *Bruguiera gymnorrhiza*. *Ecotoxicology* 21: 1625 – 1632.

### **CAPÍTULO III**

#### **RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS DE PLANTAS DE *TIBOUCHINA PULCHRA* (CHAM). COGN. EXPOSTAS SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS**

## Resumo

O estudo contido neste capítulo foi desenvolvido em paralelo ao biomonitoramento realizado em condições de campo (tratado no capítulo II), e teve como objetivo verificar se o impacto dos poluentes atmosféricos observados na região de Cubatão é capaz de alterar os níveis de respostas antioxidativas de *T. pulchra*, conferindo maior tolerância à espécie ao estresse oxidativo. Desse modo, essa etapa foi realizada em condições de câmaras de topo aberto, com exposição de plantas ao ar filtrado e não filtrado, situadas próximas à área de influência da Refinaria Presidente Bernardes. Concomitantemente às exposições em câmaras, plantas jovens da espécie *T. pulchra* foram mantidas no ambiente natural do local onde foram instaladas as câmaras, obedecendo ao mesmo protocolo proposto para a exposição em câmaras. Essa etapa experimental adicional visou estabelecer uma comparação entre as respostas das plantas nas câmaras e no ambiente externo e identificar possíveis efeitos do confinamento das plantas nas câmaras. Foram analisados os mesmos componentes do estado redox de *T. pulchra* analisados no estudo em campo: concentração de ácido ascórbico e glutathione, atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase e análise do conteúdo de malondialdeído. No estudo realizado em câmaras de topo aberto, a temperatura afetou a atividade de todos compostos enzimáticos. A relação positiva entre conteúdo de malondialdeído (MDA) e concentração de ozônio ( $O_3$ ) demonstrou que o poluente ocasionou a peroxidação lipídica nas plantas de *T. pulchra*. O aumento dos índices de  $NO_2$  e  $O_3$  levaram à redução da concentração de ácido ascórbico e aumento da concentração da glutathione e ascorbato peroxidase. Portanto, o impacto dos poluentes atmosféricos, nos níveis observados na região de Cubatão durante o período experimental, alterou os níveis de respostas antioxidativas de *T. pulchra*, aumentando sua capacidade de tolerar o estresse oxidativo. A concentração da glutathione, principalmente em sua forma reduzida, bem como as enzimas catalase e ascorbato peroxidase foram as principais defesas responsáveis por esse aumento de tolerância.

## Abstract

The study presented in this chapter was developed in parallel to the biomonitoring performed under field conditions (dealt with in chapter II), and aimed to verify whether the impact of the air pollutants observed in the region of Cubatão is able to alter the levels of antioxidative responses of *T. pulchra*, giving it greater tolerance against the oxidative stress. Thus, the study was performed under unfiltered and filtered air in open top chambers, installed close to the of influence area of the Oil Refinery Presidente Bernardes. The exposure of young plants of *T. pulchra* was also performed in the natural environment next to the open top chambers, following the same protocol applied for conducting the experiments inside chambers. This additional experimental step aimed to compare the plant responses inside the chambers and in the natural environment and to identify potential effects on the plants by confining them in the chambers. The same components of the redox state of *T. pulchra* previously measured in the field study were analyzed: ascorbic acid and glutathione concentration, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate and glutathione reductase enzymatic activity and malondialdehyde (MDA) content analysis. Temperature variations in the open top chambers affected the activity of all enzymatic compounds. The positive relationship between the contents of malondialdehyde (MDA) and ozone concentration ( $O_3$ ) showed that this pollutant caused lipid peroxidation in plants of *T. pulchra*. Increased levels of  $NO_2$  and  $O_3$  caused reductions of ascorbic acid concentration and increases levels of glutathione and ascorbate peroxidase activity. Therefore, the impact of air pollutants in the region of Cubatão, in the levels observed during the experimental period, changed the levels of antioxidative responses of *T. pulchra*, increasing its ability to tolerate the oxidative stress. The concentration of glutathione, mainly in its reduced form, and the enzymes catalase and ascorbate peroxidase were the main antioxidants responsible for this increased tolerance.

## **Introdução**

As principais fontes de emissão associadas à contaminação atmosférica são provenientes das indústrias e dos veículos automotores. O complexo industrial de Cubatão, local do presente estudo, possui 10 indústrias químicas e petroquímicas, 7 indústrias de fertilizantes e 1 de gesso, de cimento, de aço e fábrica de papel, além de aproximadamente uma centena de unidades menores, e um crescimento contínuo de sua frota automotiva. Na década de 80, um incêndio na Vila Socó (ocorrido em 1984) e o vazamento de amônia com evacuação da Vila Parisi (ocorrido em 1985) obrigaram as autoridades a adotar políticas públicas mais restritivas para emissão de poluentes, o que levou à redução na emissão dos mesmos (Possamai *et al.* 2010, Jasinski *et al.* 2011).

Portanto, a qualidade do ar em Cubatão é determinada, principalmente, por fontes industriais, caracterizando um problema totalmente diferente dos grandes centros urbanos. Esse fato é confirmado pelos baixos níveis registrados dos poluentes veiculares, como o monóxido de carbono. É importante ressaltar que as altas concentrações de poluentes em Cubatão são observadas, quase que exclusivamente, na área industrial, e que os níveis de concentração de alguns poluentes monitorados permanentemente na área central são semelhantes aos observados em alguns bairros da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP). Na área central, o único poluente que tem violado os padrões de qualidade do ar é o ozônio. A principal preocupação em Vila Parisi, na área industrial, são as altas concentrações de material particulado. Em 1984, o Plano de Prevenção de Episódios Agudos de Poluição do Ar foi implementado na área, observando-se em muitas ocasiões a declaração de estados de alerta e emergência. Os níveis caíram significativamente nos anos 80 e 90, mas ainda se mantém acima dos padrões de qualidade do ar. Ainda na Vila Parisi, os níveis de SO<sub>2</sub> se encontram abaixo dos padrões legais de qualidade do ar (CETESB 2011). Deve-se considerar, no entanto,

que a redução nas emissões de SO<sub>2</sub> é sempre desejável para diminuir o teor de sulfatos secundários, que contribuem para a formação de material particulado na região. Outra razão para se controlar as emissões de SO<sub>2</sub> é a proteção da vegetação da área, uma vez que estudos têm mostrado que curtas exposições a altas concentrações deste poluente podem causar danos à vegetação (Mesquita *et al.* 2011).

Atualmente, a região pode ser altamente impactada por emissão de poluentes provenientes de emissão veicular, devido à proximidade da Rodovia dos Imigrantes. Além disso, há também aumento da poluição oriunda da emissão veicular devido ao aumento de tráfego nas outras rodovias – Anchieta, Cônego Domênico Rangone e Manuel da Nóbrega – que ligam o planalto paulista ao litoral sul paulista.

Os danos à vegetação estiveram sob estudo da CETESB, que revelou que um dos mais importantes agentes fitotóxicos encontrados na região são os fluoretos, em suas formas sólidas e gasosas. As concentrações elevadas de material particulado, dos componentes do processo fotoquímico e dos teores de SO<sub>2</sub> também desempenham um papel auxiliar nos danos observados (Allen *et al.* 2009, CETESB 2011).

Conforme comentado no capítulo anterior, os compostos fotoquímicos resultantes das reações entre os constituintes celulares das plantas que crescem em ambientes poluídos e os gases poluentes dão origem às espécies reativas de oxigênio – EROs – nas células, que podem afetar moléculas vitais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, resultando no estresse oxidativo (Abuja & Albertini 2001, Gill & Tuteja 2010).

O estudo contido neste capítulo é paralelo ao biomonitoramento realizado em condições de campo (tratado no capítulo II), e teve como objetivo de verificar se o impacto dos poluentes atmosféricos observados na região de Cubatão é capaz de alterar os níveis de respostas antioxidativas de *T. pulchra*, conferindo maior tolerância à

espécie ao estresse oxidativo. Desse modo, essa etapa foi desenvolvida em condições de câmaras de topo aberto, com exposição de plantas ao ar filtrado e não filtrado. Concomitantemente às exposições em câmaras, plantas jovens da espécie foram mantidas no ambiente natural do local onde foram instaladas as câmaras, obedecendo ao mesmo protocolo proposto para a exposição em câmaras. Essa etapa experimental adicional visou estabelecer uma comparação entre as respostas das plantas nas câmaras e no ambiente externo e identificar possíveis efeitos do confinamento das plantas nas câmaras.

## **Materiais e Métodos**

### **a) Locais de estudo**

As câmaras de topo aberto foram instaladas no Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente da Poli – USP (CEPEMA), que também está situado na área de influência da refinaria e da UTE (Figura 1). O CEPEMA está localizado na base da Rodovia dos Imigrantes e é um local altamente impactado por poluentes provenientes de emissão veicular, como o  $\text{NO}_x$  e  $\text{MP}_{10}$  e eventualmente por  $\text{O}_3$ . No caso do material particulado emitido por fontes móveis, uma possível origem de contaminação poderia ser o desgaste de pneus e freios e a formação de aerossóis secundários provenientes de gases emitidos pelos veículos (CETESB 2011).

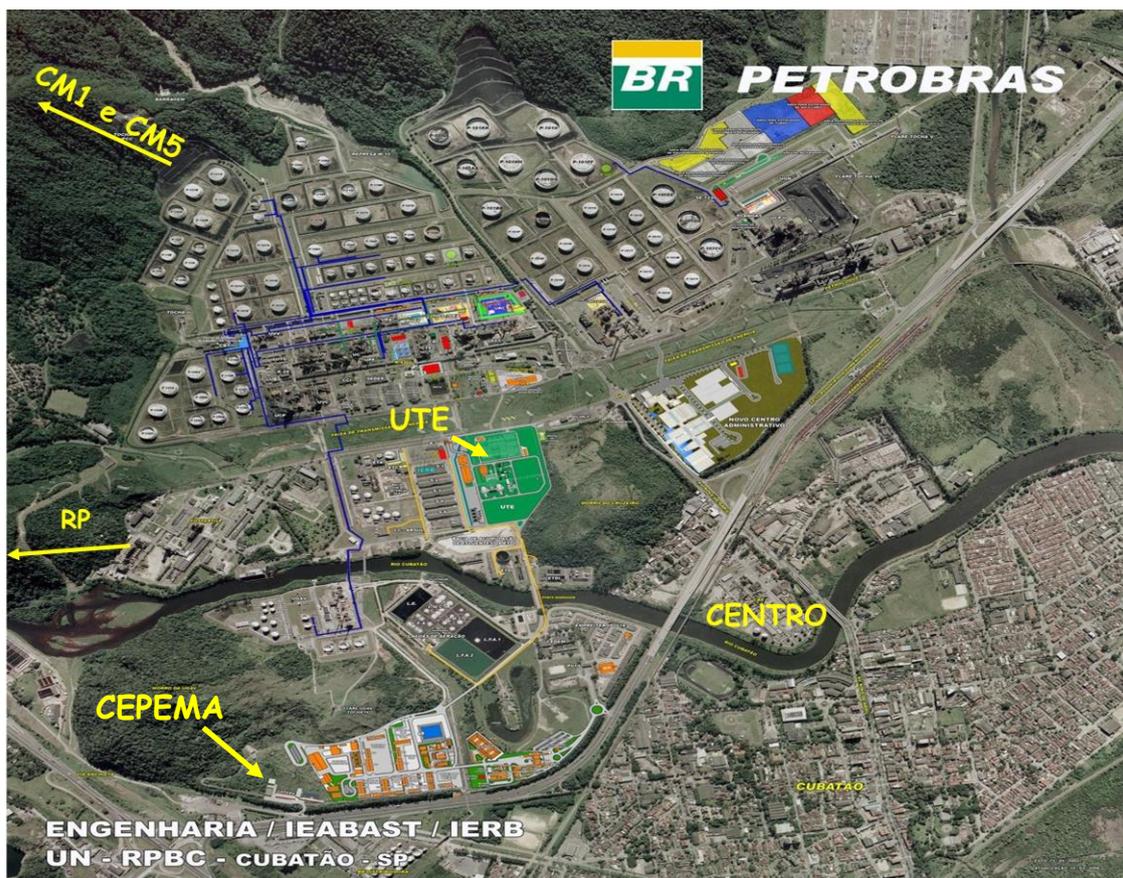


Figura 1: Localização dos pontos de exposição de plantas de *T. pulchra* no entorno da Refinaria Presidente Bernardes, com indicação do local de instalação da termoelétrica (UTE), dos pontos de exposição em campo (capítulo II) e do CEPEMA, local de implementação das câmaras de topo aberto no presente estudo.

Como o CEPEMA não estava entre os locais do estudo de campo, foi decidido ampliar a etapa dos estudos nas câmaras com exposições paralelas de plantas no ambiente externo daquele local. Assim, foi também delimitado o possível efeito de mudanças microclimáticas no interior das câmaras sobre as defesas antioxidativas das plantas de *T. pulchra*.

As câmaras de topo aberto utilizadas eram estruturas cilíndricas, com dimensão de 3,0 m de diâmetro e 2,2 m de altura. Foram constituídas por armações de aço inoxidável envoltas por filme de teflon, com capacidade de transmitir praticamente 100 % da radiação no comprimento de onda da radiação visível, além de permitir trocas

térmicas. Esse fato é de grande interesse por permitir que não haja dissipação e absorção da radiação incidente sobre as câmaras. A entrada e distribuição de ar no interior das câmaras ocorriam na base do cilindro, forçadas por meio de ventiladores, e a saída de ar acontecia na parte superior, que era aberta, sendo, por isso, denominadas câmaras de topo aberto. Os ventiladores, instalados em caixas de aço inoxidável hermeticamente fechadas, onde é possível colocar ou não filtros para retirada de partículas e gases do ar, forçavam a entrada de ar filtrado ou não filtrado no interior das câmaras. Todo o sistema de filtragem foi fornecido pela Purafil. Foram instalados filtros para partículas grossas e finas e leitos químicos que permitiam a filtragem de gases inorgânicos e orgânicos. Seis câmaras de topo aberto foram instaladas em área não sombreada do CEPEMA (Figura 2). O fluxo de ar para o interior das câmaras, assim como a análise da capacidade de filtragem dos diferentes elementos filtrantes ao longo dos experimentos, foi controlado por meio de manômetros.



Marisa Domingos

Figura 2: Câmaras de topo aberto situadas na área do CEPEMA, com sistemas de filtragem: *AF* = ar filtrado, *ANF* = ar não filtrado.

### **b) Obtenção de plantas jovens de *T. pulchra***

Para realização de todos os experimentos em câmaras, as plantas jovens de *T. pulchra* foram obtidas e cultivadas da mesma forma já descrita no experimento em campo, no capítulo II.

### **c) Esquema de exposição das plantas nos locais de estudo**

Foram realizados 06 períodos de exposição de *T. pulchra* em câmaras de topo aberto:

- 1ª Exposição (EXPO 1): de novembro/2010 a janeiro/2011;
- 2ª Exposição (EXPO 2): de fevereiro a abril/2011;
- 3ª Exposição (EXPO 3): de maio a julho/2011;
- 4ª Exposição (EXPO 4): de setembro a novembro/2011;
- 5ª Exposição (EXPO 5): de março a maio/2012;
- 6ª Exposição (EXPO 6): de julho a setembro/2012.

Essa etapa experimental, assim, foi abrangida pela fase em que UTE já gerava toda a energia e vapor para a refinaria de petróleo, conforme figura 2 do capítulo II. Assim, esta etapa não foi realizada para monitorar a mudança do sistema de geração de energia daquela usina. Isto nem seria possível, inclusive, considerando a existência de outras fontes de poluição no local. Para este estudo, foram utilizadas 4 câmaras de topo aberto, 2 câmaras com ar filtrado (tratamento denominado AF) e 2 câmaras recebendo ar ambiente (tratamento denominado ANF), iniciando-se cada período de exposição, que também durava 90 dias, com 8 plantas de *T. pulchra* por câmara. Foram realizadas coletas aos 45 e aos 90 dias de exposição, retirando-se 4 plantas de cada câmara por amostragem, que eram levadas ao laboratório para análises dos indicadores do sistema de defesas antioxidantes e estresse oxidativo. Como comentado anteriormente, concomitantemente às exposições em câmaras, plantas jovens da espécie foram mantidas no ambiente natural do CEPEMA, obedecendo ao mesmo protocolo proposto na exposição em câmaras (tratamento denominado CEPEMA).

O esquema de exposição das plantas no interior das câmaras seguiu o mesmo proposto na exposição em campo, já descrito no capítulo II.

#### **d) Análise dos indicadores de capacidade de oxi-redução e de danos oxidativos**

Os indicadores de capacidade de oxi-redução e danos oxidativos em plantas de *T. pulchra* foram os mesmos analisados nos experimentos em campo e já descritos no capítulo II: concentração de ácido ascórbico e glutathiona em suas formas reduzidas, totais, oxidadas e razão reduzida/total, atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase, glutathiona redutase, ascorbato peroxidase e acúmulo foliar de malondialdeído, indicador da peroxidação lipídica.

#### **e) Monitoramento das condições ambientais**

Ao longo das exposições em câmaras de topo aberto, a temperatura e umidade no interior das câmaras foram monitoradas através de termo-higrômetros de forma descontínua, uma vez por semana, obedecendo sempre o mesmo horário e posicionamento do sensor no interior das câmaras, de modo a padronizar a medição.

Poluentes como O<sub>3</sub>, NO e NO<sub>2</sub> no interior das câmaras foram monitorados continuamente através de analisadores Horiba.

Além disso, obtiveram-se os dados da qualidade do ar monitorada pela CETESB no centro de Cubatão, apenas para caracterizar o nível de contaminação atmosférica na região de estudo, durante o período experimental.

#### **f) Apresentação de resultados e análise estatística**

Inicialmente, serão apresentados gráficos com os perfis de poluentes no Centro de Cubatão para caracterizar o nível de contaminação atmosférica ao longo do período experimental. Do mesmo modo, serão mostradas as variações nos níveis de ozônio e óxidos de nitrogênio medidos no interior das câmaras, em ambiente não filtrado, bem como os dados climáticos obtidos.

Em seguida, apresentou-se uma análise descritiva, por meio de gráficos de contorno, da variação espacial e temporal de todos indicadores de oxi-redução e estresse oxidativo nas plantas submetidas aos três tratamentos, como já descrito no capítulo II. Para esta finalidade, calcularam-se médias dos resultados obtidos aos 45 e 90 dias de cada exposição.

Análises de variância (Teste de Kruskal Wallis) seguidas de teste de comparação múltipla indicaram diferenças significativas entre as plantas expostas aos 45 e 90 dias dentro da mesma exposição, entre as diferentes exposições e também entre os diferentes tratamentos (ar filtrado X ar não filtrado).

Foram também realizadas análises de regressão linear múltipla com a finalidade de verificar se as variações de cada indicador biológico analisado poderiam ser explicadas pela mudança do perfil de contaminação atmosférica (determinada pelos níveis de NO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> e O<sub>3</sub>) ou por oscilações climáticas (temperatura do ar e umidade relativa). Essas análises foram realizadas com os dados biológicos e abióticos obtidos nas câmaras de ar não filtrado, conforme a metodologia já descrita no capítulo II. Neste caso, utilizaram-se os valores brutos obtidos aos 45 e 90 dias de cada exposição.

Para todas as análises estatísticas descritas, foi utilizado o programa Sigma Stat 3.5.

## Resultados

### a) Caracterização das condições ambientais ao longo do período experimental

Na figura 3, é mostrado o perfil da contaminação de poluentes monitorado pela CETESB no Centro de Cubatão, durante todo o período experimental, que abrangeu as etapas realizadas em campo (capítulo II) e as contidas neste capítulo.

Além disso, considerando que, em experimentos realizados em câmaras de topo aberto, as plantas são submetidas não somente a concentrações contrastantes dos poluentes atmosféricos (câmaras AF x câmaras ANF), com também às oscilações nas variáveis ambientais (de poluição e de clima) observadas no ambiente onde as câmaras são instaladas, é necessário monitorar algumas variáveis ambientais no interior das câmaras de topo aberto no decorrer dos experimentos para apontar as possíveis indutoras das respostas antioxidativas. Sendo assim, a figura 4 apresenta o perfil dos poluentes – óxidos e dióxidos de nitrogênio e ozônio – monitorados nas câmaras de ar filtrado e não filtrado, através de monitoramento contínuo feito por analisadores HORIBA.

Comparando o perfil da contaminação de poluentes ocorrido em campo (figura 3) e monitorados pela CETESB (capítulo II) com os períodos de exposições de *T. pulchra* nas câmaras de topo aberto, observou-se que a maior concentração de poluentes ocorreu de dezembro/2010 a janeiro/2011, com altos índices de SO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> (máximas de 54,16 µg/m<sup>3</sup> e 45,49 µg/m<sup>3</sup> respectivamente). Esse resultado corrobora o monitorado no interior das câmaras de ar não filtrado, onde a maior concentração de poluentes ocorreu na 1ª exposição das plantas de *T. pulchra* nas câmaras de topo aberto (Figura 4).

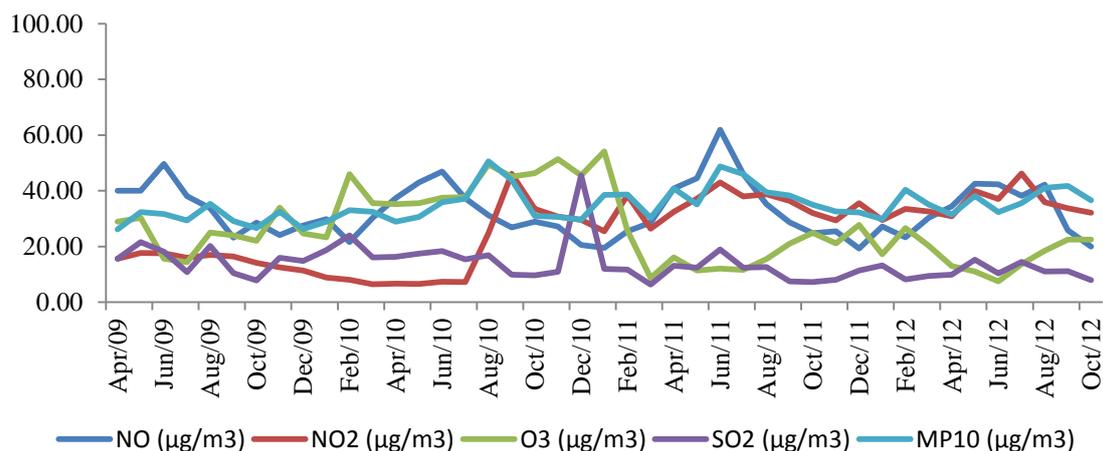


Figura 3: Perfil médio mensal dos poluentes monitorados pela estação de monitoramento da CETESB no Centro de Cubatão. NO = óxido de nitrogênio, NO<sub>2</sub> = dióxido de nitrogênio, O<sub>3</sub> = ozônio, SO<sub>2</sub> = dióxido de enxofre e MP<sub>10</sub> = material particulado. Expo 1: Nov/10-jan/11; Expo 2: fev-abr/11; Expo 3: mai-jul/11; Expo 4: set-nov/11; Expo 5: mar-mai/12; Expo 6: jul-set/12.

A maior concentração de NO ocorrida em campo (Figura 3) ocorreu em junho de 2011, com máxima de 61,8 µg/m<sup>3</sup>. Esse resultado também condiz com o monitorado no interior das câmaras de ar não filtrado, sendo que esta data ocorreu durante a 3<sup>a</sup> exposição de *T. pulchra* no interior das câmaras de topo aberto (Figura 4).

A maior concentração de NO<sub>2</sub> em campo (Figura 3) ocorreu em julho de 2012, período correspondente à 6<sup>a</sup> exposição de *T. pulchra* nas câmaras, com máxima de 46,2 µg/m<sup>3</sup>. Nestes mesmos períodos e exposição, ocorreu uma alta concentração de NO no interior das câmaras de topo aberto que receberam ar não filtrado (Figura 4).

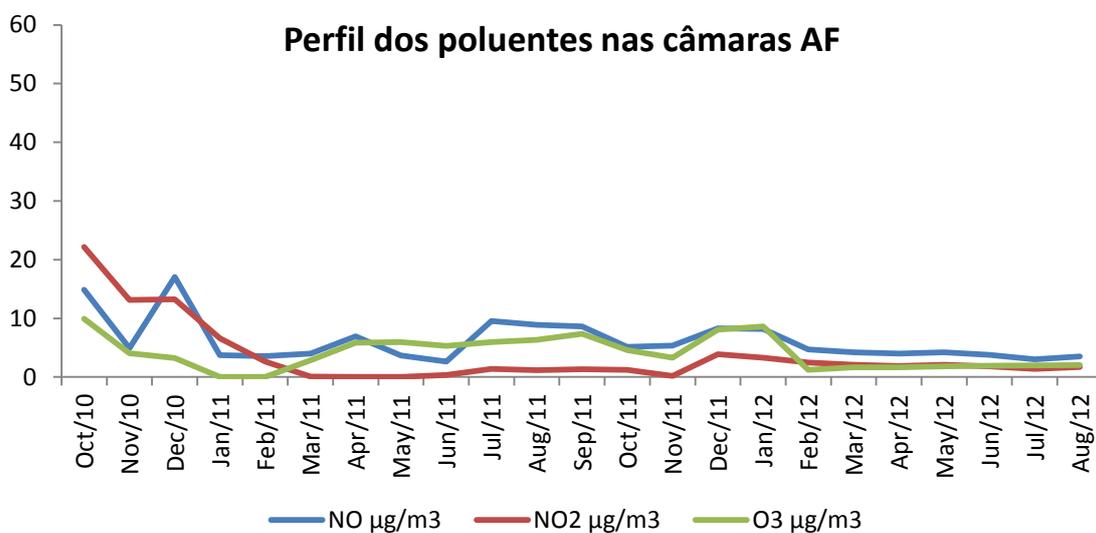
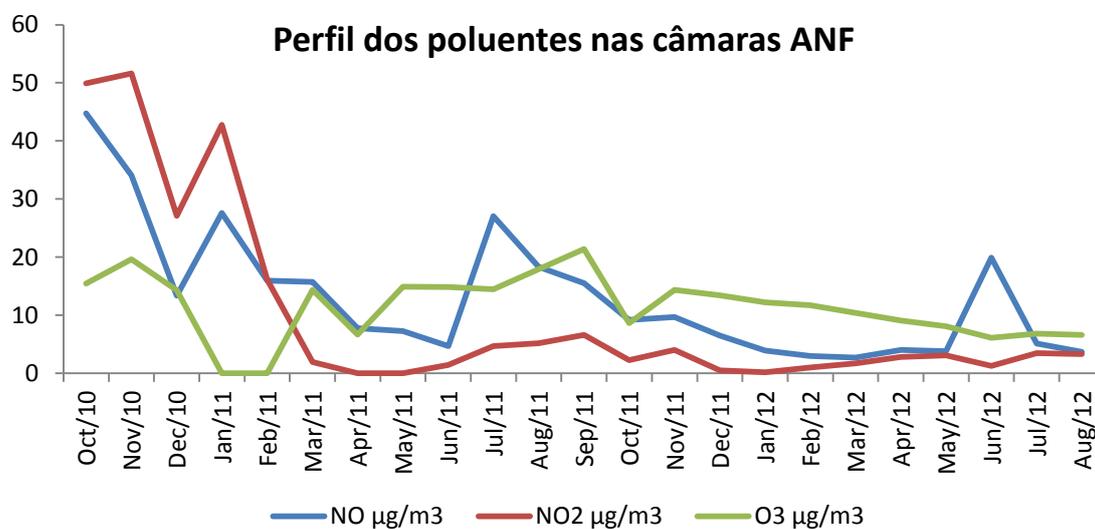


Figura 4: Perfil médio mensal dos poluentes monitorados pelo analisador Horiba no interior das câmaras de fumigação. NO = óxido de nitrogênio, NO<sub>2</sub> = dióxido de nitrogênio, O<sub>3</sub> = ozônio, ANF = ar não filtrado e AF = ar filtrado. Expo 1: Nov/10-jan/11; Expo 2: fev-abr/11; Expo 3: mai-jul/11; Expo 4: set-nov/11; Expo 5: mar-mai/12; Expo 6: jul-set/12.

Nesta figura, as maiores concentrações de poluentes nos experimentos em câmaras de topo aberto – tanto no tratamento de ANF quanto no de AF – ocorreram no período de outubro de 2010 a março de 2011, período que abrange a 1ª e 2ª exposições. Nesse período, no tratamento de AF, os valores mínimos e máximos de NO, NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> foram, respectivamente, 4,9 – 27,5 µg/m<sup>3</sup>; 2,6 – 31,4 µg/m<sup>3</sup> e 2,7 – 29,5 µg/m<sup>3</sup>. No tratamento de ANF, os valores mínimos e máximos de NO, NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> foram, respectivamente, 7,2 – 60,2 µg/m<sup>3</sup>; 1,4 – 65,1 µg/m<sup>3</sup> e 8,1 – 35,5 µg/m<sup>3</sup>.

No período de julho a dezembro de 2011, correspondente ao final da 3ª exposição e a 4ª exposição inteira também, houve uma elevação dos níveis de poluentes em ANF e AF, porém, em menores concentrações quando comparadas às 1ª e 2ª exposições. Nesse período, no tratamento de AF, os valores mínimos e máximos de NO, NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> foram, respectivamente, 3,1 – 15,0 µg/m<sup>3</sup>; 1,5 – 5,0 µg/m<sup>3</sup> e 2,3 – 12,0 µg/m<sup>3</sup>. No tratamento de ANF, os valores mínimos e máximos de NO, NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> foram, respectivamente, 5,6 – 45,1 µg/m<sup>3</sup>; 1,17 – 20,0 µg/m<sup>3</sup> e 5,0 – 29,0 µg/m<sup>3</sup>.

No período correspondente à 5ª e 6ª exposições (março a setembro/2012), por sua vez, observou-se um pico de NO no período de maio a julho de 2012 nas plantas expostas ao ANF, e os menores índices de poluentes nas plantas expostas ao AF. No período que abrangeu as duas últimas exposições em câmaras de topo aberto, os valores mínimos e máximos de NO, NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> em AF, foram, respectivamente, 2,5 – 4,9 µg/m<sup>3</sup>; 1,2 – 3,5 µg/m<sup>3</sup> e 1,5 – 3,9 µg/m<sup>3</sup>. No tratamento de ANF, os valores mínimos e máximos de NO, NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> foram, respectivamente, 4,1 – 21,9 µg/m<sup>3</sup>; 2,4 – 4,8 µg/m<sup>3</sup> e 3,9 – 12,4 µg/m<sup>3</sup>.

Os valores médios das concentrações dos poluentes são bem mais baixos nas câmaras que possuem ar filtrado, mostrando claramente a eficiência dos filtros. A figura 5 mostra o gráfico com a porcentagem de redução da concentração de poluentes nas

câmaras de ar filtrado em relação à concentração de poluentes nas câmaras de ar não filtrado.

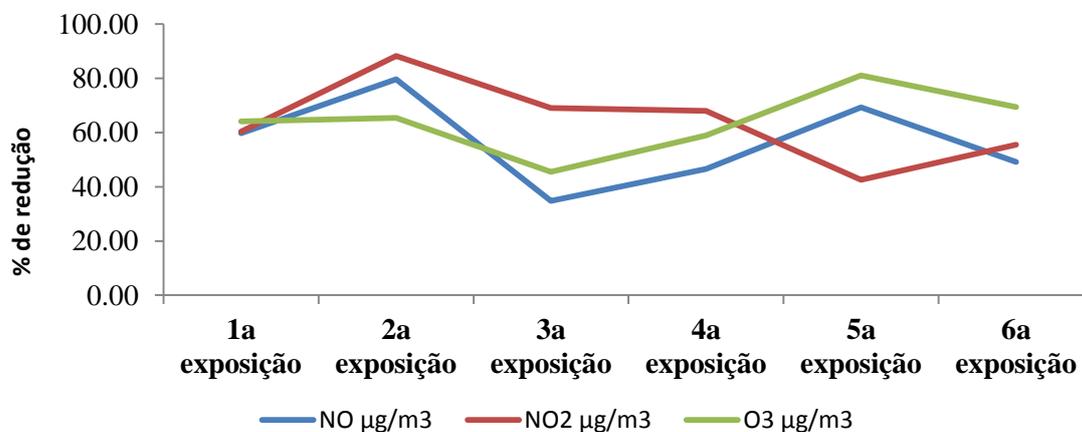


Figura 5: Redução da concentração média de poluentes monitorados no interior das câmaras de ar filtrado em relação à concentração média de poluentes monitorados no interior das câmaras de ar não filtrado durante as 6 exposições de *T. pulchra* nas câmaras de topo aberto. NO = óxido de nitrogênio, NO<sub>2</sub> = dióxido de nitrogênio, O<sub>3</sub> = ozônio.

A maior porcentagem de redução de NO e NO<sub>2</sub> ocorreu na 2<sup>a</sup> exposição, com 79,63% e 88,24%, respectivamente.

A menor porcentagem de redução de NO e O<sub>3</sub> ocorreu na 3<sup>a</sup> exposição, com 34,8% e 45,56%, respectivamente.

A maior porcentagem de redução de O<sub>3</sub> ocorreu na 5<sup>a</sup> exposição (81,09%) enquanto ocorreu a menor porcentagem de redução de NO<sub>2</sub> (42,52%), na mesma exposição.

A tabela a seguir mostra os valores mínimos, máximos e de médias dos dados climáticos monitorados no interior das câmaras, durante todas as exposições de *T. pulchra*.

Tabela 1: Valores máximos, mínimos e médios de temperatura (° C) e umidade relativa (%) do ar monitoradas no interior das câmaras de fumigação durante as 06 exposições

de *T. pulchra* em Cubatão. Cada exposição (1 a 6) é representada por um gradiente sequencial de tons de cor cinza.

	T (°C)			UR (%)		
	mínima	máxima	média	mínima	máxima	média
out/10	20,0	34,0	25,0	65,0	80,0	70,0
nov/10	29,0	33,0	32,0	50,0	70,0	59,0
dez/10	30,0	37,0	35,0	60,0	70,0	63,0
jan/11	29,0	35,0	32,0	57,0	70,0	63,0
fev/11	28,0	35,0	30,0	63,0	84,0	70,0
mar/11	20,0	30,0	25,0	70,0	82,0	80,0
abr/11	20,0	30,0	27,0	70,0	84,0	80,0
mai/11	20,0	25,0	22,0	69,0	90,0	88,0
jun/11	15,0	25,0	20,0	71,0	90,0	85,0
jul/11	18,0	27,0	21,0	76,0	90,0	82,0
ago/11	18,0	27,0	21,0	72,0	90,0	86,0
set/11	18,0	25,0	10,0	65,0	87,0	73,0
out/11	20,0	25,0	23,0	67,0	90,0	78,0
nov/11	20,0	27,0	22,0	62,0	85,0	77,0
dez/11	27,0	27,0	30,0	68,0	87,0	76,0
jan/12	30,0	37,0	33,0	71,0	80,0	75,0
fev/12	28,0	34,0	31,0	70,0	77,0	73,0
mar/12	23,0	33,0	28,0	70,0	80,0	75,0
abr/12	24,0	30,0	27,0	69,0	78,0	73,0
mai/12	20,0	30,0	25,0	75,0	90,0	82,0
jun/12	20,0	25,0	22,0	78,0	90,0	84,0
jul/12	21,0	25,0	23,0	77,0	87,0	82,0
ago/12	25,0	30,0	27,0	55,0	75,0	67,0
set/12	20,0	29,0	25,0	64,0	85,0	70,0

Segundo a tabela 1, os maiores valores médios de temperatura foram encontrados no período de novembro de 2010 a março de 2011, compreendendo a 1ª e 2ª exposições e no período de março a maio de 2012, compreendendo a 5ª exposição. Na 1ª e 2ª exposições foi também observado o maior índice de poluentes no interior das câmaras. Após esse período observa-se uma similaridade dos índices de temperatura e umidade. O período de maio a julho de 2011 e setembro a novembro de

2011, referentes às 3ª e 4ª exposições, apresentaram menores valores médios de temperatura e elevação da umidade.

#### **a) Análise descritiva das respostas antioxidativas**

Nas figuras 6 a 9 serão apresentados os gráficos de contorno que indicam a variação dos componentes enzimáticos (catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase) e não enzimáticos (ácido ascórbico e glutathione), bem como do indicador de estresse oxidativo (conteúdo de malondialdeído) nas plantas de *T. pulchra* mantidas nas câmaras de ar filtrado, não filtrado e ambiente externo do CEPEMA ao longo das 6 exposições.

Em geral, a enzima catalase não variou entre tratamentos, e sim entre exposições, sendo sua atividade cerca de três vezes mais alta nas duas últimas exposições. A glutathione redutase, além de apresentar maior atividade na 3ª exposição, tendeu a ser mais alta nas plantas expostas ao ar não filtrado e no ambiente natural do CEPEMA (figura 6).

A atividade da ascorbato peroxidase foi maior principalmente na 5ª exposição nas plantas expostas no CEPEMA. A superóxido dismutase mostrou maior atividade nas duas últimas exposições, nas plantas expostas no ar filtrado e no CEPEMA (figura 6).

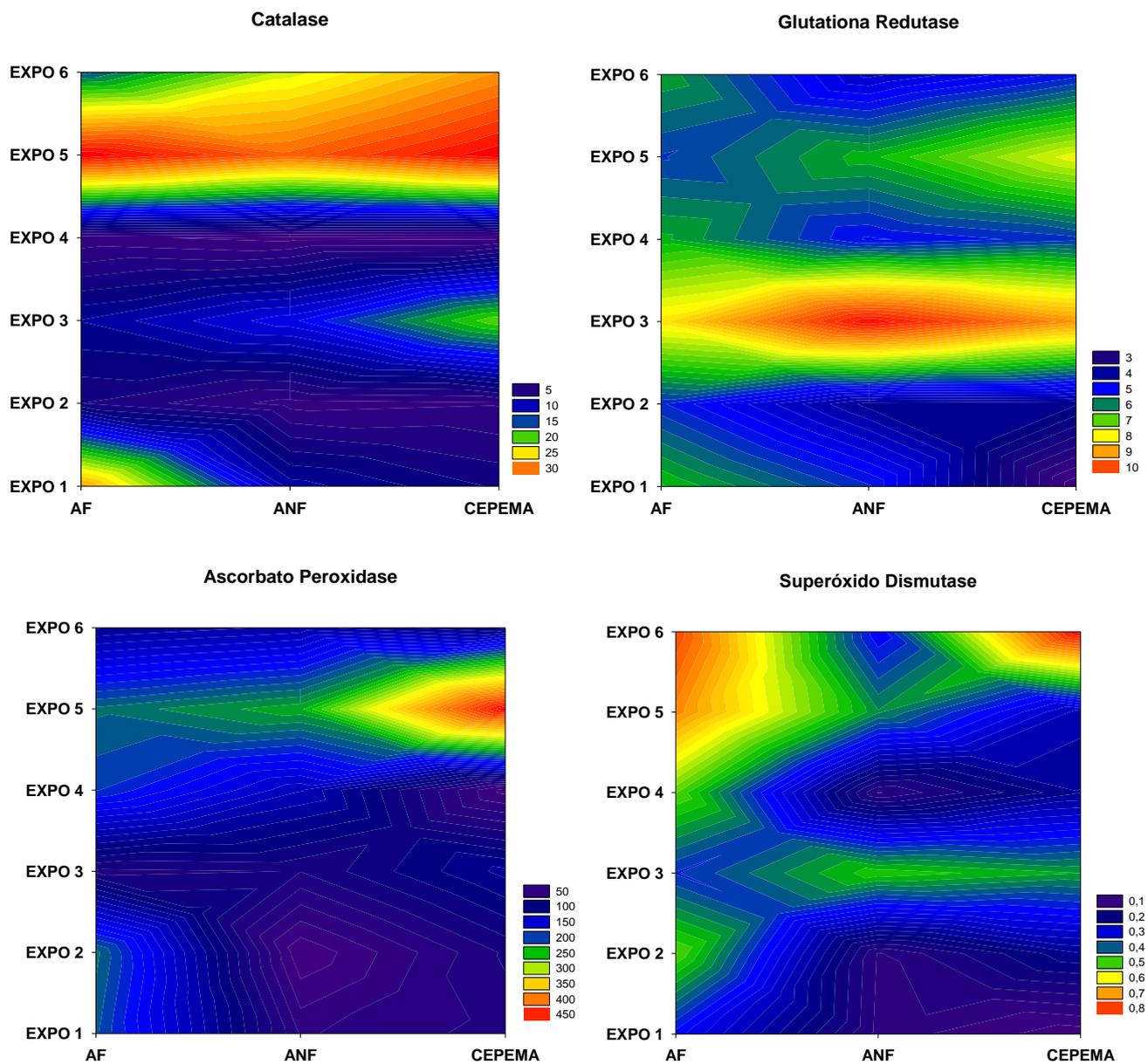


Figura 6: Valores médios da atividade da catalase (CAT), glutathione redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD nas plantas de *T. pulchra* expostas nas câmaras de ar filtrado (AF), ar não filtrado (ANF) e CEPEMA. Os valores da atividade enzimática são expressos em mg/proteína.

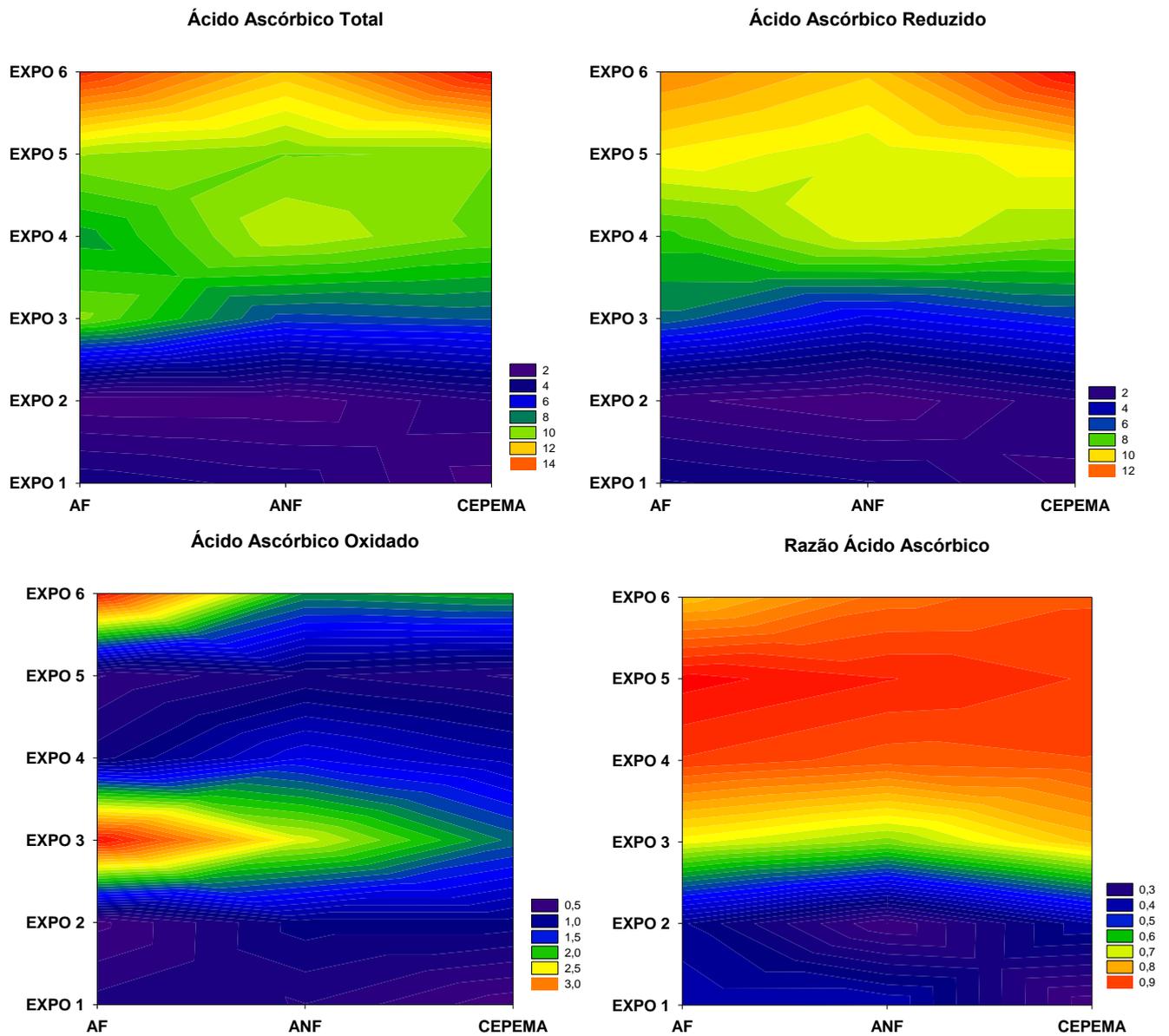


Figura 7: Valores médios da concentração de ácido ascórbico em suas formas total, reduzida, oxidada e razão nas plantas de *T. pulchra* expostas nas câmaras de ar filtrado (AF), ar não filtrado (ANF) e CEPEMA. Os valores da concentração de ácido ascórbico são expressos em mg/g.ms.

As concentrações mais baixas de ácido ascórbico, em geral, foram verificadas nas 3 primeiras exposições. O conteúdo foliar de ácido ascórbico total e reduzido foi especialmente mais alto nas duas últimas exposições, em ANF e CEPEMA. O ácido ascórbico oxidado apresentou maiores concentrações nas plantas expostas ao ar filtrado nas exposições 3 e 6. A razão entre ácido ascórbico reduzido e total, que indica o potencial de oxi-redução dessa molécula, permaneceu acima de 0,7 a partir da 3ª exposição (figura 7).

As formas reduzidas e totais de glutathione foram maiores nas plantas do primeiro experimento expostas ao ANF e na última exposição de *T. pulchra* nos tratamentos ANF e CEPEMA. Sua forma oxidada apresentou maior concentração nas plantas expostas no ar filtrado, na 3ª exposição. O estado redox da glutathione tendeu a ser mais alto nas plantas do ANF e CEPEMA nos 2 últimos períodos experimentais (figura 8).

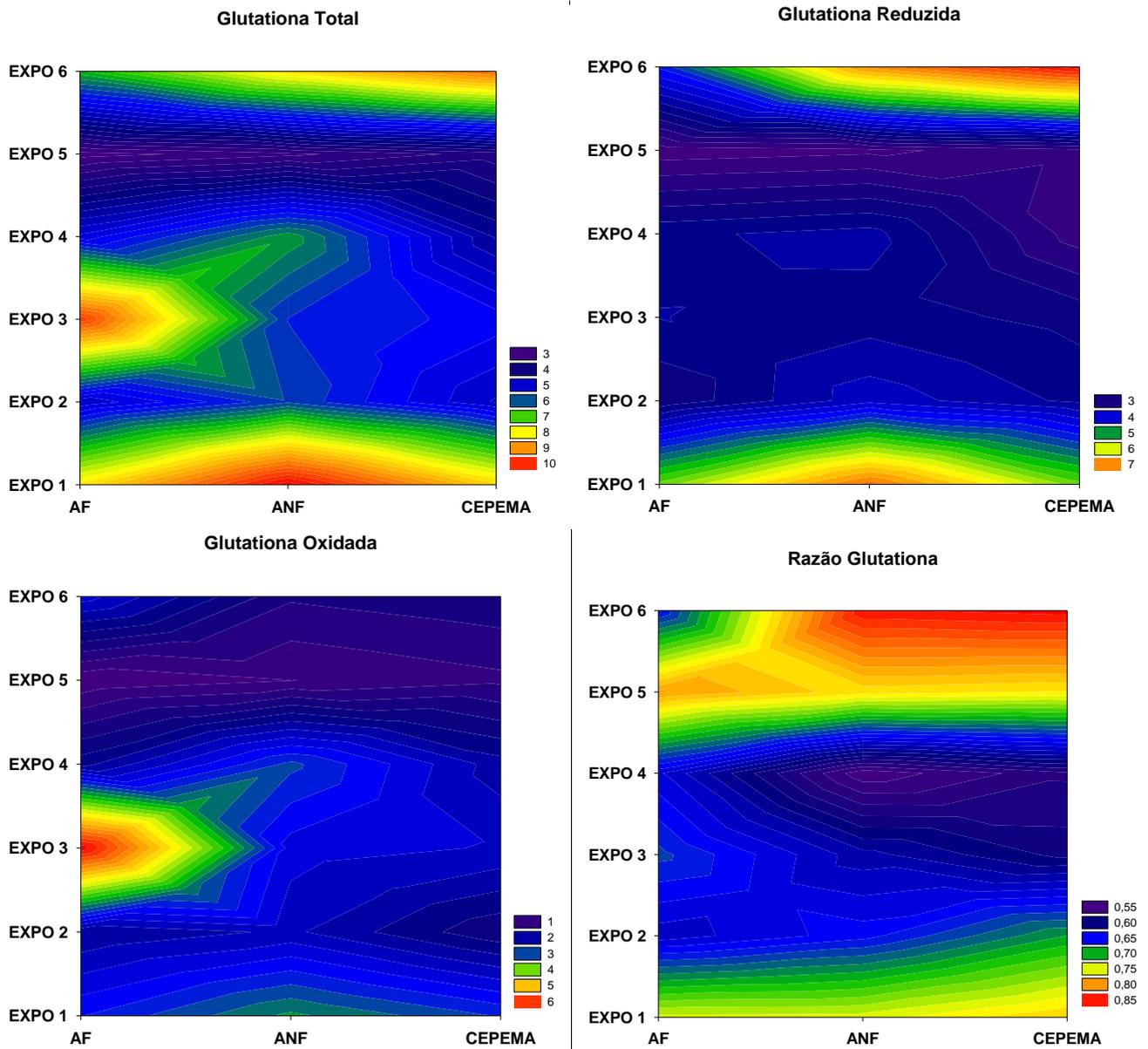


Figura 8: Valores médios da concentração de glutathiona em suas formas total, reduzida, oxidada e razão nas plantas de *T. pulchra* expostas nas câmaras de ar filtrado (AF), ar não filtrado (ANF) e CEPEMA. Os valores da concentração de glutathiona são expressos em  $\mu\text{mol/g/ms}$ .

O acúmulo de malondialdeído, indicador da peroxidação lipídica, variou espacial e temporalmente. O maior acúmulo tendeu a ocorrer nas plantas expostas no CEPEMA e em seguida nas mantidas sob ar não filtrado, principalmente nas 3 primeiras exposições e na última (figura 9).

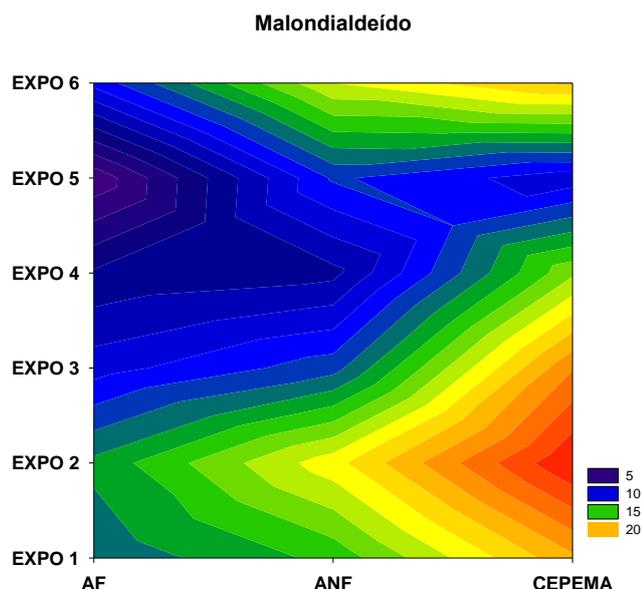


Figura 9: Valores médios do acúmulo foliar de MDA nas plantas de *T. pulchra* expostas nas câmaras de ar filtrado (AF), ar não filtrado (ANF) e CEPEMA. Os valores do acúmulo foliar de MDA são expressos em mMol/g/mf.

### c) Comparações estatísticas das respostas antioxidativas

A concentração de ácido ascórbico reduzido (AsA) tendeu a ser maior aos 45 dias em algumas exposições, como as duas últimas, apesar de ter sido encontrada diferença estatística entre os locais, tratamentos e tempo de exposição dentro do mesmo experimento .

Na terceira exposição, o ácido ascórbico oxidado (DHA) foi significativamente mais concentrado e a razão AsA/AAtotal foi menor nas plantas que cresceram por 90 dias no CEPEMA e ar não filtrado (ANF), em relação às plantas expostas no ar filtrado (AF) em. Também na 3ª exposição, aos 45 dias, o conteúdo de DHA nas plantas expostas ao AF foi maior do que as plantas retiradas aos 90 dias.

Após 90 dias de duração do 4º período experimental, as plantas submetidas ao ar filtrado continham menos ácido ascórbico do que as crescidas sob ar não filtrado ou no ambiente natural (CEPEMA).

Na 6ª exposição, as plantas submetidas ao ar filtrado (AF) por 45 dias apresentaram maior concentração de ácido ascórbico total do que aquelas que permaneceram por 90 dias.

A razão  $AsA/AA_{total}$  foi mais alta nas plantas que cresceram por 90 dias no CEPEMA e nas câmaras de ar não filtrado (ANF), em relação às plantas expostas no ar filtrado (AF) (Tabela 2).

Tabela 2. Média da concentração foliar de ácido ascórbico em suas formas reduzidas, oxidadas, totais e razão AA, após 45 e 90 dias de duração de cada exposição de plantas de *T. pulchra* nos 3 tratamentos (ar filtrado(AF), ar não filtrado(ANF) e ambiente natural do CEPEMA). Letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos para o mesmo período. Letras minúsculas indicam diferença entre diferentes exposições em cada tratamento. \* indica diferença entre 45 e 90 dias em cada tratamento e exposição. / indica que não há dados. A mediana foi calculada com base nos dados brutos.

Indicador	Exposição	45 dias			90 dias		
		AF	ANF	CEPEMA	AF	ANF	CEPEMA
<b>AsA</b> mg/g/ms	1	5,74 A	4,87 A	5,36 A	/	/	/
	2	2,63 A	1,61 A	3,85 A	/	/	/
	3	5,63 Aa	3,03 Aa	5,69 Aa	6,93 Aa	6,3 Aa	5,48 Aa
	4	9,18 Aa	8,79 Aa	6,84 Aa	5,67 Aa	9,35 Aa	10,05 Aa
	5	9,52 Aa	8,87 Aa	9,48 Aa	7,42 Aa	9,07 Aa	8,45 Aa
	6	11,24 Aa	10,09 Aa	13,44 Aa	6,28 Aa	4,66 Aa	5,59 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>6,99</b>	<b>5,31</b>	<b>7,12</b>	<b>5,27</b>	<b>6,72</b>
<b>DHA</b> mg/g/ms	1	1,29 A	1,19 A	1,16 A	/	/	/
	2	0,73 A	1,71 A	1,71 A	/	/	/
	3	5,92 Aa*	3,48 Aa	1,96 Aa	0,94 Ba	1,20 Ba	1,36 Aa
	4	0,71 Aa	1,49 Aa	1,15 Aa	0,79 Aa	1,08 Aa	0,93 Aa
	5	0,49 Aa	0,71 Aa	0,58 Aa	0,75 Aa	1,29 Aa	1,04 Aa
	6	3,21 Aa	1,45 Aa	2,12 Aa	3,43 Aa	2,35 Aa	1,66 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>2,85</b>	<b>1,17</b>	<b>1,06</b>	<b>1,12</b>	<b>1,83</b>
<b>AA total</b> mg/g/ms	1	7,03 A	6,06 A	6,52 A	/	/	/
	2	3,37 A	3,33 A	5,57 Aa	/	/	/
	3	11,56 Aa	6,52 Aa	7,66 Aa	7,87 Aa	7,51 Aa	6,85 Aa
	4	9,89 Aa	10,29 Aa	8,00 Aa	6,47 Ba	10,44 Aa	10,98 Aa
	5	10,01 Aa	9,58 Aa	9,61 Aa	8,18 Aa	10,37 Aa	9,49 Aa
	6	14,66 Aa*	11,87 Aa	15,32 Aa	9,72 Aa	7,01 Aa	7,25 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>8,12</b>	<b>5,29</b>	<b>5,05</b>	<b>5,83</b>	<b>6,23</b>
<b>Razão AA</b>	1	0,79 A	0,80 A	0,80 A	/	/	/
	2	0,72 A	0,47 A	0,75 A	/	/	/
	3	0,53 Aa	0,46 Aa	0,73 Aa	0,88 Ba	0,83 Ba	0,79 Aa
	4	0,92 Aa	0,84 Aa	0,85 Aa	0,87 Ba	0,89 Ba	0,90 Aa
	5	0,94 Aa	0,92 Aa	0,89 Aa	0,89 Aa	0,86 Aa	0,87 Aa
	6	0,79 Aa	0,84 Aa	0,74 Aa	0,71 Aa	0,65 Aa	0,77 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>0,55</b>	<b>0,58</b>	<b>0,72</b>	<b>0,86</b>	<b>0,74</b>

Não houve variação estatisticamente significante na concentração foliar de glutathiona reduzida (GSH), oxidada e total e no estado redox desse antioxidante determinados aos 45 dias, em qualquer tratamento e em qualquer uma das 6 exposições.

Aos 90 dias das 1ª a 4ª exposições, diferença estatística foi evidenciada na concentração de GSH nas plantas expostas ao ar filtrado (AF) na comparação aos das plantas mantidas sob AF e/ou no ambiente natural do CEPEMA. .

A concentração da glutathiona oxidada (GSSG) e total, aos 90 dias da 3ª exposição, foi maior nas plantas expostas no ar filtrado (AF) e foi estatisticamente maior tanto em comparação com as plantas expostas ao ar poluído quanto em relação às plantas retiradas do mesmo tratamento, aos 45 dias.

A razão entre a glutathiona reduzida e total, ainda, foi significativamente aumentada nas plantas crescidas sob ar filtrado (AF) por 90 dias da 1ª exposição e no CEPEMA e por 90 dias da 2ª exposição, em relação aos outros tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Média da concentração foliar da glutaciona em suas formas reduzidas, oxidadas, totais e razão, após 45 e 90 dias de duração de cada exposição de plantas de *T. pulchra* nos 3 tratamentos (ar filtrado (AF), ar não filtrado (ANF) e ambiente natural do CEPEMA). Letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos para o mesmo período. Letras minúsculas indicam diferença entre diferentes exposições em cada tratamento. \* indica diferença entre 45 e 90 dias. / indica que não há dados. A mediana foi calculada com base nos dados brutos.

Indicador	Exposição	45 dias			90 dias		
		AF	ANF	CEPEMA	AF	ANF	CEPEMA
<b>GSH</b> μmol/g/ms	1	6,30 Aa	8,65 Aa	7,23 Aa	4,64 Ba	5,53 Ba	3,44 Aa
	2	4,11 Aa	5,67 Aa	4,96 Aa	1,91 Aa	1,78 Ba	1,71 Ba
	3	2,01 Aa	3,39 Aa	3,50 Aa	4,76 Aa	3,18 Ba	2,75 Ba
	4	5,13 Aa	4,93 Aa	3,36 Aa	1,57 Aa	2,01 Ba	1,60 Ba
	5	2,26 Aa	2,35 Aa	2,53 Aa	3,35 Aa	3,48 Aa	2,48 Aa
	6	4,25 Aa	6,88 Aa	7,92 Aa	3,40 Aa	3,29 Aa	3,12 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>3,45</b>	<b>4,01</b>	<b>4,28</b>	<b>2,05</b>	<b>2,99</b>
<b>GSSG</b> μmol/g/ms	1	3,26 Aa	3,08 Aa	2,27 Aa	1,91 Aa	3,41 Aa	2,09 Aa
	2	1,84 Aa	2,30 Aa	1,60 Aa	1,76 Aa	1,78 Aa	1,25 Aa
	3	1,05 Aa	2,48 Aa	2,61 Aa	11,64 Ba*	2,11 Aa	1,74 Aa
	4	2,02 Aa	3,16 Aa	2,21 Aa	1,40 Aa	2,55 Aa	1,55 Aa
	5	0,62 Aa	0,79 Aa	0,94 Aa	1,71 Aa	2,86 Aa	1,88 Aa
	6	2,65 Aa	1,23 Aa	1,35 Aa	6,35 Aa	2,30 Aa	2,18 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>1,02</b>	<b>1,95</b>	<b>1,44</b>	<b>3,45</b>	<b>1,17</b>
<b>Glu total</b> μmol/g/ms	1	9,56 Aa	11,74 Aa	9,51 Aa	6,56 Ba	8,95 Aa	5,54 Ba
	2	5,96 Aa	7,97 Aa	6,57 Aa	3,67 Aa	3,57 Aa	2,97 Aa
	3	3,06 Aa	5,88 Aa	6,11 Aa	16,44 Aa*	5,29 Ba	4,50 Ba
	4	7,15 Aa	8,11 Aa	5,57 Aa	2,98 Aa	4,56 Aa	3,16 Aa
	5	2,89 Aa	3,14 Aa	3,48 Aa	5,07 Aa	6,34 Aa	4,37 Aa
	6	6,56 Aa	8,11 Aa	9,27 Aa	9,75 Aa	5,59 Aa	5,30 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>5,21</b>	<b>9,33</b>	<b>5,98</b>	<b>8,36</b>	<b>5,72</b>
<b>Razão</b>							
<b>Glut.</b>	1	0,67 Aa	0,72 Aa	0,76 Aa	0,81 Ba	0,76 Aa	0,77 Ba
	2	0,70 Aa	0,73 Aa	0,75 Aa	0,54 Ba	0,55 Ba	0,62 Aa
	3	0,67 Aa	0,60 Aa	0,55 Aa	0,65 Aa	0,62 Aa	0,61 Aa
	4	0,73 Aa	0,62 Aa	0,61 Aa	0,53 Aa	0,45 Aa	0,52 Aa
	5	0,79 Aa	0,76 Aa	0,75 Aa	0,63 Aa	0,54 Aa	0,56 Aa
	6	0,88 Aa	0,85 Aa	0,85 Aa	0,66 Aa	0,61 Aa	0,59 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>0,65</b>	<b>0,69</b>	<b>0,74</b>	<b>0,62</b>	<b>0,59</b>

A atividade da superóxido dismutase (SOD) não variou até 45 dias após o início de cada experimento. No 2º e 4º períodos de exposição, após a atividade dessa enzima foi mais alta nas plantas crescidas nas câmaras de ar filtrado (AF).

A atividade da catalase (CAT) não variou estatisticamente entre os tratamentos após 45 e 90 dias de qualquer exposição. Mas, houve variação entre exposições no mesmo tratamento. Aos 45 dias da 5ª exposição, as plantas retiradas dos três tratamentos mostraram máxima atividade de CAT.

A atividade de ascorbato peroxidase (APX) apresentou-se diferente somente no final das exposições, sendo maior nas plantas do ar filtrado na 2ª exposição, aos 45 dias, e na 4ª exposição, aos 90 dias, no ar filtrado (AF). Na 4ª exposição houve diferença estatística no ar filtrado (AF) em relação aos outros locais e exposições.

A glutatona redutase (GR) não variou estatisticamente em plantas submetidas a qualquer tratamento, na primeira metade dos experimentos realizados. Após 90 dias na 2ª exposição, as plantas de todos tratamentos apresentaram um decréscimo da atividade em relação às plantas expostas aos 45 dias.

As plantas expostas no CEPEMA acumularam significativamente mais malondialdeído (MDA), indicador da peroxidação lipídica, aos 45 dias, das 2ª e 3ª exposições, em relação às demais exposições. Ainda, ao término das 1ª e 4ª exposições, as plantas do CEPEMA continham mais MDA do que as plantas mantidas sob ar filtrado (AF) e ar não filtrado (ANF) (Tabela 4).

Tabela 4: Média da atividade foliar das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e GR) e do conteúdo de malondialdeído, após 45 e 90 dias de duração de cada exposição de plantas de *T. pulchra* nos 3 tratamentos (ar filtrado (AF), ar não filtrado (ANF) e ambiente natural do CEPEMA). Letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos. Letras minúsculas indicam diferença entre diferentes exposições em cada tratamento. \* indica diferença entre 45 e 90 dias. / indica que não há dados. A mediana foi calculada com base nos dados brutos.

Indicador	Exposição	45 dias			90 dias		
		AF	ANF	CEPEMA	AF	ANF	CEPEMA
SOD μmol/min/prot	1	0,29 Aa	0,15 Aa	0,10 A	0,37 Aa*	0,07 Ba	/
	2	0,21 Aa	0,08 Aa	0,11 Aa	0,78 Aa*	0,14 Ba	0,31 Ba
	3	0,37 Aa	0,43 Aa	0,28 Aa	0,33 Aa	0,51 Aa	0,59 Aa
	4	0,78 Aa*	0,14 Aa	0,31 Aa	0,21 Aa	0,08 Ba	0,11 Ba
	5	0,71 Aa	0,42 Aa	0,25 Aa	0,50 Aa	0,11 Aa	0,21 Aa
	6	0,78 Aa	0,32 Aa	0,85 Aa	0,35 Aa	0,47 Aa	0,44 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>0,38</b>	<b>0,29</b>	<b>0,47</b>	<b>0,46</b>	<b>0,33</b>
CAT μmol/min/prot	1	51,12 Aa*	10,20 Aa	10,66 A	4,36 Ba	6,79 Aa	/
	2	3,87 Ab	1,38 Aa	2,06 Aa	6,15 Aa	3,74 Aa	3,70 Aa
	3	11,94 Aa	8,94 Aa	18,32 Ab	4,19 Aa	14,40 Aa	21,47 Aa*
	4	1,69 Ab	1,74 Aa	1,73 Aa	2,84 Aa	1,53 Aa	1,78 Aa
	5	34,86 Aa	30,34 Aa	34,81 Aa	2,26 Aa	1,63 Aa	1,76 Aa
	6	14,56 Aa	22,48 Aa	28,07 Aa	8,06 Aa	11,67 Aa	19,90 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>27,13</b>	<b>15,96</b>	<b>15,96</b>	<b>4,17</b>	<b>7,69</b>
APX μmol/min/prot	1	89,16 Aa	35,67 Aa	137,38 A	315,45 Aa	61,41 Ba	/
	2	27,23 Aa	9,75 Aa	13,49 Ab	399,41Ba*	32,07 Ba	129,81 Ba
	3	84,00 Aa	62,96 Aa	130,25Aa*	50,79 Aa	77,56 Aa	96,87 Aa
	4	335,19Ab*	115,47Ab	18,04 Ab	46,99 Ba	146,88Ab	32,72 Bb
	5	212,43 Aa	237,31Aa	160,11 Aa	191,09 Aa	131,17 Ba	25,38 Ba
	6	109,36 Aa	123,57Aa	98,34 Aa	67,40 Aa	70,26 Aa	113,56 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>98,92</b>	<b>56,33</b>	<b>75,13</b>	<b>175,94</b>	<b>84,98</b>
GR μmol/min/prot	1	10,20 Aa	7,52 Aa	1,59 A	2,67 Ba	2,95 Ba	/
	2	6,78 Aa	5,90 Aa	14,44 Aa	3,68 Aa	1,52 Ba	2,82 Aa
	3	6,78 Aa	5,90 Aa	4,00 Aa	9,45 Aa	15,30 Aa	13,66 Aa
	4	6,78 Aa	5,90 Aa	4,11 Aa	5,74 Aa	4,00 Aa	6,22 Aa
	5	5,37 Aa	6,31 Aa	7,74 Aa	6,26 Aa	4,95 Aa	5,33 Aa
	6	6,17 Aa	4,32 Aa	5,11 Aa	8,11 Aa	10,60 Aa	9,05 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>7,07</b>	<b>5,31</b>	<b>7,53</b>	<b>4,66</b>	<b>7,32</b>
MDA μmol/min/prot	1	6,85 Aa	6,13 Aa	6,47 Aa	17,60 Ba	22,47 Ba	26,25 Aa
	2	8,94 Aa	11,47 Aa	21,40 Ab	17,60 Aa	23,77 Aa	26,61 Aa
	3	10,12 Aa	11,16 Aa	22,20 Ab	8,94 Aa	11,99 Aa	19,59 Aa
	4	5,34 Aa	3,90 Aa	10,19 Aa	8,94 Ba	11,47 Ba	21,40 Aa
	5	3,21 Aa	11,15 Aa	9,37 Aa	7,14 Aa	7,68 Aa	15,80 Aa
	6	10,34 Aa	16,99 Aa	19,21 Aa	9,53 Aa	11,57 Aa	20,90 Aa
	<b>Mediana</b>		<b>7,92</b>	<b>5,83</b>	<b>9,28</b>	<b>8,01</b>	<b>10,36</b>

#### **d) Análises lineares multivariadas**

Na tabela 5, sintetizaram-se os resultados das análises multivariadas, realizadas com o intuito de identificar quais variáveis abióticas explicariam significativamente o perfil temporal dos indicadores do estado redox e de danos oxidativos nas plantas expostas nas câmaras de ar não filtrado, ao longo de todo o período experimental. Incluíram-se na tabela os coeficientes de explicabilidade ( $R^2$ ), as variáveis que significativamente contribuíram para explicar (positivamente ou negativamente), as oscilações ao longo do tempo no nível de cada indicador biológico e os níveis de significância (valores de p) para os modelos lineares propostos.

Todos os modelos propostos foram altamente explicativos ( $p < 0,001$ ), apesar dos valores de  $R^2$  terem sido baixos, assim como o ocorrido com as plantas expostas em campo. Os modelos mais explicativos foram obtidos para glutatona reduzida ( $R^2 = 0,41$ ), para a ascorbato peroxidase ( $R^2 = 0,43$ ) e para catalase ( $R^2 = 0,49$ ) e os menos explicativos para as o ácido ascórbico reduzido ( $R^2 = 0,25$ ), ácido ascórbico total ( $R^2 = 0,27$ ), a enzima superóxido dismutase ( $R^2 = 0,26$ ) e o conteúdo de malondialdeído ( $R^2 = 0,25$ ). As análises multivariadas indicaram também que os perfis temporais de algumas enzimas, como a glutatona redutase e a ascorbato peroxidase, foram explicados de forma combinada por variações nas condições climáticas e/ou nos níveis de contaminação atmosférica por poluentes gasosos.

As concentrações foliares de ácido ascórbico reduzido e total foram explicadas somente por variações nos níveis de  $\text{NO}_2$ , que influenciou negativamente a concentração de ambas as formas do AA.

Os níveis de glutatona reduzida (GSH) e total foram influenciados positivamente pelas concentrações de  $\text{NO}_2$  e  $\text{O}_3$ .

A atividade das quatro enzimas mensuradas foi afetada pela temperatura, ozônio, ou pela junção de ambos fatores. A temperatura afetou a atividade das 4 enzimas analisadas (negativamente, no caso de CAT e GR e positivamente, no caso de SOD e APX). O ozônio afetou a atividade da glutathione redutase (relação negativa) e da ascorbato peroxidase (relação positiva).

A peroxidação lipídica (indicada pela concentração foliar de MDA) aumentou na medida em que os níveis atmosféricos de ozônio aumentaram.

Tabela 5: Resultado das análises lineares multivariadas entre as variações nos indicadores de defesa antioxidativa e de danos oxidativos em plantas de *T. pulchra* e em variáveis ambientais monitoradas no interior da câmara de ar não filtrado.

<b>Variáveis Dependentes</b>	<b>Variáveis Independentes Significativas</b>	<b>Coefficientes</b>	<b>P</b>	<b>Constante e R<sup>2</sup></b>
<b>AsA</b>	NO <sub>2</sub>	-0,0467	0,052	Cte = 6,836 R <sup>2</sup> = 0,259 <i>p</i> < 0,001
<b>AA total</b>	NO <sub>2</sub>	-0,527	0,031	Cte = 8,820 R <sup>2</sup> = 0,272 <i>p</i> < 0,001
<b>Ln GSH</b>	NO <sub>2</sub>	0,0314	< 0,001	Cte = 3,419
	O <sub>3</sub>	0,0816	0,012	R <sup>2</sup> = 0,415 <i>p</i> < 0,001
<b>Ln GSH total</b>	NO <sub>2</sub>	0,0054	< 0,001	Cte = 2,317
	O <sub>3</sub>	0,0097	< 0,001	R <sup>2</sup> = 0,398 <i>p</i> < 0,001
<b>rank CAT</b>	T	-1,979	< 0,001	Cte = 47,205 R <sup>2</sup> = 0,491 <i>p</i> < 0,001
<b>Ln GR</b>	T	-0,0561	0,018	Cte = 2,562
	O <sub>3</sub>	-0,0896	0,038	R <sup>2</sup> = 0,315 <i>p</i> < 0,001
<b>Ln APX</b>	T	0,0104	< 0,001	Cte = 6,122
	O <sub>3</sub>	0,0896	0,012	R <sup>2</sup> = 0,439 <i>p</i> < 0,001
<b>Exp SOD</b>	T	0,154	0,046	Cte = 1,655 R <sup>2</sup> = 0,262 <i>p</i> < 0,001
<b>rank MDA</b>	O <sub>3</sub>	0,998	0,041	Cte = 20,808 R <sup>2</sup> = 0,255 <i>p</i> < 0,001

## **Discussão**

O perfil temporal dos óxidos de nitrogênio no interior da câmara de ar não filtrado se pareceu, em parte, com o geralmente observado em condições naturais na região de Cubatão. Segundo Gallardo *et al.* (2012), o aumento das concentrações de NO<sub>x</sub> naquela região geralmente ocorre durante o inverno, que se caracteriza por um período seco com céu claro e inversões térmicas. No presente estudo, houve aumentos de NO nos períodos de inverno. Contudo, os valores mensais médios mais altos ocorreram no verão de 2010. Isto pode ser explicado pela proximidade entre o local de estudo e a rodovia Cônego Domênico Rangoni, por onde circula grande número de veículos no verão em direção ao Guarujá, Bertioga e a outras cidades litorâneas.

A emissão de NO<sub>x</sub> e Compostos Orgânicos Voláteis por fontes antropogênicas e biogênicas são os dois principais precursores que levam à formação de ozônio ao nível do solo, que ocorre de forma mais intensa em dias ensolarados e quentes (Collet *et al.* 2012). O levantamento das concentrações no interior das câmaras ANF foi coerente com tal descrição, tendo sido observada a tendência de aumento das concentrações médias no interior das câmaras nas primaveras de 2010 e 2011.

Segundo Pieper *et al.* (2011), as temperaturas em câmaras de topo aberto tendem a ser mais quentes no meio do dia e mais frias à noite. Em estudo realizado para análise da capacidade de reprodução sob aumento de aquecimento, os autores constataram que a temperatura teve efeitos positivos sobre a característica reprodutiva das plantas, pois o aumento da temperatura pode influenciar indiretamente na disponibilidade ou captação de nutrientes (Nadelhoffer *et al.* 1997). Nessas condições, podem-se esperar variações nas respostas antioxidativas das plantas, mesmo naquelas submetidas ao ar filtrado, o que parece ter ocorrido no presente estudo.

Portanto, as respostas antioxidativas medidas nas plantas dos experimentos realizados nas câmaras de topo aberto devem ser analisados de forma integrada e com

base nos parâmetros de poluição e de clima. Os resultados das análises multivariadas, inclusive, apontam para essa interferência múltipla. Assim, observa-se que nas 1ª e 2ª exposições, houve um aumento da concentração de poluentes atmosféricos, bem como da temperatura e diminuição da umidade relativa do ar. Já nas 3ª e 4ª exposições, as plantas cresceram sob menores índices de poluentes e de temperatura e umidade relativa do ar mais alta. Portanto, houve uma condição de estresse oxidativo mais intensa nas duas primeiras exposições do que ocorreu nas outras exposições subsequentes, sendo esperadas, portanto, as mudanças mais evidentes verificadas nos níveis de defesas antioxidativas nas plantas, sob tais condições. Em contraste, a concentração mais baixa de poluentes atmosféricos nas exposições 5 e 6 pareceram não interferir na concentração e atividade dos antioxidantes estudados, o que pode ser comprovado pela ausência de diferença estatística na 6ª exposição.

Em relação à concentração de ácido ascórbico, as mudanças no conteúdo foliar ao longo dos 90 dias de exposição, dependeram do período em que foi realizado o experimento e do tratamento em que as plantas cresceram. Após 90 dias da 3ª exposição, por exemplo, a concentração de AsA estava significativamente mais alta e a de DHA mais baixa nas plantas expostas ao ar filtrado (AF) do que aos 45 dias de exposição. O nível de AsA diminuiu significativamente e o de DHA aumentou no final da exposição nas plantas que cresceram sob ar não filtrado (ANF) na mesma exposição. Nessa exposição, tais mudanças resultaram em um aumento da capacidade de oxirredução do ácido ascórbico (indicada pela razão  $AsA/AsA+DHA$ ) ao longo do tempo, tanto nas plantas mantidas sob ar filtrado quanto sob ar não filtrado. A partir da 4ª exposição, na maioria dos casos, o nível foliar de ácido ascórbico e a capacidade de oxirredução não variaram significativamente ao longo do tempo nas plantas submetidas ao ar filtrado e ao ar não filtrado. Já no ambiente externo (CEPEMA), a concentração de

ácido ascórbico não mudou significativamente ao longo do tempo, assim como a capacidade de oxi-redução do ácido ascórbico.

As mudanças no conteúdo foliar de glutathiona ao longo do tempo, por sua vez, foram geralmente similares nas plantas submetidas aos três tratamentos (AF, ANF e CEPEMA). Na maioria dos casos, a concentração da glutathiona reduzida (GSH) foi significativamente menor no final do experimento do que aos 45 dias, mas o nível de GSSG não foi alterado. Já a capacidade de oxi-redução da glutathiona permaneceu inalterada no decorrer do experimento, independentemente do tratamento nas exposições 1 e 3, e foi significativamente maior aos 90 dias do que aos 45 dias das exposições 2 e 4. Como já foi evidenciado nos experimentos de campo, a glutathiona parece ser um composto antioxidante chave para a *T. pulchra*.

Em geral, o conteúdo de malondialdeído, indicador da peroxidação lipídica, variou significativamente ao longo dos 90 dias de duração das 1ª e 2ª exposições, fato não observado nas demais exposições realizadas. Houve um aumento de sua concentração aos 90 dias, nas plantas de todos tratamentos, quando comparados às plantas expostas por 45 dias.

O conteúdo de malondialdeído, que estava significativamente mais alto no final das exposições 1 e 2, tanto nas plantas do tratamento AF quanto nas do ANF, é um indicativo de perda de capacidade antioxidativa ao longo do tempo. As mudanças observadas nos níveis de respostas antioxidativas reforçam essa suposição. No decorrer das duas primeiras exposições das plantas câmaras AF e ANF, houve a diminuição da concentração de glutathiona total, que se tem mostrado um importante antioxidante para a espécie em estudo. Ainda registraram-se, em alguns casos, a diminuição da atividade da superóxido dismutase e ascorbato peroxidase e aumento da atividade da catalase (na 1ª exposição, principalmente) e da glutathiona redutase. Já nas 3ª e 4ª exposições, sob

menores índices de poluentes e de temperatura e umidade relativa do ar mais alta, houve indício de maior equilíbrio oxidativo. O conteúdo de MDA, assim como de ácido ascórbico e glutathiona totais não foi alterado ao longo do tempo nas plantas das câmaras AF e ANF. A atividade da superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e de catalase igualmente se manteve similar entre 45 e 90 dias de experimento.

Quando analisados os resultados das concentrações e atividades dos antioxidantes e comparados ao funcionamento no ciclo Halliwell-Foyer-Asada – o ciclo ascorbato-glutathiona – observa-se que nas 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> exposições a catalase parece compensar a ascorbato peroxidase, convertendo, por exemplo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) a O<sub>2</sub> (oxigênio) e H<sub>2</sub>O (água) e apesar do aumento da glutathiona redutase, há menores índices de glutathiona, ou seja, a atividade enzimática está alta, porém não regenera a glutathiona, podendo levar ao rompimento do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Nas 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> exposições, os níveis de glutathiona redutase mostraram-se aparentemente eficientes para regenerar a glutathiona à sua forma reduzida, dando assim continuidade ao ciclo. A superóxido dismutase mostrou-se eficiente na sua função de dismutar o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (radical superóxido) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, e em seguida, a ascorbato peroxidase reduz esse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O, utilizando o ascorbato como doador de elétrons.

A análise multivariada elaborada no presente capítulo comprovou que pelo menos parte das variações no sistema de defesas antioxidativas de *T. pulchra* foi explicada pela ação conjunta de poluentes e temperatura, como foi o caso da glutathiona redutase e da ascorbato peroxidase.

O aumento dos índices de NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> levaram à redução da concentração de ácido ascórbico e aumento da concentração da glutathiona e ascorbato peroxidase. Esse fato indica que há oxidação do ácido ascórbico e concomitante redução da glutathiona, intensificando as defesas contra as espécies reativas de oxigênio, sem participação de

fatores abióticos, como a temperatura. Relações muitas vezes similares foram encontradas no estudo realizado em condições naturais de campo (ver capítulo II, tabela 2).

O NO<sub>2</sub> é um forte marcador de emissão veicular, de modo que outros poluentes oxidativos, de mesma origem, podem ter contribuído para a intensificação das defesas antioxidativas. O material particulado pode ser um deles, embora não tenha sido monitorado no interior das câmaras de topo aberto. Em trabalho realizado por Rinaldi *et al.* (2012) no mesmo local de Cubatão (CEPEMA), observou-se que um grande número de veículos movidos ao longo da rodovia em direção à costa, durante a primavera e verão, contribuiu para o aumento de partículas atmosféricas e de HPAs. Estudos realizados por Netto *et al.* (2007), Miguel (1998) e Abrantes *et al.* (2009) comprovaram que no Brasil há predominância de naftaleno, fluoranteno, antraceno e pireno provenientes da emissão veicular. Rinaldi *et al.* (2012) ainda concluíram que os HPAs encontrados em Cubatão são oriundos de fontes veiculares e petroquímicas, e que suas emissões e concentrações foram influenciadas pelas chuvas e altas variações de temperatura observadas em seu estudo.

A relação positiva entre o acúmulo de malondialdeído e O<sub>3</sub> demonstra que, apesar do aumento de defesas antioxidativas, o O<sub>3</sub> levou à peroxidação lipídica nas plantas de *T. pulchra*. Em estudo realizado por Silva (2012) com *T. pulchra* exposta na região de Cubatão, não houve diferença na fotossíntese, porém o crescimento das plantas foi reduzido, indicando que os indivíduos utilizaram os produtos fotoassimilados preferencialmente na manutenção e reparo de danos. Com isso, não é possível afirmar que o estresse oxidativo iniciado ao nível celular sempre progredirá para níveis de organização celular.

A temperatura afetou basicamente a atividade dos compostos enzimáticos – superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase e catalase – como já encontrado em estudos realizados com *Nicotiana tabacum* “Bel W3” (Esposito *et al.* 2009, Dias *et al.* 2011), *Caesalpinia echinata* Lam. (Bulbovas *et al.* 2010) e *Ipomea nil* “Scarlet O’Hara” (Dafre *et al.* 2011). Além disso, as condições meteorológicas também podem agir sobre a condutância estomática de plantas, de modo a interferir na sua capacidade de desintoxicação (Dafre *et al.* 2011).

## **Conclusão**

No estudo realizado em câmaras de topo aberto, o impacto dos poluentes, nos níveis observados na região de Cubatão durante o período experimental, alterou os níveis de respostas antioxidativas de *T. pulchra*, aumentando sua capacidade de tolerar o estresse oxidativo. A glutatona, em sua forma reduzida, bem como as enzimas catalase e ascorbato peroxidase, foram as principais defesas responsáveis por esse aumento de tolerância.

## **Referências Bibliográficas**

- Abrantes, R., Assunção, J.V., Pesquero, C.R., Bruns, R.E., Nóbrega, R.P.** 2009. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from gasohol and ethanol vehicles. *Atmos. Environ.* 43 (3) 648 – 654.
- Abuja, P.M. & Albertini, R.** 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 306: 1-17.
- Allen, C.D., Macalady, A. Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Gonzales, P., Hogg, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Fenshan, R. Zhang, Z., Kitzberger, T., Lim, J.H., Castro, A., Running, S.W., Allard, G., Semerci, A., Cobb, N.** 2009. Drought-induced forest mortality: a global overview reveals emerging climate change risks.
- Bulbovas. P., Moraes, R.M., Rinaldi, M.C.S., Cunha, A. L., Delitti, W.B.C., Domingos, M.** 2010. Leaf antioxidants fluctuations and growth responses in

samplings of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) under an urban stressing environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 664 – 670.

- CETESB.** 2011. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2010. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. P.309.
- Collet, N.** 2012. Short and long term effects of prescribed fires in autumn and spring on surface-active arthropods in dry acleorophyl eucalypt forests of Cictoria. *Forest Ecology and Management*. 182 (1-3): 117 – 138.
- Dafré-Martinelli, M., Nakazato, R.K., Dias, A.P.L., Rinaldi, M.C.S., Domingos, M.** 2011. The redox state of Ipomea ni “Scarlet O’Hara” growing under ozone in a subtropical área. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (74): 1645 – 1652.
- Dias, A.P.L., Dafré, M., Rinaldi, M.C.S., Domingos, M.** 2011. How the redox state of tobacco “Bel W3” is modified in response to ozone and other environmental factors in a sub tropical area? *Environmental Pollution* 159: 458 – 465.
- Esposito, M.P., Ferreira, M. L., Sant’Anna, S.M.R., Domingos, M.** 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* “Bel W3” under environmental conditions in Sao Paulo, SE. *Atmospheric Environment* 43: 619 – 623.
- Jasinski, R., Pereira, L.A.A., Braga, A.L.F.** 2011. Air pollution and pediatric hospital admissions due to respiratory diseases in Cubatão, São Paulo State, Brazil, from 1997 to 2004. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 27(11): 2242 – 2252.
- Gallardo, L.; Escribano, J.; Dawidowsky, L.; Rojas, N.; Andrade, M.F.; Osses, M.** 2012. Evaluation of vehicle emission inventories for carbon monoxide and nitrogen oxides for Bogotá, Buenos Aires, Santiago and São Paulo. *Atmospheric Environment*. 47: 12 – 19.
- Gill, S.S. & Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 12: 909 – 930.
- Nadelhoffer, K. J., Shaver, G. R., Giblin, A., and Rastetter, E. B.** 1997: Potential impacts of climate change on nutrient cycling, decomposition, and productivity in arctic ecosystems. In Oechel, W. C., Callaghan, T. V., Gilmanov, T., Holten, J. I., Maxwell, B., Molau, U., and Svensbjornsson, B. (eds.), *Global Change and Arctic Terrestrial Ecosystems*. New York: Springer-Verlag, 349–364.
- Netto, A.D.P., Barreto, R.P., Moreira, J.C., Arbilla, G.** 2007. Spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Terminallia catappa* L. (Combretaceae) bark for a selected heavy road traffic area of Rio de Janeiro city, Brazil. *J. Hazard. Mater.* 142: 389 – 396.
- Mesquita, G.L., Tanaka, F.A.O., Cantarella, H., Jr. D.M.** 2011. Atmospheric absorption of fluoride by cultivated species. Leaf structural changes and plant growth. *Water Air Soil Pollution* 219: 143 – 156.

- Miguel, A.H.** 1998. On-road emissions of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon gasoline and diesel vehicles. *Environ. Sci. Technol.* 32: 450 – 455.
- Pieper, S.J.; Loewen, V.; Gill, M.; Johnstone, J.F.** 2011. Plant response to natural experimental variations in air temperature in Alpine Tundra, Southern Yukon, Canada. *Arctic, Antarctic and Alpine Research.* 43 (3): 442 – 456.
- Possamai, F.P., Junior, S.A.J., Parisotto, E.B., Moratelli, A.M., Inácio, D.B., Garlet, T.R., Dal-Pizzol, F., Filho, D.W.** 2010. Antioxidant intervention compensates oxidative stress in blood of subjects exposed to emissions from a coal electric-power plant in south Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30: 175 – 180.
- Rinaldi, M.C.S., Domingos, M., Dias, A.P.L., Esposito, J.B.N., Pagliuso, J.D.** 2012. Leaves of *Lolium multiflorum* “Lema” and tropical tree species as biomonitors of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79: 139 – 147.
- Silva, D.T.** 2012. Respostas fisiológicas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. expostos à contaminação atmosférica no entorno de uma refinaria de petróleo em Cubatão, SP. Dissertação de mestrado. 129 p.

**CAPÍTULO IV**  
**DISCUSSÃO GERAL**

Conforme já ressaltado nos capítulos anteriores, *Tibouchina pulchra*, espécie pioneira da Floresta Atlântica, tem se mostrado tolerante ao estresse oxidativo imposto por poluentes atmosféricos nos níveis observados na região de Cubatão, contribuindo significativamente para a caracterização fisionômica e estrutural da floresta na região (Leitão Filho 1993). Vários estudos demonstraram a capacidade de *T. pulchra* de acumular elementos tóxicos, como metais, enxofre e flúor (Klumpp *et al.* 1998, 2000, 2002; Furlan *et al.* 1999, 2004, 2007; Moraes *et al.* 2003; Domingos *et al.* 2003 e Szabo *et al.* 2003). Outros trabalhos, como os de Moraes *et al.* (2000) e Klumpp *et al.* (2000), demonstraram que o nível de alguns antioxidantes, entre os quais ácido ascórbico e peroxidases, são alterados em plantas de *T. pulchra* expostas aos poluentes de origem industrial na região de Cubatão. Com base nesses resultados, foi possível supor que *T. pulchra* possui capacidade de oxi-redução eficiente, que ainda precisa ser caracterizado. Por isso, essa espécie foi adotada como bioindicadora modelo para monitorar riscos associados a uma nova situação de contaminação atmosférica por poluentes com potencial oxidativo no entorno da refinaria de petróleo instalada no complexo industrial de Cubatão. Este é o tema central desta Tese de Doutorado.

Para diminuir os problemas ambientais decorrentes da alta emissão de poluentes pela refinaria, a empresa operadora desta trocou tal sistema de caldeiras movidas a óleo combustível para geração de energia e vapor por uma termoelétrica movida a gás natural, com início de operação em 2010. Entre os benefícios esperados dessa mudança, inclui-se a redução dos níveis de compostos gasosos de enxofre e de nitrogênio e de material particulado no ar (Petrobrás 2009). Sendo assim, no presente projeto, testamos as hipóteses de que haveria diminuição de riscos oxidativos impostos por compostos gasosos de enxofre e de nitrogênio e de material particulado após o início de operação da termoelétrica, pelo menos na área de influência da refinaria e que tal ganho em

qualidade ambiental poderia ser dimensionado por meio de biomonitoramento ativo, com *T. pulchra*, analisando-se indicadores de sua capacidade de oxi-redução.

O biomonitoramento teve início antes e término após o início da operação do novo sistema de co-geração de energia e vapor. Periodicamente, foram analisados indicadores de capacidade de oxi-redução e de danos em membranas, em plantas expostas em locais situados no entorno da refinaria, cujos resultados foram mostrados no capítulo II. Além disso, as plantas jovens de *T. pulchra* também foram expostas ao ar filtrado e não filtrado, em um sistema de câmaras de topo aberto, instalado na área de influência da refinaria, cujos resultados foram discutidos no capítulo III.

No capítulo II, foi comprovado que a troca do sistema de energia da refinaria (Fase Pós-UTE) foi crucial para diminuição dos níveis de SO<sub>2</sub>, comprovada pelo monitoramento realizado rotineiramente pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Embora tenha havido a diminuição de SO<sub>2</sub>, as defesas antioxidativas de *T. pulchra* variaram bastante ao longo dos 11 experimentos ali realizados, cobrindo todas as fases de troca do sistema de produção de energia pela refinaria de petróleo, em resposta ao aumento dos níveis de NO, NO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub>, poluentes atmosféricos de alto poder oxidativo.

Os antioxidantes não enzimáticos – ácido ascórbico e glutathione – foram aqueles mais significativos para demonstrar o estado redox das plantas expostas a aquela situação específica de estresse.

As condições meteorológicas também afetaram e se correlacionaram com a atividade antioxidativa da planta e com a formação dos poluentes atmosféricos.

Portanto, nesse capítulo, rejeitou-se a primeira hipótese proposta, já que não houve a diminuição de riscos oxidativos impostos pelos poluentes associados à troca de sistema de geração de energia e vapor para a refinaria de petróleo, ainda que as

concentrações de SO<sub>2</sub> tenham diminuído. A segunda hipótese proposta foi comprovada, visto que a mudança na qualidade do ar pôde ser dimensionada por meio do biomonitoramento de *T. pulchra* através da análise de seu sistema de defesa antioxidativo.

No capítulo III, onde foi descrito o experimento de fumigação em câmaras de topo aberto, os níveis de NO e NO<sub>2</sub> monitorados no interior da câmara de ar filtrado foram, em geral, semelhantes aos níveis encontrados no experimento em campo. Já sob condições controladas, as plantas responderam também às variáveis climáticas, como temperatura e umidade (principalmente as respostas enzimáticas) e também à ação conjunta dos dois fatores, como poluentes e temperatura, no caso da glutathione redutase e ascorbato peroxidase.

O aumento da concentração de poluentes – como o NO<sub>2</sub> e o O<sub>3</sub> – levaram à redução da concentração de ácido ascórbico e aumento da concentração de glutathione e da enzima ascorbato peroxidase.

No estudo em câmaras, a glutathione e as enzimas catalase e ascorbato peroxidase foram as principais responsáveis por manter a tolerância de *T. pulchra* ao estresse oxidativo oriundo de poluição atmosférica na região. Dessa forma, o objetivo proposto foi alcançado: os níveis de respostas oxidativas de *T. pulchra* foram de fato alterados pelos poluentes atmosféricos da região.

Contudo, o conteúdo de MDA, que foi o indicador de danos oxidativos às membranas celulares, monitorado nas plantas de *T. pulchra* utilizadas em ambas as etapas experimentais, também aumentou em resposta ao aumento do poder oxidativo da atmosfera após a partida da usina termoeletrica. Esse resultado parece indicar que o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante, conforme definido por Jaleel *et al.* (2009), pode não ter sido alcançado. Disto surge a dúvida se os danos oxidativos detectados nas

membranas celulares foram projetados para os níveis superiores da organização biológica. De acordo com Silva (2012), que desenvolveu seu estudo paralelamente a este, as trocas gasosas não foram reduzidas significativamente ao longo do período experimental em campo, mas houve mudanças na alocação de biomassa entre raízes e parte aérea da planta, que são indicadoras de toxicidade geralmente verificada em árvores que crescem em ambientes poluídos ou de aumento de produtividade, em plantas que crescem em ambientes enriquecidos por nutrientes como o nitrogênio, por exemplo.

Finalmente, será necessário estender a análise das concentrações atmosféricas dos poluentes rotineiramente monitorados pela CETESB, no Centro de Cubatão, que recebe a influência das emissões da refinaria de petróleo. Esse acompanhamento teria a finalidade de verificar se a mudança no perfil da qualidade do ar na região, coincidente com o início de funcionamento da termoelétrica, persistirá no futuro, como tem sido verificado até o momento (conforme figura 4, do capítulo II). Em paralelo, sugere-se, inclusive, a continuidade do biomonitoramento por um período mais longo, não somente com *T. pulchra*, que é tolerante ao estresse oxidativo, mas também com espécies mais sensíveis.

### **Referências Bibliográficas**

- Domingos, M., Klumpp, A., Rinaldi, M.C.S., Modesto, L., Klumpp, G., Delitti, W.B.C.** 2003. Combined effects of air and soil pollution by fluoride emissions on *Tibouchina pulchra* Cogn. at Cubatão, SE Brazil, and their relations with aluminum. *Plant and Soil* 249, 297 – 308.
- Furlan, C.M., Salatino, A. & Domingos, M.** 1999. Leaf contents of nitrogen and phenolic compounds and their bearing on the herbivore damage to *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae), under the influence of air pollutants from industries of Cubatão, São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 22: 317–23.

- Furlan, C.M., Salatino, A., Domingos, M.** 2004. Influence of air pollution on leaf chemistry, herbivore feeding and gall frequency on *Tibouchina pulchra* leaves in Cubatão (Brazil). *Biochemical Systematics and Ecology* 32, 253 – 263.
- Furlan, CM, Domingos, M. & Salatino, A.** 2007. Effects of initial climatic conditions on growth and accumulation of fluoride and nitrogen in leaves of two tropical tree species exposed to industrial air pollution. *The Science of the Total Environment* 374: 399-407.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Jaburi, H.J., Somasundaram, R., Panneerselvam, R.** 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 100 – 105.
- Klumpp, A., Domingos, M., Moraes, R. M., Klumpp, G.** 1998. Effects of complex air pollution on tree species of the Atlantic rain forest near Cubatão, Brazil. *Chemosphere* 36, 989 – 994.
- Klumpp, G., Furlan, C. M., Domingos, M., Klumpp, A.** 2000. Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Science of Total Environment* 246, 79 – 91.
- Klumpp, A., Klumpp, G. & Domingos, M.** 2002. Foliar nutrient content in tree species of the Atlantic Rain Forest as influenced by air pollution from the industrial complex of Cubatão. *Water, Air and Soil Pollution* 133: 315-333.
- Moraes, R.M., Delitti, W.B.C., Moraes, A.P.V.** 2000. Fotossíntese líquida e crescimento de *Tibouchina pulchra* Cogn. nas proximidades de indústrias petroquímicas em Cubatão, SP. *Hoehnea* 27 (1): 77-85, 4 tab.
- Moraes, R. M., Delitti, W.B.C., Moraes, J.A.P.V.** 2003. Gas exchange, growth and chemical parameters in a native Atlantic Forest tree species in polluted areas of Cubatão, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 339 – 345.
- Silva, D.T.** 2012. Respostas fisiológicas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. expostos à contaminação atmosférica no entorno de uma refinaria de petróleo em Cubatão, SP. Dissertação de mestrado. 129 p.
- Szabo, A.V., Domingos, M., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C.** 2003. Acúmulo foliar de enxofre e suas relações com alterações no crescimento de plantas jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) expostas nas proximidades do pólo industrial de Cubatão, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 26, 379 – 390.