

MAURÍCIO LAMANO FERREIRA

**RELAÇÕES ENTRE ANTIOXIDANTES E SINTOMAS VISÍVEIS
BIOINDICADORES DE OZÔNIO EM *Ipomoea nil* (L.) ROTH CV.
SCARLET O'HARA SOB EFEITO DA POLUIÇÃO AÉREA URBANA
DE SÃO PAULO**

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

**SÃO PAULO
2007**

MAURÍCIO LAMANO FERREIRA

**RELAÇÕES ENTRE ANTIOXIDANTES E SINTOMAS VISÍVEIS
BIOINDICADORES DE OZÔNIO EM *Ipomoea nil* (L.) ROTH CV.
SCARLET O'HARA SOB EFEITO DA POLUIÇÃO AÉREA URBANA
DE SÃO PAULO**

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

**ORIENTADORA: DRA. MARISA DOMINGOS
SÃO PAULO
2007**

Dedico este trabalho às futuras gerações
do nosso planeta e aos que sofrem “calados”
as conseqüências de algumas atitudes humanas.

“Em tudo, amar e servir”.

E.E. Santo Inácio de Loyola

Agradecimentos

À Deus, pela saúde e perfeição que me fez;

Aos meus heróis, meu pai Sr. Antônio Leandro Ferreira e minha mãe, Sra. Maria Lamano Ferreira, que em meio de tantas dificuldades conseguiram dar uma educação de alta qualidade aos três filhos, e mais, nos formaram com valores dignos e leais;

Aos meus irmãos, que mantêm acesa a chama da Irmandade e tanto me ajudaram para que eu pudesse executar esse projeto de mestrado;

À minha tia Eliana que sempre torceu e ainda torce muito por mim, mulher que eu tenho como uma mãe;

Aos meus queridos avós (*in memoriam*), “vô” Antônio e “vó” Isabela que presenciaram meu esforço e ingresso no curso de mestrado, mas partiram dessa vida antes que eu o terminasse, e a minha “vó” Alice que foi um grande exemplo de mulher;

Aos amigos e familiares que sempre me apoiaram e ouviram meus desabafos nos momentos difíceis e também alegres que passei ao longo desses dois anos e meio;

À Alessandra Ribeiro de Moraes por entender as prioridades em minha vida em muitos momentos e por ter deixado uma grande marca de amor;

À Daniela Robles Mineto que me ajudou e encorajou a ultrapassar algumas barreiras difíceis durante a execução deste projeto;

À Anelise Tessaro pela companhia nos momentos finais da redação e impressão da dissertação;

À Marísia, Silvinha, Adriana, Lilian, Juliana, Elizabeth, Cristina, Robson, Yukio e todos os colegas da seção de ecologia que sempre foram grandes parceiros de laboratório e de conversa;

À Jéssica, uma grande amiga que me ajudou na execução das análises dos antioxidantes em laboratório e dividiu comigo alguns momentos “especiais” durante este período;

À doutoranda Andrea que me deu o prazer da sua companhia nos “almoços” ao longo desses dois anos e meio de curso e sem dúvida uma grande amiga, na qual eu tenho um carinho especial;

À Dra. Patrícia Bulbovas, Dra. Regina Maria de Moraes, Dra. Márcia Lopes, Dr. Eduardo Cabral, Dra. Mirian Rinaldi, e todos os pesquisadores da seção de ecologia pela atenção dada em momentos de dúvidas para a realização de algumas etapas do projeto;

À Dra. Carla Ferragut pelo auxílio dado nas PCA's e CCA deste trabalho;

Às “panteras”, Marli, Dorinha, Val e Amarilis que sempre me ajudaram no trabalho de laboratório e de campo;

À minha orientadora Dra. Marisa Domingos, que é um exemplo de bióloga, amiga e uma pessoa extremamente cativante. Muito presente e preocupada com a minha formação científica. Ensinou-me a amar a pesquisa através de seus exemplos. Uma professora exemplar!

À Dra. Silvia Ribeiro de Souza pela acolhida ao Instituto de Botânica e orientação no aperfeiçoamento científico;

À seção de fisiologia por dividir o uso de alguns equipamentos e pelo espaço cedido para execução de algumas atividades deste projeto;

Ao professor Dr. Marcos Buckeridge e ao departamento de botânica do instituto de biociências da Universidade de São Paulo por dividir o espaço e utilização de alguns materiais durante uma etapa da realização deste projeto;

Ao Instituto de Botânica pela oportunidade do curso de pós-graduação e pelos serviços oferecidos, entre eles, os de transporte até o campo experimental;

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Botânica pela compreensão em determinados momentos e pelos serviços oferecidos;

À Bia e a todos os funcionários de limpeza que sempre cuidaram do ambiente de trabalho;

A todos os professores que dividiram parte dos seus conhecimentos comigo durante as disciplinas que cursei para a obtenção dos créditos exigidos, em especial a professora Dra. Edenise Segala e ao professor Dr. Adalto Ivo Milanez;

A CAPES pela bolsa de estudo oferecida durante parte do curso de mestrado;

À CETESB por fornecer os dados climáticos e de poluição utilizados neste trabalho e pela paciência e atenção que tiveram durante os momentos sem monitoramento;

Resumo

As atividades industriais dos grandes centros urbanos e o aumento da frota veicular vêm contribuindo de forma significativa para uma maior contaminação aérea. Entre os poluentes atmosféricos, o ozônio (O_3) é considerado o mais tóxico devido à sua capacidade de reagir com a água nos tecidos dos organismos vivos e formar espécies ativas de oxigênio (EAO), como por exemplo, radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Essas moléculas têm um alto poder oxidativo e podem reagir com membranas lipídicas destruindo-as. Um dos mecanismos de defesa da planta contra a ação dessas EAO está justamente na eficiência do seu sistema de defesa antioxidativo, formado por enzimas como superóxido dismutase (SOD), peroxidases (POD) e também por vitaminas, como o ácido ascórbico (AA). Neste estudo, objetivou-se avaliar o potencial bioindicador de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara para o ozônio troposférico da cidade de São Paulo, em função de sua sensibilidade a esse poluente, comprovada em estudos anteriores. Para tanto, determinaram-se as relações entre as variações em fatores ambientais (climáticos e poluentes) e nos níveis desses antioxidantes e entre essas e a intensidade de injúrias foliares em plantas expostas em dois ambientes distintos, um deles isento de poluição, simulado em casa de vegetação e outro poluído por altos índices de ozônio, situado no parque do Ibirapuera. Lotes distintos da cultivar foram expostos, nos dois locais, ao longo de 28 dias de cada estação do ano. A cada três ou quatro dias, cinco plantas de cada ambiente eram analisadas quanto a concentração de AA, atividade de SOD e POD e porcentagem de área foliar afetada por injúrias visíveis. Observou-se que tanto as plantas expostas na casa de vegetação, quanto as plantas expostas no parque do Ibirapuera apresentaram uma variação sazonal nos níveis de antioxidantes e que a estação de primavera foi o período na qual se registrou uma maior eficiência do sistema de defesa das plantas. Análises de correlações e de regressões multivariadas mostraram que alguns fatores ambientais, tais como temperatura, umidade relativa, radiação e ozônio apresentaram uma significativa influência no perfil antioxidativo das plantas, fato esse que em determinados períodos do ano retardou o surgimento e a progressão de injúrias foliares visíveis, podendo comprometer, assim, o uso de *Ipomoea nil* como planta bioindicadora de O_3 em São Paulo, dependendo das condições ambientais durante o biomonitoramento.

Abstract

The industrial activities of megacities and the increasing of vehicle fleet have contributed significantly for high air contamination. Among all atmospheric pollutants, ozone (O_3) is considered the most toxic due to its capacity of reacting with water in alive tissues forming reactive oxygen species (ROS), such as radical superoxide, hydrogen peroxide and radical hidroxila. Some of these molecules are extremely oxidative and may react with cell membranes destroying them. A defensive mechanisms of plantas against the effects of these ROS is the high efficiency of their antioxidative system, formed by enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), peroxidases (POD) and also by vitamins, as ascorbic acid (AA). This study aimed to evaluate the potential of *Ipomoea nil* as a bioindicator specie of tropospheric ozone in São Paulo city, troughout its sensibility to the pollutant, showed in previous studies. In such way, it was determined the relations between the variations in environmental factors (climatic and pollutants) and levels of antioxidants, and between these factors and the intensity of foliar injuries in plants exposed in two distinctic environments , one of them exempt of pollution, called casa de vegetação (greenhouse), and another polluted by high ozone concentrations, localized at Ibirapuera Park. Distinct lots of the cultivar were exposed throughout 28 days of each season of 2006. Each three or four days, five plants of each environment were analyzed for the concentration of AA, activity of SOD and POD and percentage of visible injuries. It was observed that plants exposed in both environments presented a sazonal variation in the antioxidant levels and also the spring was the season which was registered the high efficiency of the antioxidative system. Analyses of correlations and multivaried regressions showed that some ambient factors, such as temperature, relative humidity, radiation and ozone had a significant influence in the antioxidative system. This fact might have delayed the sprouting of visible injuries in some periods of the year, thus compromising the use of *Ipomoea nil* as bioindicator plant of O_3 .

Índice

Capítulo 1. Introdução geral.

Introdução geral	02
Referências bibliográficas	16

Capítulo 2. Caracterização sazonal das defesas antioxidativas de *Ipomoea nil* cv. *Scarlet O'Hara*

Introdução	23
Material e métodos.....	25
1. Cultivo de plantas de <i>Ipomoea nil</i> e campanhas experimentais.....	25
2. Análises de antioxidantes	28
3. Análises estatísticas.....	30
Resultados	31
Discussão.....	43
Referências bibliográficas	47

Capítulo 3. Variação sazonal em antioxidantes e sintomas foliares em plantas de *Ipomoea nil* cv. *Scarlet O'Hara* sob o efeito da poluição aérea da cidade de São Paulo/SP

Introdução.....	52
Material e métodos.....	55
1. Cultivo de plantas de <i>Ipomoea nil</i> e campanhas experimentais.....	55
2. Análise de danos foliares e de antioxidantes.....	59
3. Análise estatística.....	59
Resultados	60
1. Condições ambientais durante as campanhas experimentais	60
2. Antioxidantes.....	64
3. Injúrias foliares	76
Discussão.....	80
Referências Bibliográficas	87

Capítulo 4. Potencial bioindicador de *Ipomoea nil* cv. *Scarlet O'Hara* para as condições de ozônio troposférico da cidade de São Paulo/SP

Introdução.....	93
Material e métodos.....	95
Resultados e discussão	97
Referências Bibliográficas	110

Capítulo 5. Conclusões finais

Capítulo I

Introdução geral

Introdução

A população mundial tem crescido desordenadamente e junto tem surgido uma série de problemas de ordem econômica, social e principalmente ambiental. Havia uma previsão para o ano de 1998, na qual a população humana ultrapassaria seis bilhões de pessoas, concentrando mais do que a metade desse número no continente asiático (Raven *et al.* 1993). Atualmente há aproximadamente 6,5 bilhões de seres humanos habitando o planeta Terra (Revista Pangea 2007). Este crescimento demasiado não é proporcional à alocação de bens naturais escassos, o que torna o mercado de consumo e a competição econômica desiguais. Tal diferença econômica é um dos problemas que está relacionado aos problemas sociais que existem entre as diferentes nações, sendo as mais prejudicadas aquelas em desenvolvimento. Outro problema que ocorre em tais nações é a migração de famílias rurais para os grandes centros urbanos, que buscam melhores condições de trabalho, saúde e habitação, formando assim megacidades. Uma série de indústrias são instaladas próximo a esses centros, devido à facilidade de encontrar mão de obra e à possibilidade de transporte direto de mercadorias. Essas grandes metrópoles são caracterizadas, também, pela extensa frota automotiva, que muitas vezes é composta por veículos antigos ou danificados. Desse modo, a contaminação atmosférica nas megacidades de países em desenvolvimento é bastante intensa. A cidade do México, por exemplo, atrai pessoas de diversas partes do país devido ao seu desenvolvimento econômico. Esse crescimento desordenado pode ser um fator inicial de perturbações ambientais para a cidade. Segundo Molina & Molina (2004) a alta elevação que a cidade do México se encontra e a intensa radiação solar são fatores que contribuem para o processo fotoquímico e produção de ozônio e outros poluentes secundários na atmosfera. Quando a situação de poluição atmosférica se agrava em determinadas épocas, as atividades de algumas indústrias são reduzidas, o tráfego veicular fica restrito

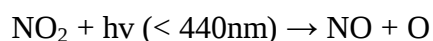
e atividades ao ar livre para as crianças são evitadas. Uma situação parecida ocorre na cidade de São Paulo, onde foi estabelecido um programa de rodízio da frota veicular devido aos altos índices de poluentes que eram emitidos na atmosfera. Entretanto, a poluição aérea não pode ser considerada apenas um problema regional de países ou cidades industrializadas, mas sim algo que deve ser de interesse comum (Treshow 1991; Klumpp *et al.* 2004). Entre as principais consequências globais da contaminação do ar estão o aumento de chuva ácida, a destruição da camada de ozônio e mudanças climáticas, com o aumento da temperatura e precipitações irregulares (Cerri *et al.* 2002). Segundo IPCC (2001), há uma expectativa no aumento de temperatura do planeta de 1,4° a 5,8° C até o final do século XXI. O aquecimento global pode causar sérios danos a agricultura e aos ecossistemas terrestres em geral. Para Klumpp *et al.* (2004), o ar limpo é um importante pré-requisito para um desenvolvimento econômico sustentável e um requisito básico para a saúde e o bem-estar dos seres humanos.

Há basicamente dois tipos de fontes de poluição atmosférica: as naturais e as antrópicas. Dentre as fontes naturais, as emissões vulcânicas e as queimadas que ocorrem em determinados biomas do planeta apresentam grandes contribuições, tendo como principais poluentes emitidos óxidos de enxofre e óxidos de carbono (Raven *et al.* 1993; Domingos *et al.* 2002). As fontes antrópicas podem ser divididas em móveis e estacionárias. As fontes móveis são principalmente a frota automotiva que emite entre outros poluentes, óxidos de nitrogênio (NO_x) e monóxido de carbono (CO) (Mayer 1999). Já as fontes estacionárias são, por exemplo, as indústrias que emitem os mais variados tipos de poluentes, dependendo da natureza de sua atividade.

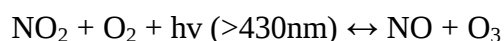
Tais poluentes podem ser considerados primários quando são emitidos diretamente de suas fontes, ou secundários quando são formados a partir de reações químicas entre os poluentes primários sob determinadas condições físicas na atmosfera. Dentre os

poluentes primários pode-se destacar os hidrocarbonetos (HC), dióxido de enxofre (SO₂), monóxido de nitrogênio (NO), material particulado (MP), dióxido de carbono (CO₂) e os compostos orgânicos voláteis (COV). Dentre os poluentes secundários destacam-se o dióxido de nitrogênio (NO₂), ácido sulfúrico (H₂SO₄), e alguns poluentes pertencentes a um processo atmosférico denominado *smog* fotoquímico, como por exemplo, o ácido nítrico (HNO₃), o nitrato de peroxiacetila (PAN) e o ozônio (O₃). Este último tem sido, indubitavelmente, um dos poluentes mais estudados devido a sua alta toxicidade.

O ozônio pode ser formado a partir da associação do oxigênio molecular mais o oxigênio atômico na presença de um corpo receptor de energia (Krupa & Manning 1988). Esse oxigênio atômico pode ser oriundo da dissociação no dióxido de nitrogênio sob um comprimento de onda de 440 nm ou da dissociação do oxigênio molecular num comprimento de onda de 200 nm, conforme a equação abaixo:

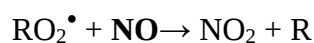
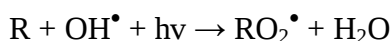


Numa condição de atmosfera não poluída, o ozônio formado é consumido, de acordo com a equação abaixo:



Porém, numa condição atmosférica poluída, o monóxido de nitrogênio pode ser consumido por radicais orgânicos oriundos de reações químicas atmosféricas ou mesmo por hidrocarbonetos emitidos da vegetação local, de modo que o ozônio não seja consumido e conseqüentemente seja acumulado na troposfera, como demonstrado nas

equações abaixo:



Esse ozônio altamente tóxico aos organismos vivos é formado na troposfera, camada da atmosfera que vai desde a superfície do planeta até aproximadamente 12 quilômetros de altura. Na troposfera, camada responsável pelas condições climáticas da Terra, ocorre a formação de nuvens, tempestades e as atividades humanas poluidoras. Nessa camada, a temperatura diminui 6,5°C por quilômetro, sendo esse chamado de gradiente vertical de temperatura a partir da superfície terrestre (Domingos *et al.* 2002, Braga *et al.* 2006).

O ozônio apresenta uma sazonalidade na sua formação, determinada pelas condições meteorológicas. Em São Paulo, existem duas estações climáticas marcantes, uma chuvosa, entre outubro e abril, e outra mais seca, que abrange o período de maio a setembro. Na estação chuvosa, centrada nos meses da primavera e verão, ocorre elevação das temperaturas médias, maior ventilação e aquecimento continental, que favorece a instabilidade continental e o aumento da nebulosidade e da precipitação, promovendo a diminuição das concentrações dos poluentes. Nesse período, quando há uma diminuição da nebulosidade e uma elevação da incidência de radiação solar, as concentrações de ozônio ultrapassam o padrão da qualidade do ar. A estação seca, por sua vez, é caracterizada não apenas pela diminuição da precipitação, mas também pela queda das temperaturas e ocorrência de grande estabilidade atmosférica, que são desfavoráveis à dispersão dos poluentes. Por isso, neste período, as concentrações dos poluentes primários são mais altas, promovendo uma situação de maior risco aos organismos vivos, em geral. Mas, por outro lado, as concentrações de ozônio e de outros poluentes do smog fotoquímico, tendem a ser reduzidas nos meses de maio a julho, quando se observa diminuição da temperatura e da radiação solar incidente (CETESB

2005).

Segundo o relatório CETESB (2005), o padrão de qualidade do ar ($160\mu\text{g}/\text{m}^3 - 1\text{h}$) e o nível de atenção ($200\mu\text{g}/\text{m}^3 - 1\text{h}$) para o ozônio na região metropolitana de São Paulo (RMSP) são freqüentemente ultrapassados, fato esse que ocorre principalmente em dias de alta insolação. No ano de 2005, por exemplo, o ozônio ultrapassou o padrão de qualidade do ar em 14% dos dias, sendo a estação localizada no parque municipal do Ibirapuera, a que marcou índices mais altos. Tem sido observada uma diminuição nos dias de ultrapassagem desses limites desde o ano de 2002 na RMSP, fato que também pode ser decorrente das variações das condições meteorológicas. Em termos de distribuição por estação do ano, a maior freqüência de dias de ultrapassagens ocorre na primavera e verão e é menor nos meses de inverno (CETESB 2004).

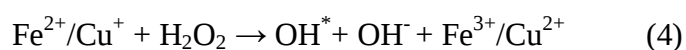
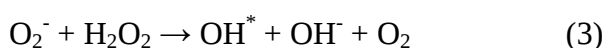
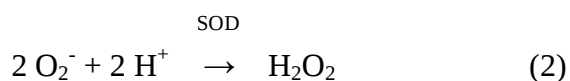
Assim como outros poluentes gasosos, o ozônio entra nas plantas pelos estômatos. Por ser uma molécula altamente reativa, pode reagir rapidamente com a água no tecido desses organismos, intensificando assim a formação de espécies ativas de oxigênio (EAO) (Kaziol & Whatley 1984; Krupa & Manning 1988; Bray *et al.* 2000; Larcher 2000; Chernikova *et al.* 2000; Strohm *et al.* 2002). Essas espécies são caracterizadas por sua alta instabilidade eletrônica e capacidade de causar danos oxidativos em biomoléculas vitais como proteínas, DNA e lipídios (Halliwell & Gutteridge 1989; Muggli 1993; Bray *et al.* 2000; Apel & Hirt 2004).

As EAO são também produzidas nos seres aeróbios como produto de algumas vias metabólicas celulares, como por exemplo respiração e fotossíntese (Foyer & Noctor 2005). Tais processos ocorrem próximo à cadeia transportadora de elétrons localizada nas mitocôndrias e cloroplastos. É estimado que mais de 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria esteja envolvido na geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Cakmak *et al.* 1993).

Outra via de formação de espécies ativas de oxigênio nas células é a redução tetravalente do oxigênio molecular à água, que requer quatro elétrons e pode gerar ao longo deste processo moléculas oxidativas, tais como o radical superóxido (O_2^-), como mostra a equação (1) e radical hidroxila (OH^*) (Winston 1990).

Ao receber dois íons hidrogênio e um elétron, o radical superóxido se converte em peróxido de hidrogênio, cuja reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), conforme a equação (2). Apesar do H_2O_2 ser uma molécula pouco reativa, ela pode ser considerada tóxica devido à sua capacidade de reagir com O_2^- , formando assim o radical hidroxila (OH^*), que tem alto poder oxidativo. Essa reação é conhecida como Reação de Haber-Weiss – equação (3).

O H_2O_2 também pode reagir com íons de metais de transição, produzindo assim o radical hidroxila. Essa reação cineticamente mais rápida é denominada Reação de Fenton – equação (4).



Por outro lado, os organismos aeróbios desenvolveram um sistema de defesas composto por uma série de substâncias antioxidativas, capaz de diminuir o poder oxidativo das EAO, garantindo sua sobrevivência ao longo do processo evolutivo. Entre as principais funções desse sistema, destacam-se a remoção de radicais livres, minimização na disponibilidade de pro-oxidantes como íons ferro e cobre e proteção de biomoléculas contra possíveis danos em suas estruturas (Halliwell & Gutteridge 1989). Segundo

Winston (1990), os antioxidantes são divididos em três classes diferentes:

- a) hidrosolúveis;
- b) lipossolúveis;
- c) Enzimáticos.

Entre os antioxidantes solúveis em água, o ácido ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C, merece um destaque especial, devido a sua eficiente ação em capturar espécies ativas de oxigênio na parte aquosa da célula, evitando assim o ataque às membranas lipídicas. O ácido ascórbico pode ser encontrado nos cloroplastos, parede celular, citossol, vacúolos e mitocôndrias (Smirnoff 1996; Potters *et al.* 2002). Dentro do aparato fotossintético, AA age na remoção do peróxido de hidrogênio, formado na fotoredução do fotossistema I. Esta reação entre AA e H_2O_2 é catalisada pela ascorbato peroxidase, que se encontra na divisa do tilacóide e também pode neutralizar H_2O_2 . Para Concklin & Barth (2004), o ácido ascórbico serve como primeira linha de defesa nas plantas superiores, uma vez que ele se encontra em grande concentração no apoplasto, apresentando, assim, um efeito direto na proteção contra o ozônio troposférico. Além da função de defesa, o ácido ascórbico também atua em sinergismo ou na regeneração da vitamina E, conhecida como α -tocoferol. Esse papel de regeneração também é exercido pela glutathione (GSH), outro antioxidante solúvel em água, atuando na redução do ácido ascórbico. GSH apresenta-se como um antioxidante multifuncional por prevenir a célula contra a ação das EAO, evitar a peroxidação lipídica, atuar na regeneração de outras espécies antioxidativas e apresentar um importante papel na prevenção da oxidação do grupo tiol de determinadas enzimas. α -Tocoferol e β -caroteno são vitaminas solúveis em gorduras com função antioxidativa. O α -Tocoferol encontra-se em grandes quantidades nas membranas dos cloroplastos e tem função de proteger e eliminar a peroxidação lipídica (Munné-Bosh 2005). Já o β -Caroteno apresenta dupla função:

além de ter um papel importante na eliminação do oxigênio singlete (Edge 1997), uma EAO de grande poder oxidativo, pode absorver energia dos estados excitados da clorofila, atuando, assim, como um agente preventivo da formação de tais espécies.

Entre os antioxidantes enzimáticos, estão a superóxido dismutase (SOD) e as peroxidases (POD). A superóxido dismutase é a enzima responsável pela dismutação do radical superóxido, na qual é produzido peróxido de hidrogênio e oxigênio (Scandalios 1993; Raychaudhuri & Deng 2000) sendo assim, alguns autores consideram sua defesa indireta pelo fato de eliminar O_2^- mas formar uma outra EAO, o H_2O_2 . Essa enzima requer um metal como cofator para sua atividade ocorrer. Segundo Fridovich (1978), existem três isoenzimas de SOD: cobre/zinco SOD (Cu/ZnSOD), normalmente encontradas em organismos eucariontes, manganês SOD (MnSOD) e ferro SOD (FeSOD), essas últimas normalmente encontradas em procariontes. Em folhas senescentes, as atividades de SOD tendem a diminuir, ao passo que a peroxidação lipídica tende a aumentar.

Algumas peroxidases, dentre elas ascorbato-peroxidase, têm um importante papel na decomposição do peróxido de hidrogênio. Segundo Iqbal *et al.* (1996), as plantas têm a capacidade de aumentar a atividade das peroxidases em função de choques mecânicos, poluição aérea e influências da sazonalidade climática.

Essas espécies antioxidativas, na realidade, atuam em conjunto, por meio de uma via metabólica denominada ciclo ascorbato-glutationa, especialmente estudada por cientistas de diversas partes do mundo (Halliwell & Gutteridge 1989) (Figura 1).

Tal sistema de defesa, na ausência de fatores de estresse que levem ao aumento da produção de EAO, é eficiente para manter o equilíbrio pro-oxidante / antioxidante nas células. Porém, esse equilíbrio pode ser rompido pela intensificação da formação dessas espécies tóxicas de oxigênio, por ação de fatores de estresse de origem natural ou

antrópica, expondo a planta, a partir de então, a uma condição caracterizada como estresse oxidativo (Muggli 1993; Bray *et al.* 2000). O ozônio, conforme mencionado anteriormente, pode levar à ruptura desse equilíbrio e ao estabelecimento do estresse oxidativo para plantas expostas sob o poluente. Outros fatores além da poluição atmosférica também podem contribuir de forma significativa para formação de EAO. Entre eles destacam-se: temperatura, umidade relativa do ar, choques mecânicos, seca, condições edáficas, velocidade de vento e invasão de patógenos (Bray *et al.* 2000).

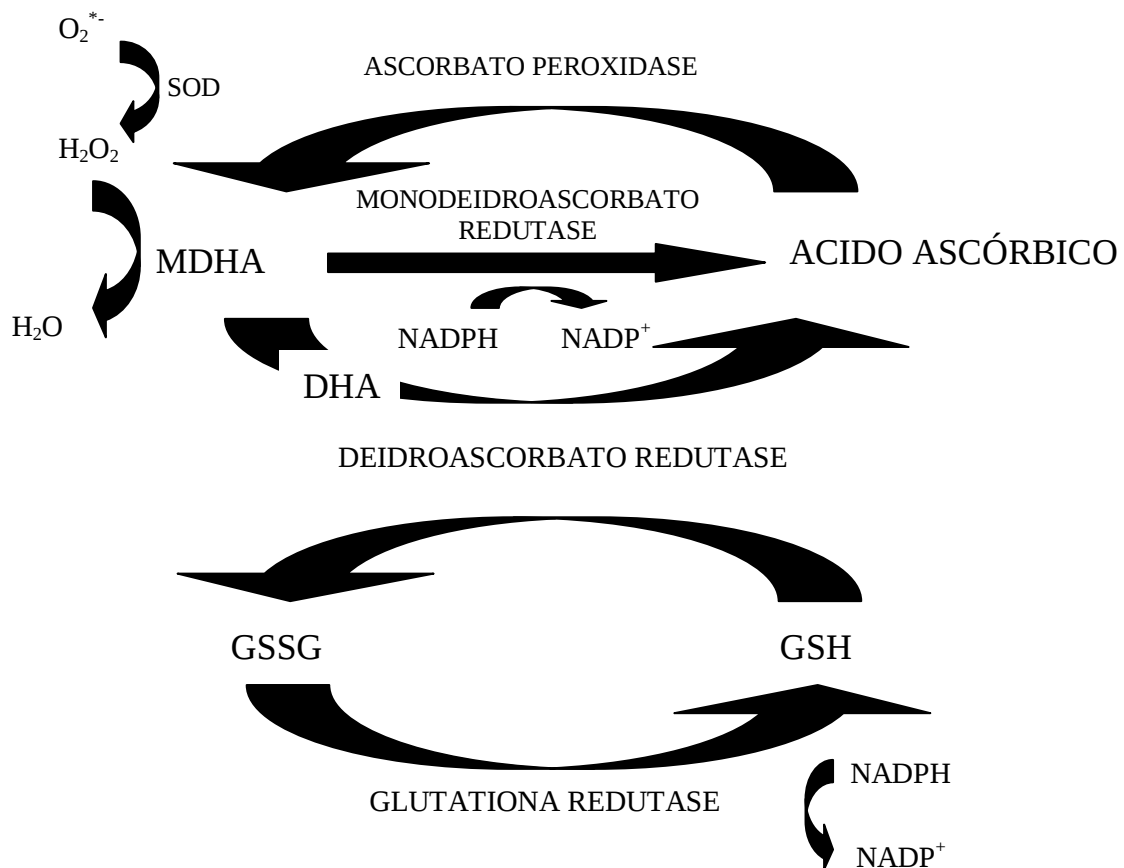


Figura 1.1. Ciclo ascorbato-glutationa (adaptado de Sharma & Davis, 1997). Radicais superóxido são eliminados pela SOD em reação que produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é consumido através de sua conversão em água por meio da oxidação do ácido ascórbico na presença da ascorbato peroxidase, resultando na formação do radical monodeidroascorbato (MDHA). O ácido ascórbico pode ser regenerado a partir de MDHA, por duas vias: pela redução enzimática, na presença de monodeidroascorbato redutase e consumo de NADPH ou pela dismutação espontânea de MDHA em deidroascorbato (DHA), que reage com glutatona reduzida (GSH), produzindo ácido ascórbico e glutatona oxidada (GSSG), reação catalizada pela deidroascorbato redutase. GSH é regenerada pela glutatona redutase, na presença de NADPH.

Segundo Krupa & Manning (1988), ocorrem mudanças na integridade das células assim

que o ozônio entra pela abertura estomática e provoca a formação de EAO no apoplasto. Por isso, normalmente as membranas lipídicas são as primeiras a serem atacadas, alterando assim, o transporte de íons e a permeabilidade de fluídos. Outro efeito oxidativo em plantas é em sua taxa fotossintética. A exposição à dose crônica de O₃ pode diminuir significativamente a abundância da rubisco em tecidos foliares maduros (Bray *et al.* 2000). O estímulo à produção de etileno e de ácido salicílico é outra consequência do efeito oxidativo causado pelo ozônio em plantas. Esses hormônios podem operar em diferentes vias de sinais de transdução que podem induzir à mudanças na expressão de alguns genes e no metabolismo (Pasqualini *et al.* 2003).

Entre as consequências macroscópicas do estresse oxidativo para plantas destacam-se a senescência prematura das folhas, redução no crescimento e alterações na partição de biomassa em resposta às alterações nas taxas fotossintéticas e o surgimento de injúrias foliares visíveis como resposta de morte celular generalizada (Domingos *et al.* 1998; Moraes *et al.* 2000; Vergé *et al.* 2002).

Contudo, a severidade dos danos oxidativos causados às plantas após a quebra do equilíbrio pro-oxidante/antioxidante, assim como a rapidez com que estes ocorrem, depende preponderantemente da eficiência com que o sistema de defesas antioxidativo é ativado na presença de determinado fator de estresse.

Em plantas tolerantes, que apresentam defesas antioxidativas eficazes, os danos oxidativos demoram mais a serem observados e sua intensidade geralmente é menor, em comparação com o que ocorre em plantas sensíveis. Em atmosfera contaminada por ozônio, é comum espécies sensíveis ao poluente manifestarem injúrias intervenais localizadas predominantemente na superfície adaxial das folhas mais velhas, as quais são visíveis ao olho nu. Essas injúrias, resultantes de perturbações celulares extensivas, podem ser classificadas como: necroses, pontuações, pigmentações e cloroses, de

acordo com a Figura 1.2.

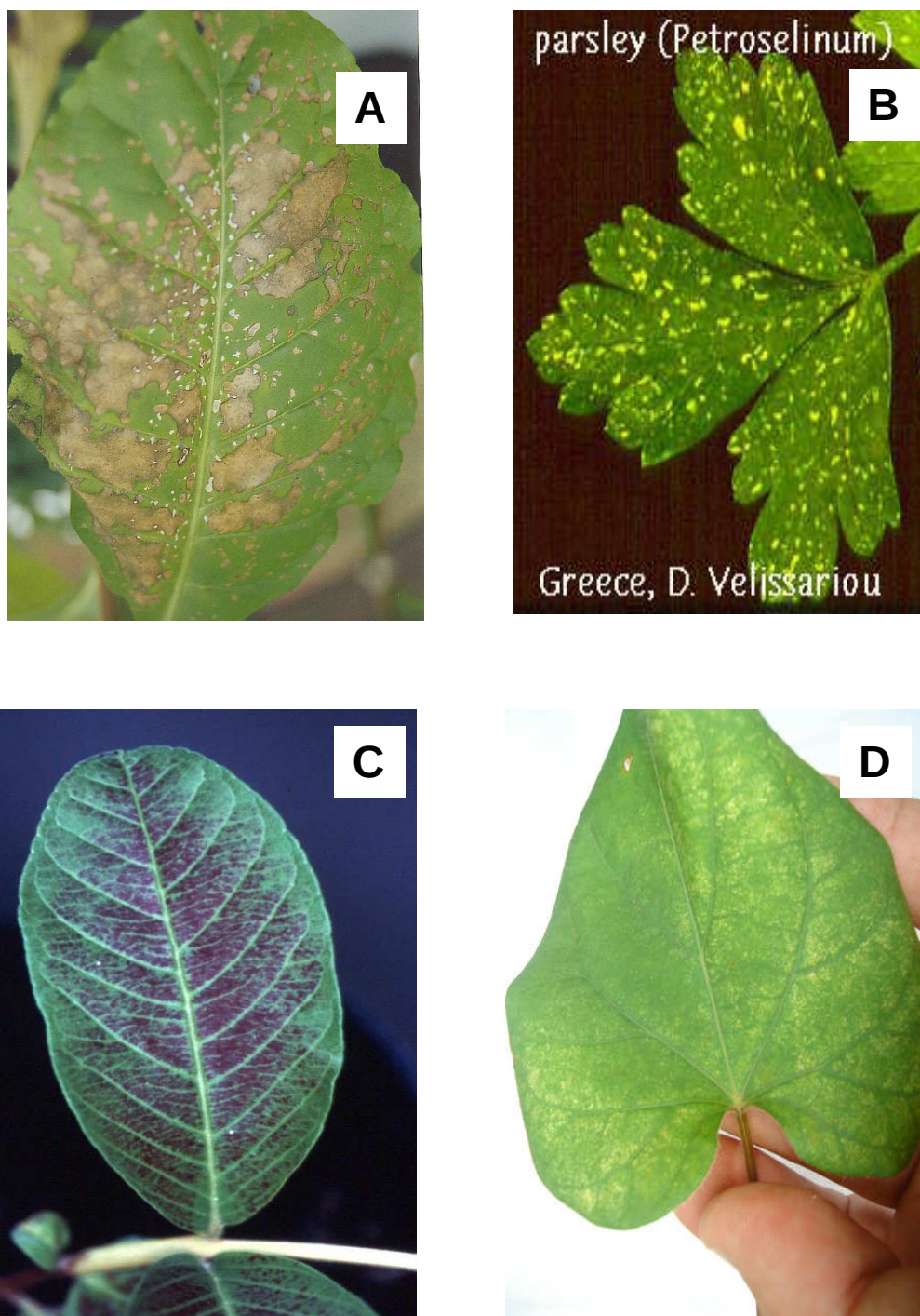


Figura 1.2. Diferentes tipos de injúrias foliares. Em “a” folha de *Nicotiana tabacum* com necroses (Foto: M. Domingos), em “b” folha com pontuações, em “c” folha de *Psidium guajava* ‘Paluma’ com pigmentações (Foto: C.M. Furlan) e em “d” folha de *I. nil* ‘Scarlet O’Hara’ com cloroses (Foto: M.L. Ferreira).

Essas respostas visíveis de plantas sensíveis ao ozônio têm servido como importantes ferramentas para o biomonitoramento da qualidade do ar. Essas plantas sensíveis foram denominadas bioindicadoras por De Temerman *et al.* (2004). Outros autores já classificaram as plantas de acordo com seu potencial bioindicador e seus sintomas, porém neste trabalho foi adotada a terminologia feita por De Temerman *et al.* (2004). Nestas, além de serem observados os mencionados sintomas visíveis, geralmente também se observam queda de folhas e de frutos e redução no crescimento.

Sob ponto de vista prático, a intensidade de área foliar afetada por sintomas visíveis tem sido predominantemente estimada em programas de biomonitoramento da qualidade do ar para indicar o impacto da poluição aérea sobre organismos vivos (VDI 2003).

Dentre os programas de biomonitoramento da qualidade do ar no mundo, o Eurobionet merece um destaque especial por ser um projeto que envolveu onze diferentes países europeus (Klumpp *et al.* 2001). Outro programa de destaque é o ICP-Forest, iniciado em 1985 com o intuito de avaliar o impacto da poluição atmosférica em florestas e tem a participação de muitos países envolvidos, entre eles 36 países europeus, Estados Unidos e Canadá (ICP Forest 2007).

Nesses programas de biomonitoramento, a indicação de riscos é geralmente baseada na estimativa visual da intensidade de área foliar afetada por sintomas visíveis. No entanto, nem sempre as mesmas plantas são utilizadas, devido ao fato delas possuírem características específicas para determinado clima. É o caso da cultivar Bel W3 de *Nicotiana tabacum*, uma planta bioindicadora sensível, padronizada e amplamente utilizada para qualificação dos níveis tóxicos de ozônio (Krupa & Manning 1988, Heggestad 1991, Klumpp *et al.* 2001, VDI 2003) e que foi empregada no Eurobionet (Klumpp *et al.* 2006).

Na cidade de São Paulo, Sant'Anna (2007) provou, a partir de experimentos em campo e em laboratório, que *N. tabacum* 'Bel-W3' é adequada para discriminar locais e épocas mais e menos afetados por ozônio. Porém, a intensidade de injúrias foliares foi pouco explicada pela concentração do poluente, o que sugere que outros fatores ambientais locais podem interferir no surgimento de danos visíveis. A autora mostrou, também, que as plantas de *N. tabacum*, devido a sua alta sensibilidade, são mais eficientes para biomonitoramento regional, quando as concentrações médias de ozônio para os 14 dias de duração da exposição das plantas (considerando os valores horários entre 8 e 20 horas de cada dia) forem inferiores a 40 ppb. O nível de contaminação atmosférica por ozônio em São Paulo, no entanto, é frequentemente maior, o que pode inviabilizar o emprego dessa planta para biomonitoramento quantitativo. Portanto, a procura de plantas bioindicadoras mais adequadas para indicar, se possível quantitativamente, a presença de ozônio em São Paulo, ainda se faz necessária. Segundo Nouchi & Aoki (1979), plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara mostraram injúrias visíveis típicas, caracterizadas por pontos cloróticos e necroses intervenais na superfície adaxial das folhas, quando expostas em sistema de fumigação ao ozônio. Os autores mostraram haver uma relação logarítmica significativa entre o grau de injúrias visíveis e doses de ozônio e estimaram que as concentrações limites de ozônio a partir da qual se observam necroses foram de 196 ppb por 1 hora e 76 ppb por 8 horas. Por esses resultados, pode-se inferir que essa cultivar é mais tolerante ao ozônio do que *N. tabacum*. Plantas dessa cultivar mostraram sintomas foliares similares quando expostas no entorno do complexo industrial de Cubatão e na cidade de São Paulo (Klumpp *et al.* 1994, Domingos *et al.* 1998), embora não tenha sido possível estabelecer relações matemáticas entre porcentagem de área foliar afetada por cloroses e necroses e os níveis de contaminação atmosférica ou variáveis meteorológicas, devido à falta de informações dessa natureza

para toda a região monitorada. Sendo assim, levantou-se a hipótese de que *Ipomoea nil* cv. Scarlat O'Hara possa ser uma planta bioindicadora apropriada para biomonitoramento de ozônio em São Paulo. Além disso, *I. nil* é uma Convolvulaceae nativa de região tropical, com ampla distribuição na região sudeste do Brasil (Simão-Bianchini 1998), podendo-se supor que é mais adaptada às condições climáticas tropicais do que *N. tabacum* Bel W3, que foi desenvolvida no Hemisfério Norte. Porém, considerando que é uma trepadeira, ou seja, uma planta adaptada a diversas situações de estresses é razoável supor que mecanismos de defesa contra fatores de estresse do ambiente sejam evidentes nessa espécie, como a ação de antioxidantes, o que poderá interferir no surgimento e na intensidade de injúrias visíveis. Portanto, é preciso investigar as relações entre fatores meteorológicos, concentrações de ozônio, defesas antioxidativas e surgimento de injúrias foliares ao longo de diferentes estações do ano, antes que se possa indicar a referida cultivar de *I. nil* para biomonitoramento de ozônio. Este foi o foco central do presente estudo, cujos objetivos foram:

- 1) Avaliar o perfil sazonal de ácido ascórbico, superóxido dismutase e peroxidases, antioxidantes integrantes do ciclo do ascorbato-glutationa, em folhas de plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlat O'Hara mantidas em ambiente não poluído e em ambiente predominantemente contaminado por ozônio, na cidade de São Paulo;
- 2) verificar se o surgimento dos primeiros sintomas foliares visíveis em plantas da *Ipomoea nil*, quando expostas no local poluído, é afetado pela ação dos antioxidantes, por fatores do ambiente ou pela interação entre eles;
- 3) determinar quais fatores, entre os do ambiente e os intrínsecos da planta (antioxidantes), interferem mais na manifestação dos sintomas foliares visíveis.

Para alcançar tais objetivos, realizou-se um estudo de campo em quatro estações do ano de 2006, na qual plantas de *I. nil* foram expostas à poluição atmosférica, em região

conhecida por ser contaminada por altos níveis de ozônio- Parque do Ibirapuera. Um outro lote de planta permaneceu num ambiente isento de poluição, com ar filtrado e climatizado, chamado casa de vegetação. Em cada estação foram analisadas a concentração de AA e atividade de SOD e POD em três folhas de cada planta e também foi quantificada a porcentagem de área foliar afetada por injúrias visíveis, afim de observar a eficiência do sistema de defesa das plantas e seu potencial bioindicador.

Os resultados serão apresentados nos três capítulos a seguir. No capítulo II, será mostrado o perfil sazonal de ácido ascórbico, superóxido dismutase e peroxidase em plantas expostas num ambiente isento de poluição. No capítulo III, será mostrado o perfil sazonal dos antioxidantes quando as plantas são expostas a um ambiente poluído e o surgimento de alguns sintomas visíveis decorrentes desta situação de estresse. Por fim, no capítulo IV será mostrado e discutido quais os principais fatores do ambiente que influenciaram a planta a aumentar sua eficiência do sistema de defesa, além de também ser discutido o potencial bioindicador de *Ipomoea nil* para as condições atmosféricas da cidade de São Paulo.

Referências bibliográficas

- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen specie: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review Plant Biology. 55:373-399.
- Braga B, Hespanhol I, Conejo J G L, Mierzwa J C, Barros M T L, Spencer M, Porto M, Nucci N, Juliano N, Eiger S. 2006. Introdução à engenharia ambiental. 2ª edição. Pearson Prentice Hall, São Paulo, pp 318.
- Bray EA, Bailey-Serres J & Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants (Buchanan BB, Gruissen W & Jones RL, eds.). American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158-

1203.

- Cakmak I., Starbac D., Marschner H. 1993. Activities of hydrogen peroxide-Scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of experimental botany*. 44: 258
- Cerri, CEP, Bernoux M, Cerri CC.2002. Influência das mudanças climáticas nos ecossistemas 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. 213-220.
- CETESB. 2004. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo – 2003. Série Relatórios.
- CETESB. 2005. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo – 2004. Série Relatórios.
- Chernicova T, Robinson J. M., Lee E. H. & Mulchi C. L. 2000. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynthesis research*. 64: 15-26
- Conklin P L, Barth C. 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, cell and environment*. 27: 959-970.
- De temerman L., Bell J. N. B., Gareec J. P., Klumpp A., Krause G. H. M., Tonneijck A. E. G. 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: *Urban air pollution, Bioindication and Environmental Awareness* (Klumpp A, Ansel W, Klumpp G) Cuvillier Verlag, Göttingen, pp 337 – 374.
- 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 MC. 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In *Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo* (Bicudo DC, Forti MC & Bicudo CEM, orgs.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 221-249.
- Edge R., McGarvey D.J., Truscott T. G. 1997. The carotenoids as anti-oxidants – a review. *Journal of photochemistry and photobiology B: biology*. 41: 189-200.
- Foyer C. H., Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, cell and environment*. 28: 1056-1071.
- Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science*. 201: 875-880.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1989. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: Oxford. achar essa referência no texto
- Heggestad H. E. 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C, and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264-291
- ICP Forest. 2007. International Co-operative programme on assessment and monitoring on air pollution effects on forests. <http://www.icp-forests.org/>
- IPCC. 2001. Climate change 2001: the scientific basis. Third Assessment Report. www.ipcc.ch/press/pr.htm
- Iqbal M, Abdin MZ, Mahmooduzzafar M. Yunus & Agrawal M. 1996. Resistance mechanism in plants against air pollution. In: *Plant response to air pollution* (M. Yunus & M. Iqbal eds). John Wiley and Sons, Chichester, p. 195-240.

- Kaziol M J, Whatley F R 1984. Gaseous air pollutants and plant metabolism. Butterworths. pp.415
- Klumpp A, Ansel W, Klumpp G. 2004. Proceedings of Eurobionet 2002 – Conference on urban air pollution, bioindication and environmental awareness. pp.21-50.
- Klumpp A., Ansel W., Klumpp G., Fomim 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.
- Klumpp A, Klumpp G. & Domingos M. 1994. Active biomonitoring at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. Environmental Pollution 85:109-16.
- Klumpp A, Ansel W, Klumpp G, Vergne P, Sifakis N, Sanz M J, Rasmussen S, Rø Poulsen H, Ribas A, Peñuelas J, Kambezidis H, He S, Garrec J P, Calatayud V. 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in european cities part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. Atmospheric environment 40: 7437-7448.
- Krupa S V & Manning W J. 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. Environmental Pollution 50: 101-137.
- Larcher W. 2000. Ecofisiologia Vegetal. Rima Artes e Textos, São Carlos.
- Mayer H. 1999. Air pollution in cities. Atmospheric environment.33: 4029-4037.
- Molina M J, Molina L T. 2004. Megacities and atmospheric pollution. Journal of the air & waste management association 54: 644-680.
- Moraes R. M., Delitti W. B. C. & Moraes J. P. V. 2000. Fotossíntese líquida e crescimento em *Tibouchina pulchra* Cong. Nas proximidades de indústrias petroquímicas em Cubatão, SP. Hoenea. 27:77-85.

- Muggli R. 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: Free radicals and antioxidantes in nutrition (F. corongiu, S. Banni, M. A. Dessi and C. Rice-Evans eds) Richelieu Press, London, p. 189-250.
- Munné-Bosh S. 2005. The role of α -Tocoferol in plant stress tolerance. *Journal of plant physiology*. 162: 743-748.
- Nouchi I & Aoki K. 1979. Morning glory as a photochemical oxidant indicator. *Environmental Pollution* 18: 289-303.
- Pasqualini S, Piccioni C, Reale I. 2003. Ozone-induced cell deth in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell deth in lesion formation. *Plant physiology* 133: 1122-1134.
- Potters G., Gara L. D., Asrd H., Horemans N. 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?. *Plant physiology biochemistry*. 40: 537-548.
- Raven P. H., Berg L. R., Johnson G.B. 1993. *Environment*. Saunders college publishing. International edition. USA, pp. 569
- Raychaudhuri S. S., Deng X. W. 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The botanical review* 66(1): 89-98.
- Revista Pandeia 2007. visualizado em 25/02/2007 em:
http://www.clubemundo.com.br/revistapangea/show_news.asp?n=277&ed=4.
- Sant'ana, S R M, Sposito M, Domingos M, Souza S R. 2007. Suitability of *Nicotiana tabacum* Bel W3 for biomonitoring ozone in São Paulo, Southeast Brazil. *Environmental Pollution* (London) – No Prelo.
- Sarma A D; Sreelakshmi Y; Sharma R. 1997. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry*. 45: 671-674.

- Scandalios J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*. 101: 7-12.
- Sharma T. K., Davis K. R. 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free radical biology & medicine*. 23: 480-488.
- Simão-Bianchini R. 1998. *Ipomoea* L. (convolvulaceae) no sudeste do Brasil. Tese de doutorado, Instituto de biociências, Universidade de São Paulo, SP., 127p.
- Smirnoff N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of botany*. 78: 661-669.
- Strohm M, Langebartels MEC, Jouanin L, Sandermann APH, Rennenberg H. 2002. Responses of antioxidative systems to acute ozone stress in transgenic poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) over-expressing glutathione synthetase or glutathione reductase. *Trees*. 16: 262-273
- Treshow M; Anderson, F.K. . 1991. Plant stress from air pollution. John Wiley & Sons. pp.87.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.
- Vergé X., Chapuis A., Delpoux M. 2002. Bioindicator reability: The exemplo of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental pollution*. 118: 337-349.
- Winston G. W. 1990. Physiochemical basis for free radical formation in cells: Production and defences. In RG Alscher, JR Cummings, eds, *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. Wiley-Liss, New York, pp 57-86.

Capítulo II

Caracterização sazonal das defesas antioxidativas de *Ipomoea*

***nil* cv. Scarlet O'Hara**

Introdução

Algumas plantas podem tolerar mais do que outras as oscilações nos fatores abióticos do meio em que vive, os quais, muitas vezes, podem sujeitá-las ao estresse oxidativo, como descrito no capítulo introdutório desta dissertação. Isso ocorre devido, dentre outros aspectos, à eficiência de seu sistema de defesa antioxidativo. É bem conhecido que algumas espécies antioxidantes do ciclo ascorbato-glutationa desempenham um papel importante na desintoxicação de espécies ativas de oxigênio (EAO) produzidas durante atividades metabólicas normais, como por exemplo, a redução fotoquímica do O_2 no tilacóide (Chernikova *et al.* 2000) ou mesmo por razões exógenas, como a entrada do ozônio à planta (Scandalios 1993). Um dos antioxidantes mais importantes em plantas é o ácido ascórbico (AA). Devido a sua ocorrência em paredes celulares (Smirnoff 1996), AA apresenta-se como um importante defensor da planta contra a ação de ozônio, por exemplo, que entra predominantemente pelos estômatos e reage com a água já no apoplasto, intensificando a formação de EAO. Outro grupo de defesa é formado pelos antioxidantes enzimáticos, entre os quais a ascorbato-peroxidase, que exerce um papel importante na remoção do peróxido de hidrogênio em cloroplastos e mitocôndrias e também superóxido dismutase, que neutraliza o ânion superóxido. Tais antioxidantes podem sofrer uma sazonalidade em sua formação e atividade em função de fatores exógenos, como por exemplo, condições meteorológicas, mesmo na ausência de fatores de estresse de origem antrópica (Larcher 2000). Há épocas no ano em que ocorre maior irradiação solar e os dias apresentam mais horas de luz, fato esse que influencia no funcionamento de cloroplastos e mitocôndrias e conseqüentemente nos processos de fotossíntese e de respiração da planta. Esse fato está associado a uma maior atividade das cadeias respiratórias, fotossistemas e conseqüentemente das cadeias transportadoras de elétrons, o que aumenta a possibilidade de serem formadas mais

espécies ativas de oxigênio (EAO) e exigir uma maior eficiência do sistema de defesa antioxidativo. Outros fatores importantes que interferem na intensidade de ação dos antioxidantes são a temperatura e a umidade relativa do ar, que além de influenciarem na abertura estomática, regulando o processo da fotossíntese e, assim, o nível de EAO produzidas, também podem atuar como agentes de estresse para as plantas (Lee *et al.* 2004; Takac 2004; Bulbovas *et al.* 2005).

Há de se considerar, ainda, que ao longo dos diferentes estágios de vida das plantas, variações nos níveis dos antioxidantes podem ocorrer, promovendo assim uma flutuação normal na produção dessas espécies (Klumpp *et al.* 2000). A intensidade de ação dos antioxidantes varia, também, em função da idade da folha (Musselman & Massman 1998). Durante o processo de senescência, último estágio de desenvolvimento da folha, as atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase tendem a diminuir (Iqbal *et al.* 1996). Tal fato ocorre concomitantemente com uma maior degradação de proteínas, ácido nucléico, além da perda de clorofila.

Portanto, é de se esperar que haja variações no sistema de defesas ao longo do ciclo de vida de uma planta, tornando-a mais suscetível aos diversos fatores de estresse, sejam eles endógenos ou exógenos, e que a sazonalidade nas condições climáticas possam interferir em tais variações, tornando-a mais ou menos vulnerável ao longo das estações do ano. Em tese, essas hipóteses são válidas também para a cultivar Scarlat O'Hara de *Ipomoea nil*, objeto da presente dissertação. Assim, objetivou-se, neste capítulo:

1) verificar se ocorrem variações em três espécies antioxidativas em folhas de plantas de *Ipomoea nil*, ao longo de seu desenvolvimento e, nas quatro estações do ano, quando expostas em casa de vegetação, às oscilações naturais em fatores climáticos de São Paulo; 2) verificar se tais variações estão relacionadas às oscilações de temperatura e de umidade relativa do ar observadas ao longo das estações do ano.

Material e métodos

A. cultivo de plantas de *Ipomoea nil* e campanhas experimentais

Para execução deste projeto sementes de plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara foram adquiridas de um mesmo fornecedor comercial (CN Seeds LTD, www.cnseeds.co.uk) e oriundas de um mesmo lote. Estas foram germinadas em caixa plástica transparente (gerbox) com 100 cm² (Figura 2.1A).

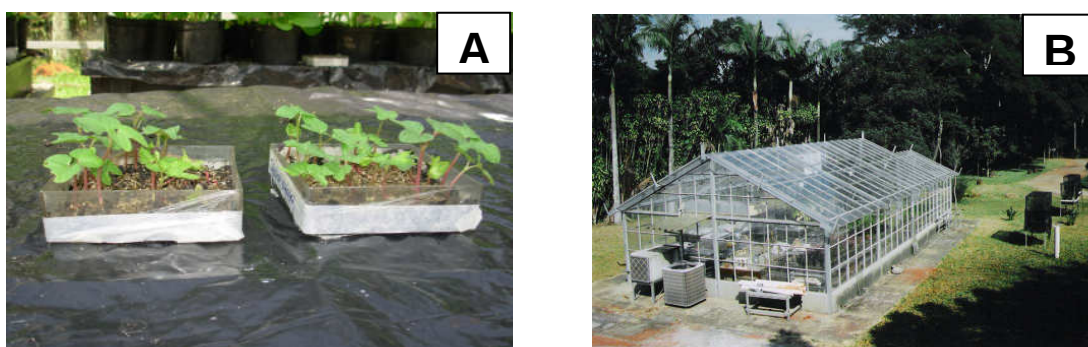


Figura 2.1. A. Plântulas de *I. nil* se desenvolvendo em gerbox; B. Casa de vegetação instalada no Instituto de Botânica (São Paulo), onde todas as etapas experimentais descritas neste capítulo foram desenvolvidas.

O substrato utilizado para a germinação foi composto por uma mistura de produto comercial produzido a base de casca de *Pinus* (Plantimax-Eucatex) e de vermiculita fina, na proporção de 3:1, respectivamente. As plântulas se desenvolveram nessas caixas até o surgimento da segunda folha cotiledonar, sendo, então, transplantadas para vasos plásticos com a mesma mistura de substrato utilizada na germinação das sementes. Nesse momento, fincou-se uma pequena estaca de madeira para suportar as plantas durante seu crescimento. Essas plantas tiveram a irrigação adequada garantida por capilaridade, por intermédio de cordões de náilon inseridos na base dos vasos, sendo que uma de suas extremidades permaneceu em contato com as raízes e a outra extremidade esteve mergulhada em água de torneira contida na caixa plástica coberta

com tela de arame galvanizado (Figura 2.2B), seguindo modelo proposto por VDI (2003). As plantas eram submetidas à análise depois de ter a 5ª, 6ª e 7ª folhas bem desenvolvidas e em média no meio do seu ciclo de vida.

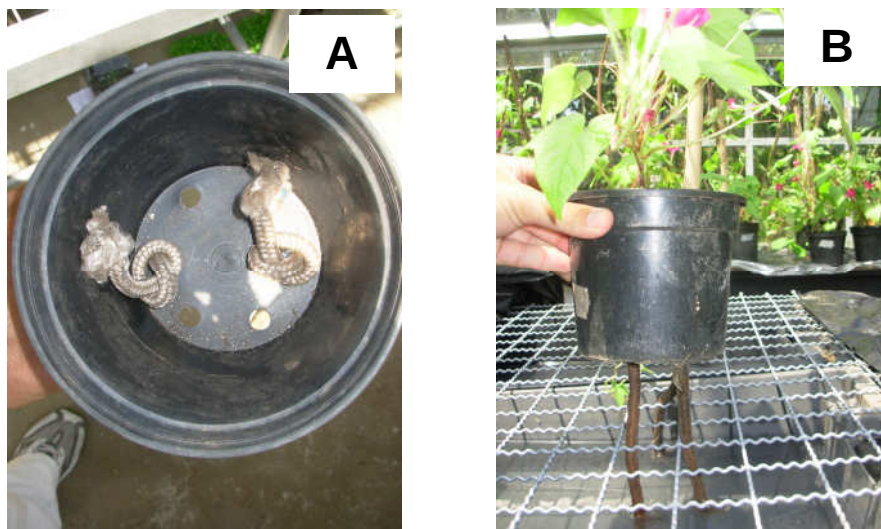


Figura 2.2. Plantas de *I. nil* se desenvolvendo em casa de vegetação. A. Vasos plásticos com cordões de náilon; B. Irrigação das plantas garantida por capilaridade.

Semanalmente, a partir do transplante, todas as plantas receberam 100 ml de solução nutritiva ‘hoagland’ descrita em Epstein (1975). Após quinze dias do transplante, a quarta folha mais velha do ramo principal de cada vaso foi marcada com um barbante para servir de referência para a quinta, sexta e sétima folhas do ramo principal da planta, que futuramente seriam analisadas periodicamente quanto ao conteúdo ou atividade de espécies antioxidativas (Figura 2.3).

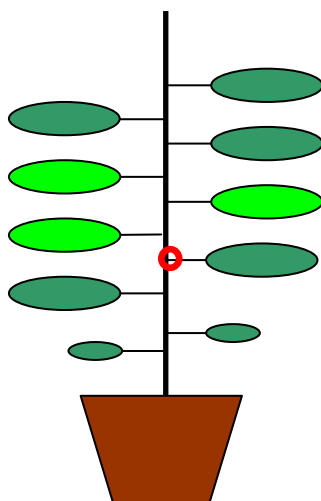


Figura 2.3. Desenho ilustrando a marcação da quarta folha mais velha do ramo principal, para obter uma referência da posição da quinta, sexta e sétima folhas.

Foram realizadas quatro campanhas experimentais, com duração de 28 dias, uma em cada estação do ano. Em fevereiro e março/2006, realizou-se a campanha de verão, em maio e junho/2006, à campanha de outono, em agosto e setembro/06, a campanha de inverno e em novembro e dezembro/2006, a campanha de primavera. Cada campanha foi iniciada com 45 plantas produzidas conforme descrição acima.

Todas as campanhas experimentais, desde a germinação das sementes, foram realizadas em uma casa de vegetação localizada no Instituto de Botânica, localizado na região sudeste da cidade de São Paulo, entre os paralelos 23° 38' 08"S e 23° 40' 18"S e os meridianos 46° 36' 48"W e 46° 38' 00"W (Fernandes *et al.* 2002) (Figura 2.1B). O ar no interior dessa casa de vegetação, por meio de filtragem, apresentava-se pouco contaminado por poluentes particulados e gasosos. A temperatura variou, no geral, do mesmo modo como no ambiente externo. Isso foi possível a partir da restrição das temperaturas máximas com ar condicionado, conforme a estação do ano.

Valores médios de temperatura e umidade para cada campanha, calculados a partir de valores diários obtidos com um termohigrógrafo, indicam que as plantas foram

submetidas a faixas aceitáveis desses parâmetros meteorológicos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Dados médios, mínimos e máximos de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) na casa de vegetação durante as quatro campanhas realizadas no ano de 2006.

Campanhas	Temperatura	Umidade relativa
	(min. – max.)	(min. – max.)
Verão	26,5 (18,0 - 34,1)	71 (35 - 87)
Outono	26,1 (17,4 - 34,5)	72 (30 - 87)
Inverno	23,4 (16,1 - 34,5)	66 (18 - 87)
Primavera	27,9 (19,2 - 34,0)	72 (28 - 87)

Dados fornecidos pelo IAG – USP e calculados com fator de correção.

B. Análises de antioxidantes

Durante cada campanha de 28 dias, em intervalos entre três ou quatro dias, determinaram-se, em cinco plantas, as concentrações de ácido ascórbico e a atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidases nas 5^a, 6^a e 7^a folhas mais velhas do ramo principal.

Ácido Ascórbico (AA)

A determinação de ácido ascórbico nas folhas frescas de *I. nil* foi baseada em Keller & Schwager (1977). Alíquotas do limbo de folhas frescas (0,5 g) foram homogeneizadas com 12mL solução extração preparada a base de etileno diamina ácido tetracético – sal de sódio (EDTA-Na₂) (0,07%), ácido oxálico (0,5%) e água. O restante da folha teve sua massa fresca e seca determinadas, para se obter a concentração do antioxidante em base de matéria seca. O extrato resultante da homogeneização foi centrifugado a uma velocidade de 40.000 g e numa temperatura de 2°C, durante trinta minutos. Em seguida,

1ml do sobrenadante foi adicionado a 2,5 mL de solução de 2,6 diclorofenol-lindofenol sal de sódio dihidratado (DCPiP) e solução extração, a fim de obter dados de uma primeira absorbância (520nm). Após essa leitura, foi adicionado 0,5 mL de solução de ácido ascórbico 1%, para saturar a solução e obter novamente dados de absorbância. Através da diferença entre a primeira e a segunda leitura foi calculada a concentração de ácido ascórbico em cada amostra.

Superóxido dismutase (SOD)

Para análise de SOD, 0,1g de limbo foliar foi triturado com 12 mL de solução tampão fosfato (50mM), pH 7,5 (contendo 1mM tritriplex III EDTA- Na_2 , 50mM NaCl e 1 mM AA) e PVPP (polivinilpolipirrolidona). Após centrifugação a 22.000 g, temperatura de 2°C durante 25 minutos, 100 μ L do extrato sobrenadante recebeu EDTA- Na_2 (0,54M), tampão fosfato (0,1M, pH 7,0), metionina, NBT (azul *p*-nitrotetrazolio) e riboflavina. Um lote permaneceu sob luz fluorescente (80W) por 30 minutos, para que ocorresse a inibição da redução de NBT, pela dismutação enzimática do superóxido, enquanto outro lote ficou exposto a um ambiente totalmente escuro (Osswald *et al.* 1992). Foi medida a absorbância de ambos os lotes em espectrofotômetro (560nm) e a diferença entre elas foi usada para medir a atividade da enzima.

Peroxidases (POD)

Para medir a atividade de POD, foram retirados 0,35g do limbo foliar de cada folha e posteriormente esse material foi homogeneizado com 12 mL solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 e PVPP. Em seguida, esse material foi centrifugado a 40.000 g e sob uma temperatura de 2°C, durante trinta minutos. Foi adicionado ao sobrenadante 2 ML de solução tampão de fosfato (0,1M e pH 5,5) e peróxido de hidrogênio (Klumpp *et al.*

1989). A absorbância do complexo H_2O_2 -POD formado foi medido em dois tempos (485nm), dentro de uma porção linear da curva de reação, que indicou a atividade de POD durante a redução do H_2O_2 . O delta da absorbância (ΔE) foi dividido pelo delta tempo em que ambas medidas foram tomadas (1,5 e 2,5 minutos).

C. Análises estatísticas

Inicialmente, procuraram-se diferenças significativas nos níveis dos antioxidantes nas folhas 5, 6 e 7, em cada dia de amostragem e em cada estação do ano. Para tanto, aplicou-se a análise de variância com um fator. Em seguida, foram realizadas análises de variância com dois fatores com todo o conjunto de dados, de modo a identificar diferenças entre as estações (fator 1) e ao longo do tempo em cada estação (fator 2). Em todos os casos, as análises de variância, quando indicavam diferenças significativas, foram seguidas por testes de comparação múltipla (Student-Newman Keuls). Igualmente, em todos os casos, procurou-se verificar se os dados tinham distribuição normal e/ou se havia igualdade de variâncias entre os tratamentos. Quando não, os dados foram transformados para alcançar tais exigências da análise.

Em seguida, foram realizadas análises de componentes principais (ACP), a fim de avaliar a variabilidade conjunta dos antioxidantes em folhas de *I. nil* ao longo das quatro estações do ano, procurando evidenciar se houve sazonalidade marcante.

Realizaram-se, finalmente, correlações de Pearson para determinar as relações entre oscilações em fatores meteorológicos no interior da casa de vegetação e as respostas antioxidativas foliares.

Resultados

Durante as campanhas de verão e inverno pôde-se observar que a concentração de ácido ascórbico, em determinadas amostragens, apresentou uma tendência a ser mais alta na folha 7, quando comparadas às folhas 6 e 5 (Figura 2.4A, C). Porém, nota-se que durante as campanhas, a folha 5 apresentou maior concentração de AA em determinados dias de análise. Contudo, tais tendências não foram comprovadas pelo teste de variância com um fator, ao longo das quatro campanhas experimentais.

Para SOD, na campanha de outono houve uma tendência de maiores atividades da enzima nas folhas 5 (Figura 2.5B), comprovada estatisticamente apenas no segundo dia de amostragem. Porém nas outras campanhas essa tendência não foi observada. Embora não comprovado estatisticamente, o final da campanha de inverno foi caracterizado por uma maior atividade da enzima na folha 5. No final da campanha de primavera, as folhas 7 mostraram uma alta atividade em determinados dias de análise (Figura 2.5D).

Já a atividade das peroxidases tendeu a ser mais alta nas folhas 5, nas campanhas de outono e inverno e na folha 6 na campanha de primavera, embora sem comprovação estatística na maioria dos casos (Figura 2.6). No sexto dia de análise no outono, foi observada uma atividade significativamente maior da enzima na folha 5 (Figura 2.6A). Na primavera, no primeiro dia de análise, correspondente ao início da exposição, observou-se, uma atividade significativamente maior na folha 5 quando comparada às demais folhas. No dia seguinte de análise nessa campanha, quatro dias após o início da exposição, paradoxalmente foi observada uma atividade de POD significativamente menor nesta folha quando comparada às folhas 6 e 7. Durante a campanha de inverno observou-se uma uniformidade da atividade da enzima nas folhas (Figura 2.6B).

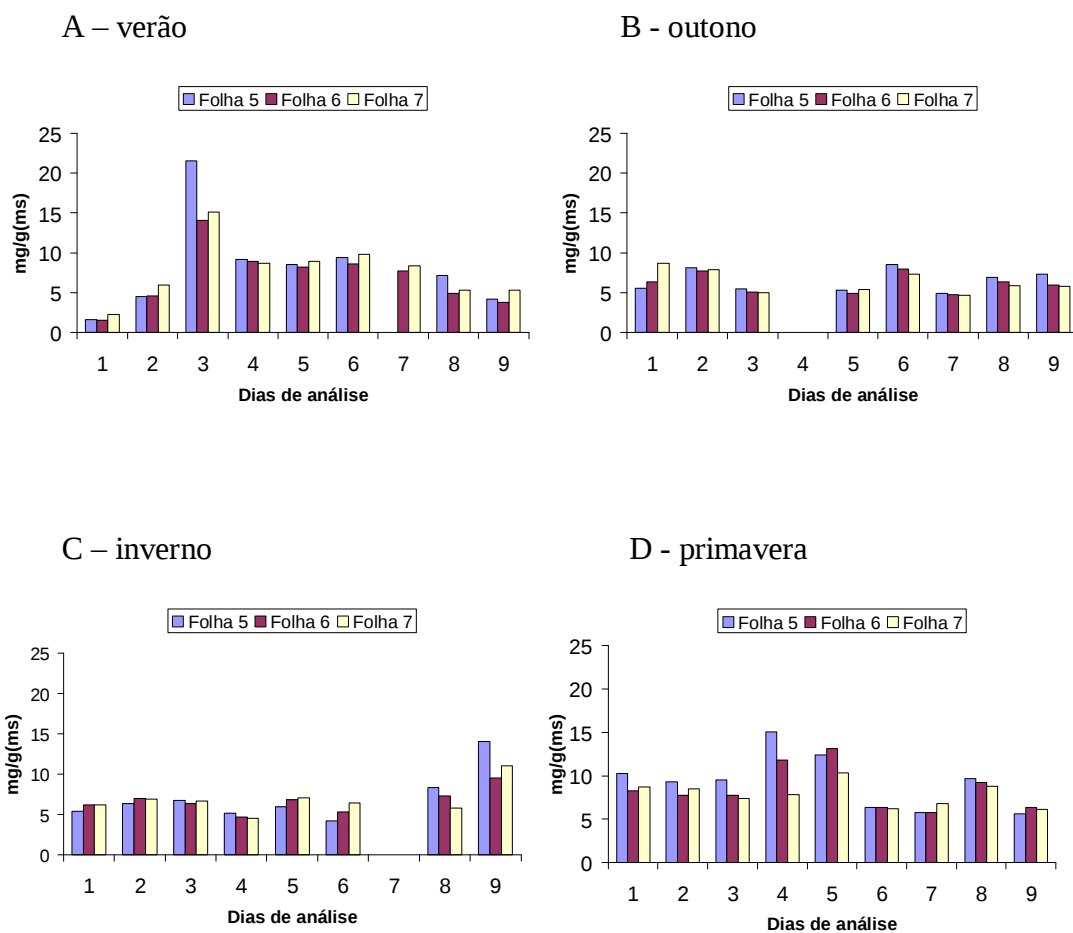


Figura 2.4. Concentrações médias de ácido ascórbico nas folhas 5, 6 e 7 de plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Verão; B. Outono; C. Inverno; D. Primavera. Não houve diferenças significativas nos níveis de AA entre os tipos de folhas analisadas, em cada dia de amostragem e em cada estação do ano.

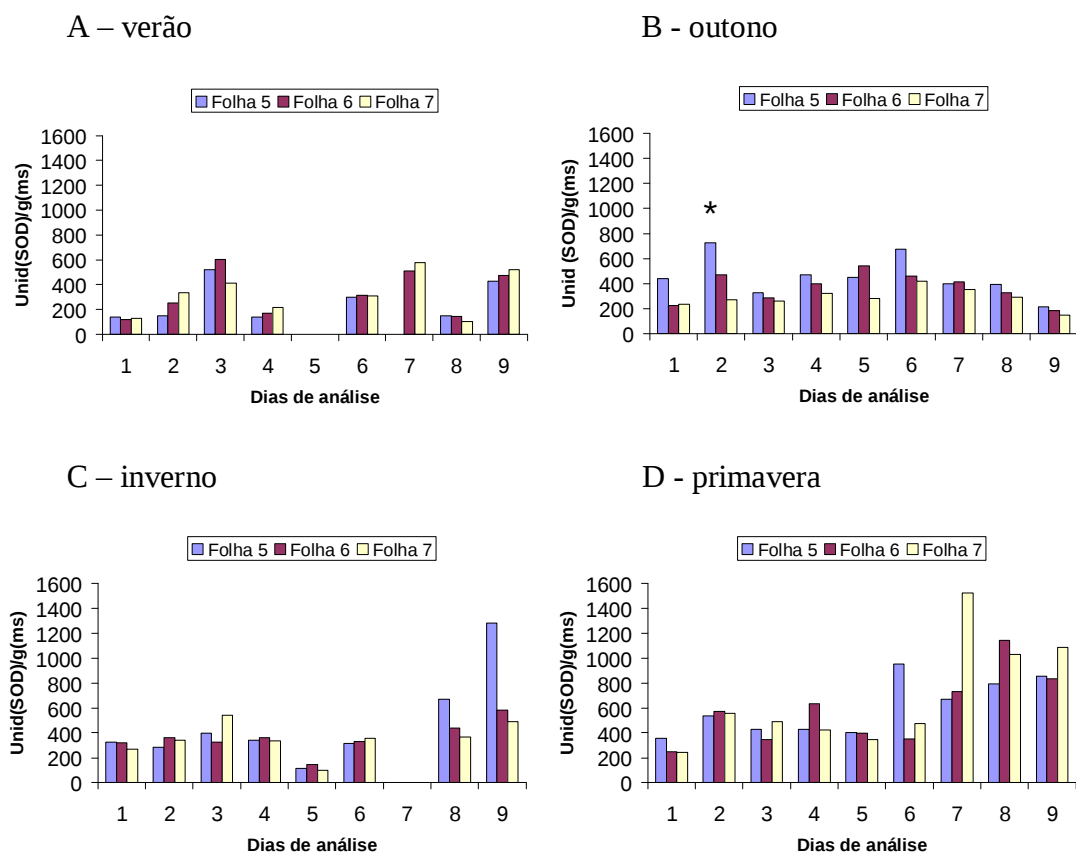


Figura 2.5. Valores médios da atividade da superóxido dismutase nas folhas 5, 6 e 7 de plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Verão; B. Outono; C. Inverno; D. Primavera. * indica que o nível de SOD é significativamente maior do que nas outras folhas analisadas, no dia de amostragem. Nas demais amostragens, não houve diferenças significativas nos níveis de SOD entre os tipos de folhas analisadas.

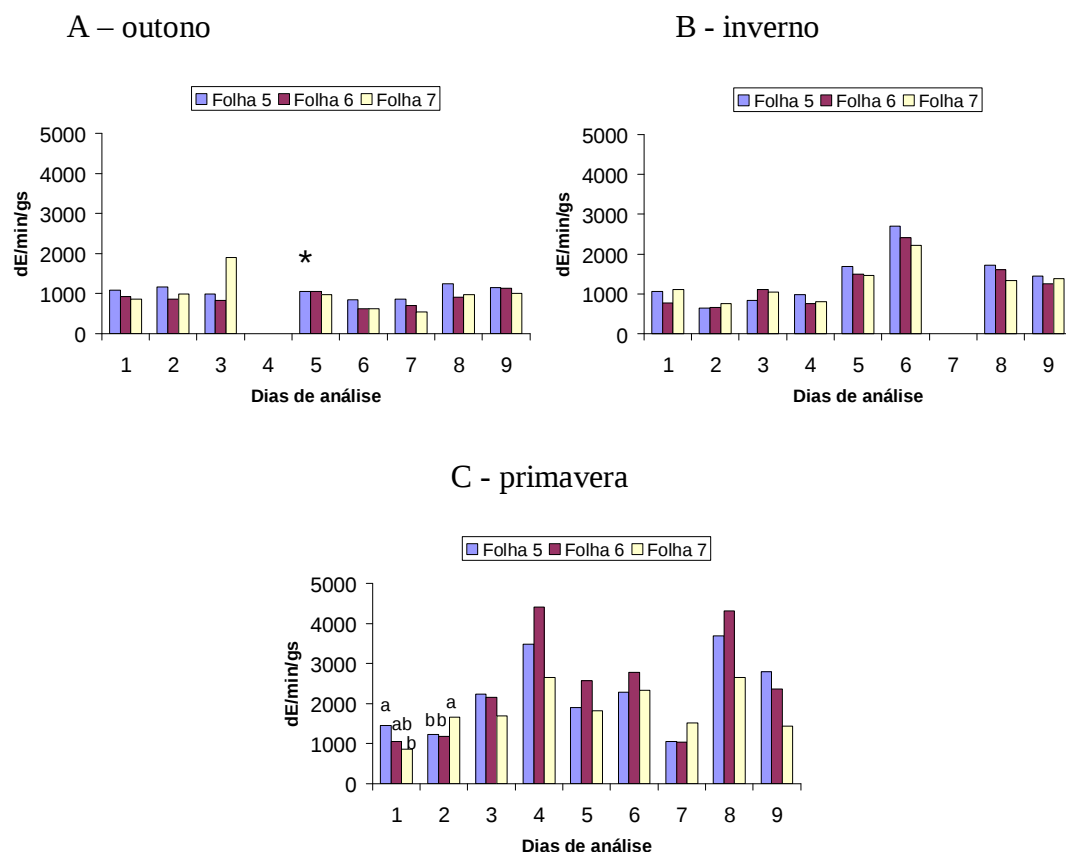


Figura 2.6. Valores médios da atividade de peroxidases nas folhas 5, 6 e 7 de plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Outono; B. Inverno e C. Primavera. Letras distintas indicam diferenças significativas no nível de POD entre as folhas analisadas, em cada dia de amostragem. * indica que o nível de POD é significativamente maior do que nas outras folhas analisadas. Na outra amostragem, não houve diferenças significativas entre os tipos de folhas analisadas.

A análise estatística realizada serviu como subsídio para que os resultados seguintes pudessem ser trabalhados fazendo-se uma média dos níveis de antioxidantes por planta uma vez que eles apresentaram concentrações e atividades bastante semelhantes entre as três folhas analisadas. Tais antioxidantes apresentaram uma flutuação em seus níveis ao longo do ano (Figura 2.7).

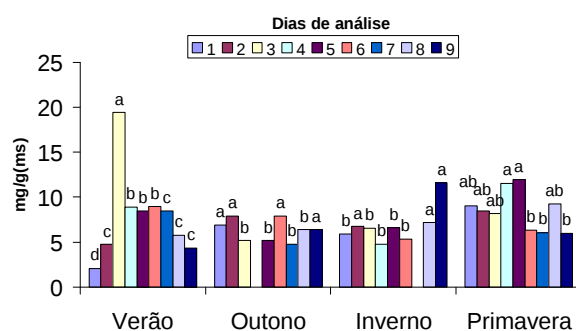
O conteúdo de ácido ascórbico nas plantas referentes à campanha de verão apresentou uma variação relativamente marcante ao longo dos 28 dias. Sua concentração no primeiro dia a ser analisado foi a menor registrada na campanha, sendo que conforme foram passando os dias a concentração foi aumentando e no período final das análises, quando a planta já estava quase um mês mais velha, sua concentração foi abaixando novamente. Durante a campanha de outono a concentração de AA manteve-se quase que constante durante o envelhecimento da planta, com exceção de três dias que apresentaram uma concentração significativamente maior do que nos outros. A campanha de inverno foi caracterizada por uma alta concentração do antioxidante no último dia de amostragem, fato que foi significativo. Na campanha de primavera AA apresentou algumas oscilações ao longo do período experimental, porém observou-se que ele permaneceu sempre alto na planta, desde a primeira até a última amostragem. O meio da campanha foi caracterizado pelas concentrações significativamente maiores do antioxidante. Comparando a concentração de AA em plantas de *I. nil* durante as quatro estações, nota-se que as plantas expostas na campanha de primavera foram a que apresentaram os maiores valores para o antioxidante, seguidos das campanhas de verão, inverno e outono.

A enzima superóxido dismutase mostrou um perfil bastante oscilatório durante a campanha de verão, obtendo atividades significativamente maiores no meio e final da campanha. Durante o outono, SOD manteve uma atividade relativamente constante nas plantas, mostrando no término do período amostral uma queda gradativa em seus níveis e apresentando no último dia de análise uma atividade significativamente menor do que nos outros dias. Semelhantemente ao ácido ascórbico, superóxido dismutase mostrou um aumento significativo em sua atividade no último dia de amostragem e apresentou no meio da campanha os menores valores de SOD nas plantas de *Ipomoea nil*. A

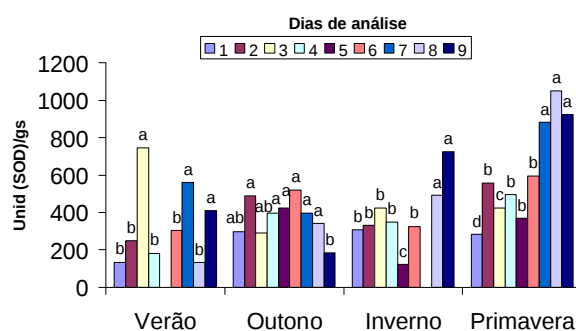
campanha de verão foi marcada por apresentar um aumento significativo da enzima nos últimos dias de amostragem. A campanha de primavera foi a que registrou os maiores valores de SOD nas plantas analisadas.

POD não apresentou diferença significativa em sua atividade durante a campanha de outono. Durante a campanha de inverno observou-se novamente um aumento dos níveis do antioxidante nos últimos dias de amostragem, valores esses significativamente maiores. No início da campanha de primavera, as plantas mostraram uma baixa atividade de POD, tendo pontualmente no meio e no final do período de análises uma atividade significativamente maior da enzima. Novamente observa-se que a campanha de primavera foi a que apresentou os maiores valores de antioxidantes, neste caso POD.

a) AA



b) SOD



c) POD

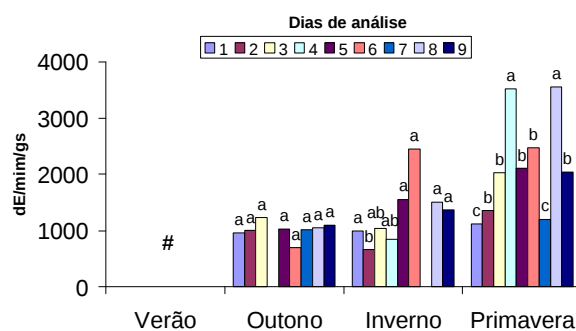


Figura 2.7. Perfis médios dos antioxidantes em de plantas de *I. nil* Scarlat O'Hara, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. Figura A. Ácido ascórbico (AA); Figura B. Superóxido dismutase (SOD); Figura C. Peroxidases (POD). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os dias de amostragem em cada estação. # Dados não obtidos.

Em média, observa-se que o conteúdo de AA foi mais alto nas folhas de plantas de *I. nil* mantidas por 28 dias em casa de vegetação na primavera e, em seguida, no verão. A atividade média da SOD foi crescente na sequência do verão, outono, inverno e primavera. O mesmo padrão foi observado para POD, a partir do outono (Tabela 2.2). Os resultados sintetizados nessa tabela evidenciam claramente que as concentrações de ácido ascórbico e a atividade das enzimas analisadas mostraram-se mais altas na primavera.

Tabela 2.2. Valores médios da concentração de ácido ascórbico e da atividade de superóxido dismutase e peroxidases em plantas de *I. nil* ‘Scarlat O’Hara, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. Letras maiúsculas indicam diferenças entre o conteúdo e atividade dos antioxidantes nas diferentes estações do ano.

Campanhas	AA (µg/g ms)	SOD (Unid/g ms)	POD (dE/min/g ms)
Verão	7,9 A	332,6 B	#
Outono	6,3 A	370,5 B	1008,4 B
Inverno	6,9 A	384,0 B	1300,2 B
Primavera	8,6 A	619,8 A	2153,3 A

A análise de componentes principais (ACP) realizada para os fatores biológicos (conteúdo de AA e atividades de SOD e POD) explicou 93,7% da variabilidade dos dados nos eixos um e dois, sendo que o eixo um explicou 55,9% desta variabilidade e o eixo dois 37,8%. Os valores de SOD e POD apresentaram uma forte relação com o eixo um, enquanto AA obteve um menor relação, conforme mostra a Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Relação dos valores médios dos antioxidantes com os eixos um e dois da análise de componentes.

Antioxidante	Eixo 1	Eixo 2
	r	r
AA	0,419	0,49
SOD	0,853	0,519
POD	0,661	0,750

O gráfico da análise mostra que existe uma sazonalidade marcante para alguns antioxidantes. As unidades amostrais dos primeiros e últimos dias de análise da campanha de verão estiveram associadas aos baixos valores de SOD e AA, enquanto que as dos dias intermediários de análise estiveram associadas aos altos valores desses antioxidantes. A campanha de outono foi predominantemente caracterizada pela baixa associação aos valores de SOD e AA. A campanha de inverno apresentou-se associada aos baixos valores das enzimas e conteúdo de AA, estando predominantemente ao lado esquerdo do gráfico. A campanha de primavera apresentou-se associada aos altos valores de SOD, POD e AA (Figura 2.8), como já haviam sido demonstrados pelos resultados incluídos na tabela 2.2.

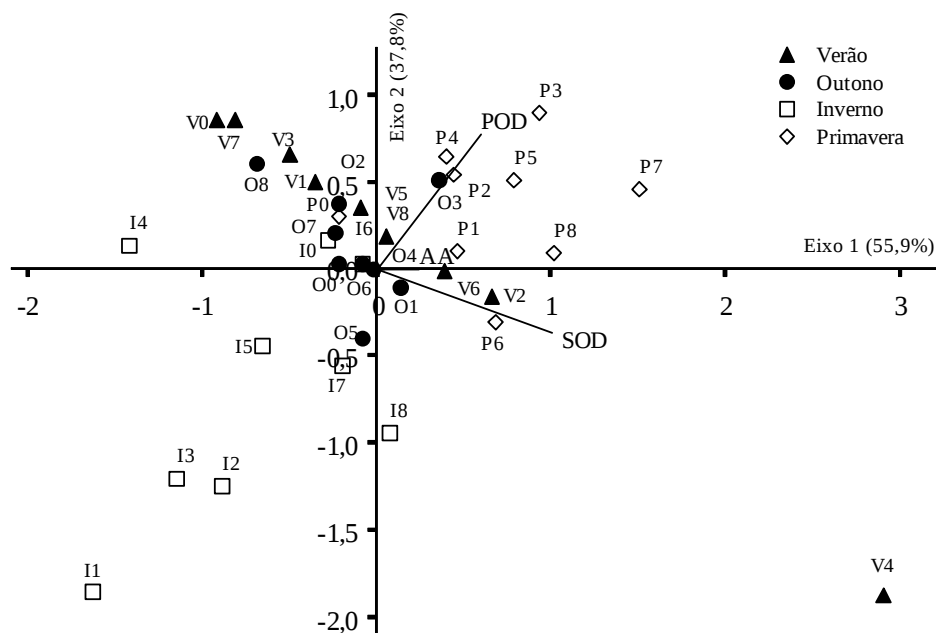


Figura 2.8. Análise de componentes principais para os antioxidantes em folhas de plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara', em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. AA- ácido ascórbico, SOD – superóxido dismutase e POD – peroxidases. As letras ao lado dos símbolos representam a estação do ano (V-verão; O-outono; I-inverno e P-primavera) e os números indicam o dia em que foi realizada a análise durante cada campanha (1 a 9 dias de análise).

Análises de correlação de Pearson indicaram que as variações nos antioxidantes em plantas de *I. nil* foram estimuladas por oscilações diárias em fatores climáticos como temperatura e umidade ao longo das diferentes estações do ano (Tabela 2.4). Matrizes de correlação entre os níveis dos antioxidantes obtidos em cada dia de análise e os valores médios de temperatura e umidade relativa no próprio dia de análise e nos 10 dias que antecederam a amostragem (dados não mostrados), apontaram que tais estímulos foram, em geral, mais evidentes entre o quinto e o sexto dia anterior à retirada das plantas para a amostragem (indicados por coeficientes de correlação mais altos e significativos). Conforme indicado na Tabela 2.4, observa-se que AA foi bastante

influenciado pela temperatura ao longo das estações do ano, além de mostrar uma provável influência da umidade relativa na campanha de primavera. Nota-se que as relações mais fortes ocorreram durante as campanhas de verão e inverno, fato que coincide com as estações que apresentaram maiores radiações globais. Por outro lado, SOD e POD não se apresentaram tão influenciadas por essas variáveis climáticas, sendo SOD influenciada pela temperatura somente durante as campanhas de outono e inverno e pela umidade relativa na campanha de primavera.

A análise também indicou uma relação bastante significativa entre as diferentes espécies antioxidativas analisadas nas diferentes folhas em cada campanha.

Análises de correlação de Pearson mostraram, também, que os antioxidantes nas quatro campanhas, em geral, apresentaram-se significativamente relacionados entre si: AA x SOD ($r = 0,37$; $p = 0,03$); AA x POD ($r = 0,44$; $p = 0,02$) e SOD x POD ($r = 0,44$ e $p = 0,02$).

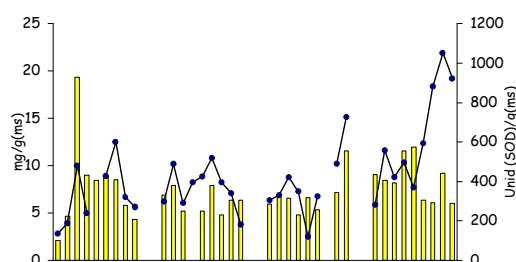
Tabela 2.4. Análise de Correlação de Pearson entre os níveis das espécies antioxidativas em cada dia de análise e valores de temperatura (T em ° C) e umidade (UR em %.) cinco dias . (*) Relação estatisticamente significativa com $p < 0,05$.

	Verão		Outono		Inverno		Primavera	
	T	UR	T	UR	T	UR	T	UR
AA	0,69*	0,08	-0,47*	-0,004	0,53*	0,47*	-0,06	-0,50*
SOD	0,40	0,54	-0,50*	0,12	-0,86*	-0,28	0,25	0,61*
POD	#	#	0,10	-0,14	0,01	-0,37	0,37	-0,25

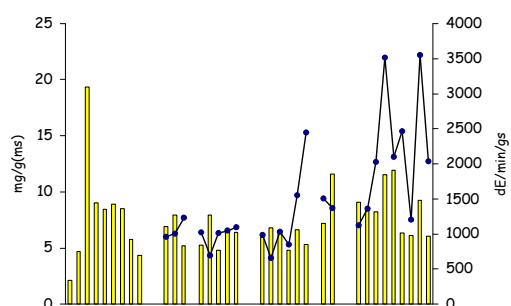
A Figura 2.9 contém perfis sobrepostos dos antioxidantes ao longo das quatro campanhas. Isso complementa a idéia sobre a relação que os antioxidantes apresentaram entre si, pois se pode observar que ao longo de todas as campanhas ocorrem picos

conjuntos tanto da atividade quanto da concentração das espécies antioxidativas.

a) AA x SOD



b) AA x POD



c) SOD x POD

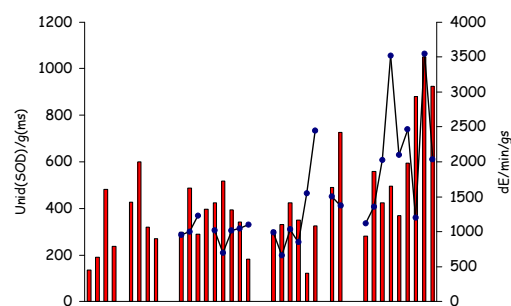


Figura 2.9. Perfis sobrepostos dos antioxidantes em folhas de plantas de *I. nil* ‘Scarlat O’Hara’, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. Figura A. Barras: ácido ascórbico; linha: superóxido dismutase. Figura B. Barras: ácido ascórbico; linha: peroxidases. Figura C. Barras: superóxido dismutase; linha: peroxidases.

Discussão

A resistência de plantas aos mais variados tipos de fatores ambientais, que causam estresse oxidativo, é determinada, entre outros aspectos, pela eficiência do seu sistema de defesa antioxidativo. Essa eficiência é variável no decorrer do desenvolvimento das plantas como um todo ou mesmo das folhas, como foi observado no presente estudo, por exemplo, para ácido ascórbico em plantas utilizadas na campanha de verão. Normalmente, espera-se que folhas mais jovens apresentem uma capacidade de defesa mais eficiente do que folhas mais velhas em uma mesma planta. Ohe e colaboradores (2005) observaram que, sob condições de estresse fotooxidativo, folhas mais velhas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi apresentavam um menor conteúdo de AA e uma menor atividade de ascorbato-peroxidase nos cloroplastos quando comparadas às folhas mais novas. Além disso, a folha mais nova apresenta, em média, um ritmo metabólico mais elevado, pelo fato de ainda estar em desenvolvimento, o que favorece a formação de espécies ativas de oxigênio e exige uma maior eficiência do sistema de defesa antioxidativo.

Contudo, a variação nos níveis dos antioxidantes nos diferentes estágios de vida das folhas não foi tão pronunciada quanto o foi nas diferentes estações do ano. Os maiores valores de antioxidantes encontrados nas campanhas de verão e primavera provavelmente refletem uma condição ambiental típica desse período do ano. Essa é a época de maior radiação solar e de temperaturas mais altas, logo, este é o período em que ocorre uma maior taxa de fotossíntese nas plantas e conseqüentemente uma maior formação de EAO, o que exige um aumento nas defesas das plantas. Segundo Larcher (2000), quantidades excessivas de radiação e o aumento da absorção de radiação UV produzem uma situação de estresse, sendo o centro de reação do fotossistema II o primeiro local a ser atingido. Outros autores também observaram tal sazonalidade em

antioxidantes, que foram associadas às características meteorológicas de cada estação do ano. Este foi o caso de Gilham & Dodge (1987), que mostraram que os níveis de ascorbato, ascorbato-peroxidase e glutathione-redutase em folhas de *Pisum sativum* (L.) apresentaram uma variação sazonal marcante. O período de inverno foi marcado por baixa atividade e concentração dos antioxidantes e o verão por altos valores em seus níveis. Os autores relacionaram esses resultados à densidade do fluxo de luz, que é menor no inverno.

É importante ressaltar que a taxa respiratória nas estações mais quentes do ano são maiores, o que também pode refletir num aumento na eficiência do sistema de defesa, devido a uma maior atividade das mitocôndrias. Segundo Dizengremel (2001), o aumento na respiração está associado a um aumento na síntese de NADH, que está relacionado à formação de enzimas como superóxido dismutase, peroxidases e regeneração de ácido ascórbico e outros componentes importantes para a defesa da planta contra o estresse oxidativo. Bowler *et al.* (1989) encontraram um grande aumento de SOD-manganês em *Nicotiana glauca* durante o aumento na respiração induzido por vários fatores de estresse.

Neste estudo, a análise de correlação de Pearson pôde evidenciar que há uma defasagem de tempo entre as mudanças no ambiente e respostas antioxidativas. Oscilações na temperatura e umidade se refletiram no sistema de defesas de *I. nil* cv. Scarlet O'Hara somente depois de dias crescendo no ambiente. Além disso, tais relações não foram uniformes nas diferentes estações do ano. A tabela 2.4 mostra que a superóxido dismutase foi influenciada negativamente pela temperatura, mas somente no outono e inverno. SOD apresenta a capacidade de catalisar a dismutação do radical superóxido, produzindo H_2O_2 e oxigênio (Scandalios 1993; Raychaudhuri & Deng 2000). Portanto, qualquer variação no ambiente capaz de causar a formação desse radical e provocar um

desequilíbrio no sistema prooxidante/antioxidante da célula será um possível ativador na atividade dessa enzima, pois ela é capaz de regular as concentrações de oxiradicais em células e organelas (Iqbal *et al.* 1996). Bulbovas *et al.* (2005) observaram uma relação positiva entre os níveis de superóxido dismutase e valores de temperatura em plantas de *Caesalpinia echinata* Lam. cultivadas na mesma casa de vegetação utilizada no presente estudo. A análise estatística ainda mostrou uma forte relação positiva entre temperatura e AA na campanha de verão e uma relação negativa na campanha de outono. A umidade relativa do ar apresentou uma relação inversa com AA na primavera e uma relação positiva com SOD. Essas relações opostas nas diferentes estações do ano provavelmente estão relacionadas às maiores ou menores taxas de fotossíntese, transpiração e respiração da planta, pois temperatura e umidade relativa do ar são fatores reguladores da movimentação estomática. As relações negativas entre essas variáveis climáticas e os antioxidantes podem ter refletido num maior fechamento estomático a fim de restringir a perda de água, resultando na diminuição das taxas fotossintéticas e da produção natural das espécies tóxicas de oxigênio.

O fato dos antioxidantes apresentarem uma forte relação positiva entre si sugere que, em geral, a comunicação endógena nas plantas, em resposta a variações ambientais, parece ter refletido a boa capacidade de defesa de *I. nil* 'Scarlat O'Hara' contra o estresse oxidativo. Isto quer dizer que a alta atividade da SOD levou a um aumento na produção de H_2O_2 , que foi, por sua vez, eliminado por outras substâncias antioxidativas do ciclo ascorbato-glutationa, como AA e peroxidases (mais especificamente ascorbato peroxidase). Por outro lado, como é mostrado na figura 2.9, em determinados períodos, possivelmente dependendo da intensidade do estresse, a atuação de uma espécie antioxidativa pareceu compensar a atuação de outro antioxidante. No final da campanha de primavera, por exemplo, o aumento das atividades de SOD e POD foram pareadas

com uma diminuição na concentração de AA, podendo indicar, também, eficiência do ciclo ascorbato-glutationa, em um período de intensa formação natural de EAO durante o decorrer dos processos fisiológicos. Porém, no presente estudo, não foi estudada a regeneração do ácido ascórbico oxidado no processo de eliminação de H₂O₂, que é também uma etapa determinante da capacidade da planta de se defender contra o estresse oxidativo e manter o equilíbrio prooxidante/antioxidante definido por Muggli (1993).

Portanto, os resultados descritos neste capítulo mostram que de fato há uma sazonalidade no perfil dos antioxidantes de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ ao longo das quatro estações do ano e que essa flutuação decorre principalmente da ação de determinados estímulos ambientais, como temperatura e umidade relativa, que podem exigir maior eficiência do sistema de defesa antioxidativo. Os resultados indicam que plantas dessa cultivar, crescendo em casa de vegetação sob ar filtrado e submetidas a condições ambientais similares às observadas em São Paulo, são capazes de se defender contra o estresse oxidativo naturalmente imposto pelo clima.

Referências bibliográficas

- Bowler C, Alliotte T, De Loose M, Montagu M V, Inzé D. 1989. The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana glauca*. Vol 8: 31-38
- Bulbovas P, Rinaldi M C S, Delitti W B C, Domingos M. 2005. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Revista Brasileira de Botânica vol. 28 nº 4.

- Chernicova T, Robinson J M, Lee E H, Mulchi C L. 2000. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynthesis research*. 64: 15-26
- Dizengremel P. 2001. Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant physiology biochemistry*. 39: 729-742.
- Epstein E. 1975. *Nutrição mineral das plantas. Princípios e perspectivas*. Editora da Universidade de São Paulo/Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, RJ, 341 p.
- Fernandes A J, Reis L A M, Carvalho A. 2002. Caracterização do meio físico. 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. 51-62.
- Gilhan D J, Dodge A D. 1987. Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide scavenging systems from pea leaves: Sazonal variation *Plant science* 50:105-109.
- Iqbal M, Abdin M Z, Mahmooduzzafar M Yunus, Agrawal M. 1996. Resistance mechanism in plants against air pollution. In: *Plant response to air pollution* (M. Yunus & M. Iqbal eds). Jhon Wiley and Sons, Chischester, p. 195-240.
- Keller T, Schwager H. 1977. Air pollution and ascorbate. *Eur. J. Forest Pathol.* 7: 338-350.
- 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. *The science of the total environment* 246: 79-91.

- Klumpp G, Guderian R, Küpers K. 1989. Peroxidase-und superoxiddismutase- aktivität sowie Prolingehalte von fichtenna-deln nach belastung mit O₃ , SO₂ und NO₂. Eur. J. Forest Pathol. 19: 84-97.
- Larcher W. 2000. Ecofisiologia Vegetal. Rima Artes e Textos, São Carlos.
- Lee M A, Chuns H S, Kim, JW, Lee H, Lee D H, Lee C B. 2004. Changes in antioxidant enzyme activities in detached leaves of cucumber exposed to chilling. Journal of Plant Biology 47:117-123.
- Muggli R. 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: Free radicals and antioxidantes in nutrition (F. corongiu, S. Banni, M. A. Dessi and C. Rice-Evans eds) Richelieu Press, London, p. 189-250.
- Musselman R C, Massman W J. 1998. Ozone flux to vegetation and its relationship to plant response and ambient air quality standards. Atmospheric environmental 33: 65-73.
- Ohe M, Rapolu M, Mieda T, Miyagawa Y, Yabuta Y, Yoshimura K, Shigeoka S. 2005. Decline in leaf photooxidative-stress tolerance with age in tobacco. Plant science 168: 1487-1493.
- Osswald W F, Kraus R, Hipelli S, Bens B, Volpert R, Elstner E F. 1992. Comparasion of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid redutase, glutathione redutase, Catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). Plant physiology 139: 742-748.
- Raychaudhuri S. S., Deng X. W. 2000. The role of superocide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. The botanical review 66(1): 89-98.
- Scandalios J. G. 1993. Oxigen stress and superoxide dismutases. Plant physiology.101: 7-12.

- Schwartz J, Fellow V. 2006. Air pollution: Why is public perception so different from reality? *Environmental progress* 25, n°4.
- Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of botany*. 78: 661-669.
- Takac T. 2004. The relationship of antioxidant enzymes and some physiological parameter in maize during chilling. *Plant soil and environment* 50: 27-32.
- Torsethaugen G, Pitcher L H, Zilinskas A, Pell E J. 1997. Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. *Plant physiology* 114:529-537
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

Capítulo III

Variação sazonal em antioxidantes e sintomas foliares em plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara sob o efeito da poluição aérea da cidade de São Paulo/SP

Introdução

O ozônio troposférico é indubitavelmente um dos poluentes mais tóxicos presentes em nossa atmosfera (Chemoldes 1989; Torsetheugen *et al.* 1997; Ashmore *et al.* 2006). Ele tem despertado grande curiosidade e interesse em cientistas de diversos países do mundo, entre eles, países em desenvolvimento, uma vez que suas concentrações vêm aumentando de forma preocupante nas últimas décadas, principalmente nos grandes centros urbanos (Mayer 1999; Schawartz & Fellow 2006). Nessas regiões, o ozônio troposférico pode alcançar concentrações suficientemente altas para induzir alterações fisiológicas e bioquímicas em diferentes espécies vegetais, ou diferentes estágios de desenvolvimento (Laurence & Weinstein 1981; Madamanchi *et al.* 1991; Scebba *et al.* 2003; Iriti *et al.* 2005). Tal fato decorre da capacidade que o poluente tem, ao entrar nas folhas pela via estomática, formar espécies ativas de oxigênio, tais como, radical hidroxila, radical superóxido e peróxido de hidrogênio, no tecido vegetal (Bray *et al.* 2000). Essa última EAO desempenha um importante papel como sinalizador na planta, pois essa molécula pode se espalhar rapidamente do lugar onde foi formada e agir como um sinal de indução de genes envolvidos na defesa contra o estresse (Foyer *et al.* 1997). Como já citado na introdução desta dissertação, as EAO, devido ao seu alto poder oxidativo, reagem indiscriminadamente com biomoléculas, alterando a estrutura e funcionamento celulares, com reflexos nos níveis mais altos da organização biológica, como o surgimento de necroses e cloroses foliares. As membranas são as primeiras a serem alteradas, devido à ação dessas espécies tóxicas de oxigênio sobre lipídios e proteínas. Foi igualmente comentado anteriormente que uma das alternativas para minimizar tais efeitos deletérios em plantas consiste na intensificação do sistema de defesas antioxidativo, formado principalmente por espécies do ciclo ascorbato-glutationa, como ácido ascórbico, superóxido dismutase, catalase, peroxidases e

glutathione (Bray *et al.* 2000). A diferença entre uma planta tolerante ao ozônio e uma sensível está, dentre outras características, na eficiência desse sistema de defesa. Guri (1983), por exemplo, mostrou que uma cultivar resistente de *Phaseolus vulgaris* ao ozônio apresentou uma atividade de glutathione-redutase duas vezes maior do que cultivares sensíveis. Pasqualini *et al.* (2002) observaram que plantas de *Nicotiana tabacum* Bel B também possuíam duas vezes mais ácido ascórbico do que a cultivar sensível Bel W3, tanto em tratamentos com ozônio, como em situação controle. Aliás, o ácido ascórbico (AA), um redutor e antioxidante celular, é um dos grandes responsáveis pela defesa da planta contra os efeitos do ozônio troposférico. AA se apresentam, neste caso, como uma primeira linha de defesa devido a sua localização na matriz extracelular (Potters *et al.* 2002). Além de auxiliar na captura de EAO, ele ainda atua na regeneração do α -Tocoferol (vitamina E) nos cloroplastos e também na regeneração dos pigmentos carotenóides, que apresentam características antioxidativas. A superóxido dismutase (SOD), um antioxidante enzimático, apresenta também um importante papel na proteção da planta contra o estresse oxidativo por neutralizar o ânion superóxido e diminuir sua toxicidade (Scandalios 1993). Altos níveis das isoformas Cu-SOD e Zn-SOD no citossol de células do mesófilo foliar apresentam-se mais importantes na proteção contra o ozônio do que uma intensa atividade da isoforma presente no cloroplasto (Pitcher & Zilinskas 1996). Outro antioxidante enzimático, também encontrado em parede celular, é a ascorbato-peroxidase. O aumento na atividade dessa peroxidase varia de planta para planta, e lógico, de acordo com as condições ambientais às quais a planta está exposta. A atividade da ascorbato peroxidase pode aumentar em resposta a choques mecânicos, influências ambientais ou poluição aérea (Iqbal *et al.* 1996). Esse aumento deve ser refletido também na intensificação da atividade das peroxidases com um todo (POD), se esta for determinada.

No capítulo anterior, dois aspectos foram evidenciados em relação aos antioxidantes analisados (AA, SOD e POD) em folhas de plantas de *Ipomoea nil* ‘Sacarlat O’Hara’ mantidas em ambiente não contaminado por poluentes. Houve uma sazonalidade marcante no perfil dos mesmos ao longo do ano, decorrente da ação de determinados estímulos ambientais, como variações em temperatura e umidade relativa. As mudanças nesse perfil refletem significativamente uma situação climática observada cinco a seis dias antes da tomada dos dados.

Considerando esses resultados, propuseram-se as seguintes perguntas: 1) quando plantas de *I. nil* ‘Sacarlat O’Hara’ forem introduzidas em local da cidade São Paulo predominantemente poluído por ozônio, respostas antioxidativas poderão ocorrer devido à ação combinada de fatores indutores do estresse oxidativo presentes na atmosfera contaminada, como o ozônio, e fatores climáticos?; 2) a sazonalidade nos níveis naturais dos antioxidantes devido a variações climáticas pode ser alterada pela ação dos poluentes e/ou de outros estressores do meio urbano?; Surgirão cloroses e/ou necroses, supostamente causados por ozônio, em plantas expostas no ambiente poluído, a despeito da eficiência desse sistema de defesas antioxidativo?

Logo, almejando responder a essas questões, objetivou-se neste capítulo verificar se ocorrem variações nos mesmos antioxidantes em folhas de plantas de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’, ao longo de seu desenvolvimento e nas quatro estações do ano, quando desenvolvidas em um ambiente poluído predominantemente por ozônio, em São Paulo. Objetivou-se, também, verificar se os perfis dos antioxidantes nas plantas crescidas sob ar filtrado, em casa de vegetação (resultados apresentados e discutidos no capítulo anterior) são alterados quando as plantas são expostas no ambiente poluído com ozônio predominantemente.

Material e métodos

A. Cultivo de plantas de *Ipomoea nil* e campanhas experimentais

O cultivo de plantas de *Ipomoea nil* ocorreu como descrito no item “Material e métodos” do capítulo I. A quarta folha mais velha do Ramo principal de cada planta utilizada nas campanhas realizadas no local poluído foi também marcada com um barbante para servir de referência para a quinta, sexta e sétima folhas, que futuramente seriam analisadas periodicamente quanto ao conteúdo ou atividade de espécies antioxidativas e danos foliares visíveis.

Foram realizadas quatro campanhas experimentais no ambiente poluído, com duração de 28 dias, uma em cada estação do ano, as quais aconteceram exatamente no mesmo período das exposições de plantas ao ar filtrado em casa de vegetação. Assim, em fevereiro e março/2006, realizou-se a campanha de verão, em maio e junho/2006, à campanha de outono, em agosto e setembro/06, a campanha de inverno e em novembro e dezembro/2006, a campanha de primavera.

Cada campanha experimental era iniciada com um lote de quarenta e cinco plantas de *I. nil*, com características idênticas às das plantas mantidas no local de referência (casa de vegetação).

O local poluído da cidade de São Paulo, escolhido para realização das campanhas experimentais, foi o parque do Ibirapuera, situado na zona sul da cidade de São Paulo/SP. Esse parque encontra-se bem próximo ao Instituto de Botânica, onde se encontra instalada a referida casa de vegetação, o que garantiu que as condições climáticas fossem equivalentes em ambos os locais e ainda facilitou o trabalho (Figura 3.1). As plantas foram mantidas, durante os 28 dias de cada campanha, sobre caixas plásticas preenchidas com água de torneira e cobertas com arame galvanizado. Estas foram colocadas em suportes de ferro galvanizado, com sombreamento de 50% durante

quatro semanas em cada campanha (Figura 3.2). A irrigação das plantas foi garantida por capilaridade, conforme método já descrito em detalhes no capítulo I. Esses suportes, como pode ser visto na Figura 3.2, foram colocados ao lado da estação de monitoramento da qualidade do ar da Companhia Estadual de Saneamento Ambiental - CETESB.

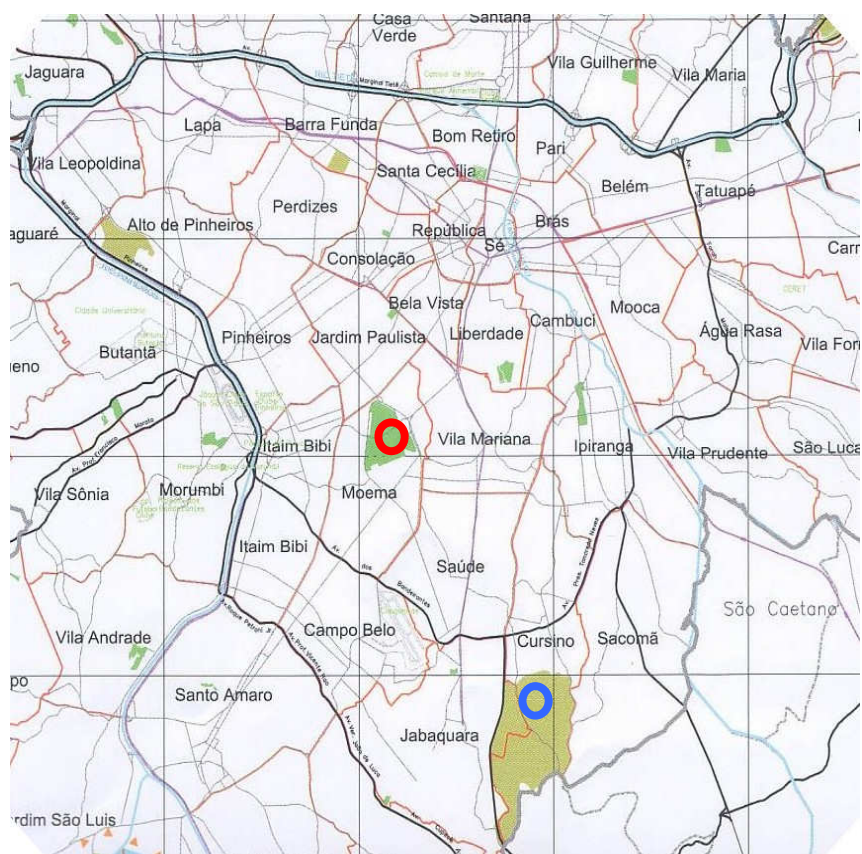


Figura 3.1. Mapa da região centro-sul da cidade de São Paulo. Casa de vegetação (●), Parque do Ibirapuera (●). Modificado SVMA (2004).



Figura 3.2. Estação de monitoramento da CETESB no parque do Ibirapuera, onde foram mantidos os suportes para as plantas de *I. nil*.

O parque do Ibirapuera é uma área pública bem arborizada, localizada entre avenidas com um intenso tráfego veicular (Figura 3.3). Localiza-se a uma latitude de 23° 34'55"S e longitude 46°39'25"W e está a uma altitude de 750 metros em relação ao nível do mar. Alguns poluentes excedem os níveis de atenção na estação de monitoramento do parque, dentre eles o ozônio merece um destaque especial. Segundo o relatório CETESB (2004), os níveis de atenção para o poluente excederam de forma significativa entre os anos de 1997 e 2002 na região, tendo como destaque em termos de distribuição por ano as estações de primavera e verão. Tal fato está relacionado às altas emissões de precursores na região e relativa distância das fontes.



Figura 3.3. Imagem aérea do parque do Ibirapuera, zona sul da cidade de São Paulo. Em destaque as avenidas que circundam a área verde. Fonte: www.ipef.br

O parque não é afetado por altos índices de dióxido de enxofre, como ocorre com maior frequência em outros pontos da cidade, também monitorados pela CETESB. Esse poluente não ultrapassa a marca dos $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, em média para 24 horas no parque, o que está muito abaixo do padrão de qualidade do ar estabelecido em legislação ($80 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

Entre 1997 a 2002, o dióxido de nitrogênio não alcançou na estação de monitoramento do parque do Ibirapuera a metade do que é estabelecido pelo padrão de qualidade do ar. Esse fato decorre da provável formação de ozônio, que se encontra em altos níveis no local. O parque do Ibirapuera também é menos poluído por material particulado, mesmo na estação de inverno, quando as condições climáticas são menos favoráveis para sua dispersão e suas concentrações são mais altas.

Em cada campanha, medidas horárias de clima como temperatura, umidade relativa do ar, radiação global, velocidade de vento e concentrações horárias de poluentes como ozônio, material particulado e dióxido de nitrogênio foram obtidas junto ao portal da

CETESB.

B. Análise de danos foliares e de antioxidantes

Em cada campanha experimental, num intervalo de três ou quatro dias, as 5^a, 6^a e 7^a folhas mais velhas do ramo principal de cinco plantas foram analisadas quanto à porcentagem de área foliar afetada por sintomas visíveis. Essa análise foi baseada no procedimento proposto pela VDI (2003) para *Nicotiana tabacum* Bel W3. Em seguida, as mesmas folhas foram analisadas quanto à concentração de ácido ascórbico e atividades de superóxido dismutase e peroxidases, utilizando métodos descritos no item “Material e métodos” do capítulo I. Essas análises sempre coincidiram com as realizadas nas plantas mantidas sob ar filtrado, em casa de vegetação, a fim de permitir comparações de resultados.

C. Análise estatística

Os mesmos procedimentos descritos no capítulo anterior foram usados para tratar estatisticamente os dados obtidos no Parque do Ibirapuera. Procuraram-se diferenças significativas nos níveis dos antioxidantes nas folhas 5, 6 e 7, em cada dia de amostragem e em cada estação do ano, por meio da análise de variância com um fator. Foram realizadas análises de variância com dois fatores com todo o conjunto de dados, de modo a identificar diferenças entre as estações (fator 1) e ao longo do tempo em cada estação (fator 2). Em todos os casos, as análises de variância, quando indicavam diferenças significativas, foram seguidas por testes de comparação múltipla (Student-Newman Keuls). Acrescentou-se, neste capítulo, a comparação entre médias obtidas para plantas do local de referência – casa de vegetação, em cada dia de análise por estação do ano (resultados descritos anteriormente) e os obtidos no Parque do Ibirapuera nos dias correspondentes. Para tanto, utilizou-se o teste t. Igualmente, em todos os

casos, procurou-se verificar se os dados tinham distribuição normal e/ou se havia igualdade de variâncias entre os tratamentos. Quando não, os dados foram transformados para alcançar tais exigências da análise.

Finalmente, foram realizadas análises de componentes principais (ACP), a fim de avaliar a variabilidade conjunta dos antioxidantes em folhas de *I. nil* ao longo das quatro estações do ano, procurando evidenciar se houve sazonalidade marcante.

Resultados

A. Condições ambientais durante as campanhas experimentais

Os valores médios de temperatura ao longo das campanhas foram diferentes, sendo as campanhas de primavera e verão as mais quentes, como esperado, porém os valores médios de umidade relativa foram pouco variáveis. A radiação global na primavera foi menor do que na campanha de inverno, fato que pode ser explicado pela alta nebulosidade e chuvas que ocorreram do meio da campanha para o fim. Durante a campanha de inverno, foi registrada a maior média de velocidade de vento de todas as campanhas realizadas durante o ano, porém o valor não foi significativamente diferente dos valores obtidos nas demais campanhas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Valores médios, mínimos e máximos de temperatura (°C) e de umidade relativa do ar (%) e valores médios de radiação global (W/m²) e de velocidade de vento (m/s) no parque do Ibirapuera durante as quatro campanhas realizadas.

Campanhas	Temperatura (min. – max.)	Umidade relativa (min. – max.)	Radiação global	Velocidade vento
Verão	23,0 (18,0-31,5)	82,0 (78,2-86,2)	378,7	1,2
Outono	18,3 (14,0-25,6)	81,2 (79,3-83,3)	173,4	1,0
Inverno	18,7 (11,6-32,2)	78,4 (65,7-83,2)	341,6	1,7
Primavera	21,8 (15,6-30,9)	81,0 (74,1-86,1)	203,0	1,4

Os poluentes atmosféricos não mostraram uma sazonalidade marcante ao longo do ano de 2006 na região do parque do Ibirapuera, apresentando valores médios relativamente semelhantes ao longo das estações. Na campanha de outono, a companhia responsável em medir e avaliar a qualidade do ar no estado de São Paulo, a CETESB, não monitorou durante uma semana e meia os dados climáticos e de poluição na estação do parque do Ibirapuera devido a problemas de ordem técnica, o que comprometeu, em parte, o cálculo dos valores médios para essa estação.

Tabela 3.2. Concentrações médias de poluentes atmosféricos no parque do Ibirapuera durante os 28 dias de cada campanha experimental. O₃ – ozônio (média das máximas em cada dia - ppb); MP₁₀ – material particulado (µg/m³); NO₂ – dióxido de nitrogênio (µg/m³). AOT40 (valor acumulado de ozônio acima do limite horário de 40 ppb – ppb.h).

Campanhas	O₃	AOT40	MP₁₀	NO₂
Verão	34,1	763,7	33,6	41,0
Outono	28,9	87,8	54,4	51,5
Inverno	18,6	401,1	44,6	63,1
Primavera	27,2	451,9	27,5	50,5

O ozônio foi o poluente mais importante na área de estudo, durante a execução dos experimentos de campo. Os valores médios do poluente mostrados na Tabela 3.2 evidenciam claramente que a campanha de verão foi a que apresentou a maior concentração média na região do parque do Ibirapuera durante o período de estudo. Tal fato decorre das condições climáticas favoráveis para a formação do poluente, entre as quais dias com mais horas de luz, maior intensidade de radiação e temperatura. Segundo o relatório CETESB (2005), o período em que ocorrem os maiores picos de ozônio em alguns pontos da cidade de São Paulo é exatamente entre a primavera e o verão. Entretanto, maior concentração

horária de ozônio foi encontrada na campanha de primavera, na primeira semana de exposição das plantas, no dia 19 de novembro às 16:00h (105,5 ppb). Além disso, houve meses em que os níveis de atenção para o ozônio foram ultrapassados, contribuindo, assim, para uma maior dose acumulada (AOT40), como pode ser observado nas campanhas de verão e primavera (Tabela 3.2).

A análise de componentes principais (eixo 1 x eixo 2), considerando os fatores abióticos monitorados durante as campanhas experimentais, indicou haver clara sazonalidade para alguns deles (Figura 3.4; Tabela 3.3). Os fatores abióticos analisados foram temperatura, radiação global, ozônio, material particulado e dióxido de nitrogênio. Os eixos analisados apresentaram uma explicabilidade de 89,5%, tendo o eixo um 34,5% de explicabilidade e o eixo dois 29,1%. O eixo três (apresentado num outro gráfico) explicou 25,9% da variabilidade dos dados. Os valores de material particulado apresentaram uma forte relação com o eixo 1, temperatura, material particulado e ozônio apresentaram forte relação com o eixo 2 e radiação e material particulado novamente apresentaram uma forte relação com o eixo 3, conforme mostra a Tabela 3.3. No lado positivo de eixo 1, pode-se observar uma associação das unidades amostrais referentes a campanha de outono com altos valores de MP_{10} e NO_2 . O lado negativo do eixo mostra uma associação das unidades amostrais referentes às campanhas de verão, inverno e algumas da primavera associadas aos altos valores de radiação. O lado negativo do eixo 2 mostra uma associação das unidades referentes à campanha de inverno associada aos maiores valores de MP_{10} . No outro gráfico (eixo 1 x eixo 3), pode-se observar no lado negativo do eixo 1 e do eixo 3 uma associação das unidades amostrais das campanhas de verão e primavera com a temperatura. A campanha de primavera não apresentou nenhuma característica marcante para nenhum dos fatores analisados (Figura 3.4).

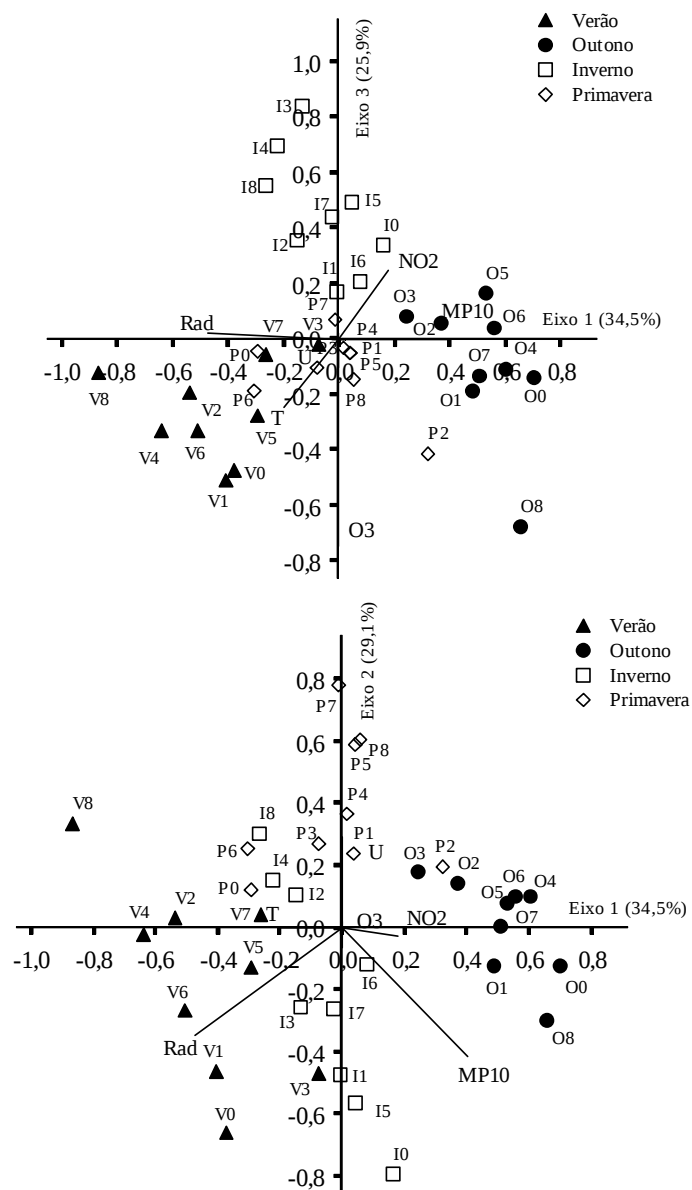


Figura 3.4. Análises de componentes principais (eixo 1 x eixo 2; eixo 1 x eixo 3) para os fatores abióticos ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental realizada no parque do Ibirapuera .T-temperatura ($^{\circ}\text{C}$), U-umidade relativa do ar (%), Rad-radiação global (W/m^2), NO_2 -dióxido de nitrogênio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), MP_{10} -material particulado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), O_3 -ozônio (ppb). As letras ao lado dos símbolos representam a estação do ano (V-verão; O-outono; I-inverno e P-primavera) e os números indicam o dia de análise durante cada campanha (1 a 9 dias de análise).

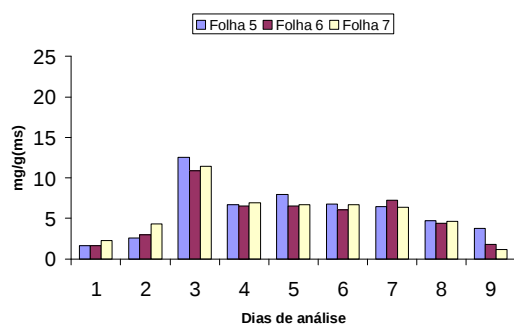
Tabela 3.3. Relação dos valores médios dos fatores abióticos com os eixos um, dois e três da análise de componentes principais (ACP) durante as campanhas experimentais realizadas no Parque do Ibirapuera. T - temperatura (°C), O₃ - ozônio (ppb), RAD - radiação global (W/m²), MP₁₀ - material particulado (µg/m³) e NO₂ - dióxido de nitrogênio (µg/m³).

Variáveis climáticas e de poluição	Eixo 1 r	Eixo 2 R	Eixo 3 r
T	-0,48	-0,68	-0,54
O₃	-0,06	0,58	-0,34
RAD	0,02	-0,27	-0,93
MP₁₀	-0,74	-0,63	0,84
NO₂	0,46	-0,19	0,54

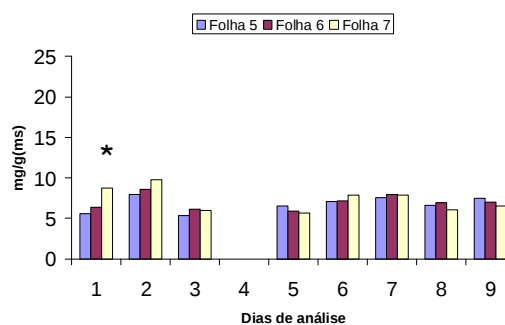
B. Antioxidantes

Em geral, as folhas 5, 6 e 7 não foram diferentes em relação ao conteúdo de ácido ascórbico quando foram expostas ao ambiente poluído. As três folhas apresentaram uma mesma flutuação em cada campanha, o que possibilitou o uso da média por planta para os cálculos futuros. Porém, observou-se que, na campanha de outono, a folha 7 apresentou inicialmente uma concentração de AA significativamente maior do que as folhas 5 e 6 (Figura 3.5). Essa tendência também se repetiu para SOD, embora esta não tenha sido comprovada estatisticamente. No entanto, notou-se que no final das campanhas havia um pequeno pico para as folhas 6. Durante a campanha de outono, a folha 5 pareceu mostrar maior atividade da enzima (Figura 3.6). Já as peroxidases tiveram um perfil diferente entre as folhas, em cada estação do ano. Nota-se que, a partir da quinta amostragem realizada na campanha de outono, houve uma atividade significativamente maior da enzima nas folhas 7, quando comparadas às outras folhas. Durante a campanha de primavera, os antioxidantes nas folhas 5 tenderam a atuar mais eficientemente na defesa das plantas (Figura 3.7).

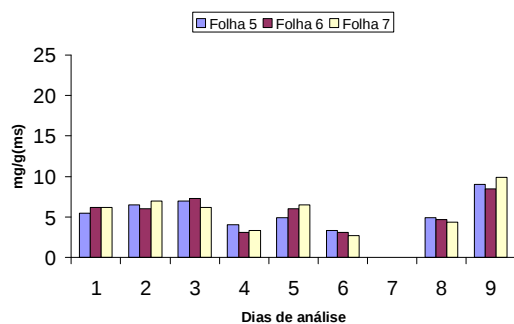
A - verão



B - outono



C - inverno



D - primavera

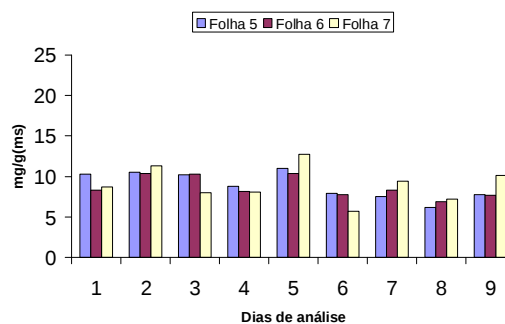
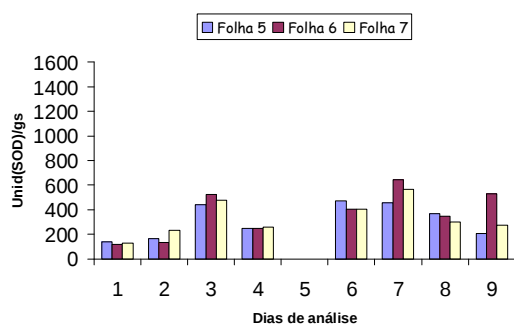
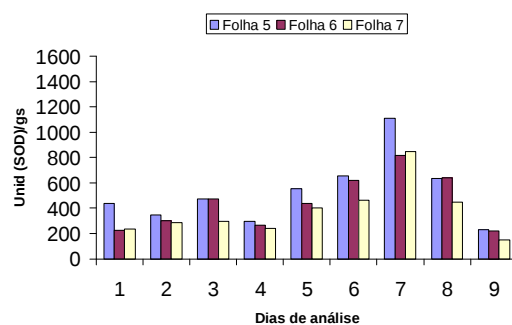


Figura 3.5. Concentração de ácido ascórbico nas folhas 5, 6 e 7 de plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Verão; B. Outono; C. Inverno; D. Primavera. * indica que a concentração de AA é significativamente maior do que nas outras folhas analisadas, no dia de amostragem. Nas demais amostragens, não houve diferenças significativas nos níveis de AA entre os tipos de folhas analisadas.

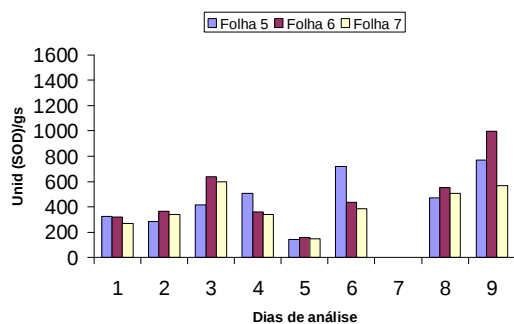
A - verão



B - outono



C - inverno



D - primavera

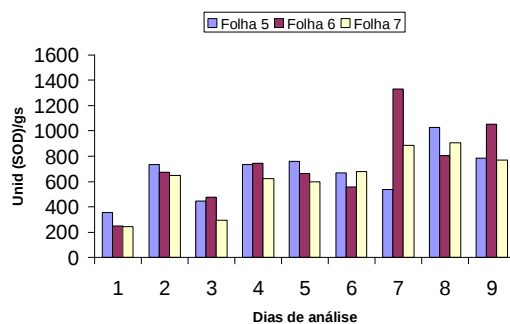
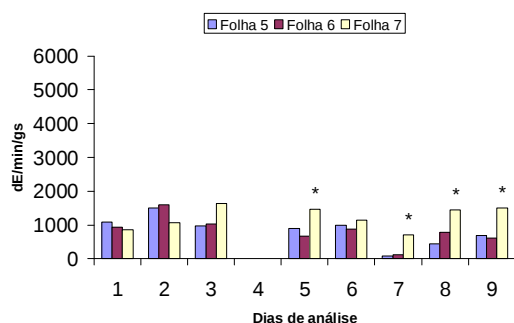
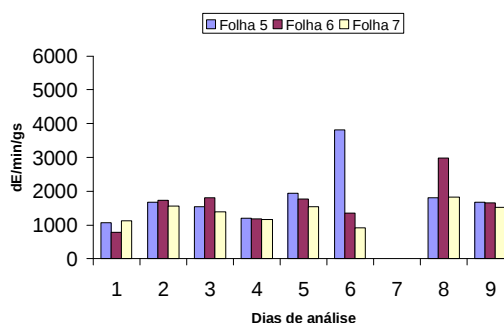


Figura 3.6. Valores médios da atividade de superóxido dismutase nas folhas 5, 6 e 7 de plantas de *I. nil* ‘Scarlat O’Hara, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Verão; B. Outono; C. Inverno; D. Primavera. Não houve diferenças significativas nos níveis de SOD entre os tipos de folhas analisadas, em cada dia de amostragem e em cada estação do ano.

A - outono



B - inverno



C - primavera

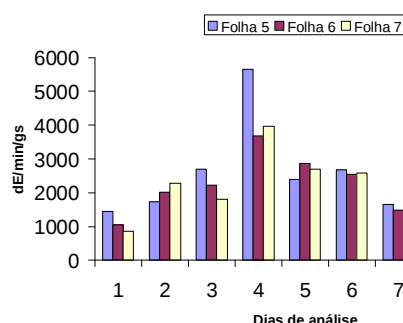


Figura 3.7. Valores médios da atividade da peroxidases nas folhas 5, 6 e 7 de plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Outono; B. Inverno; C. Primavera. * indica que o nível de POD é significativamente maior do que nas outras folhas analisadas, no dia de amostragem. Nas demais amostragens, não houve diferenças significativas nos níveis de POD entre os tipos de folhas analisadas.

O conteúdo médio de ácido ascórbico por planta na campanha de verão variou significativamente ao longo dos dias de amostragem em cada campanha experimental e entre as estações do ano (Figura 3.8A). No primeiro dia de amostragem, foi encontrada a menor concentração do antioxidante, e após uma semana houve um pico de AA nas plantas que foram expostas no parque do Ibirapuera. Nas semanas seguintes, a concentração foi

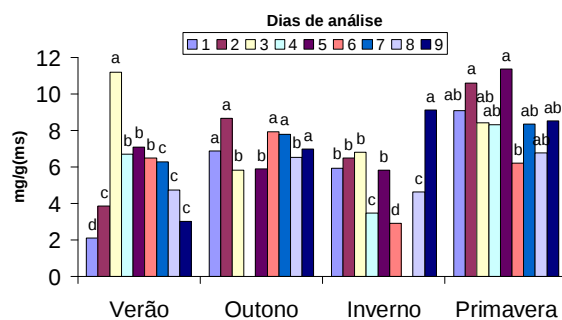
abaixando nas plantas até que no último dia de análise as plantas apresentaram uma baixa concentração de AA em relação aos valores encontrados no meio da campanha. Durante a campanha de outono, a concentração de ácido ascórbico nas plantas de *I nil* não variou muito ao longo dos dias, sendo os maiores valores encontrados no início, no meio e no fim da exposição. A campanha de inverno foi caracterizada pela maior concentração do antioxidante no último dia de análise, antecedido pelos menores valores encontrados naquele período de exposição. AA, na campanha de inverno, manteve um nível relativamente alto durante o período de envelhecimento das plantas. Observou-se, também, uma concentração significativamente maior no início e meio da campanha. Na primavera, houve dois picos de concentração de AA nas plantas retiradas do campo no segundo e quinto dias de análise e a menor concentração foi observada na amostragem subsequente. Na primavera, registrou-se a maior concentração de AA nas plantas expostas no parque do Ibirapuera, sendo seguida da campanha de outono, inverno e verão. O menor conteúdo desse antioxidante foi verificado nas campanhas de verão e inverno.

A enzima superóxido dismutase apresentou no meio da campanha de verão, mais precisamente no terceiro e sétimo dias de análise, as maiores atividades encontradas nas plantas analisadas. Durante a campanha de outono, foi encontrado um pico na atividade da enzima no sétimo dia de análise, sendo esse seguido de valores decrescente de atividade enzimática. Semelhantemente ao perfil encontrado para o ácido ascórbico, na campanha de inverno, SOD apresentou uma atividade significativamente maior no último dia de amostragem e os menores valores no meio da campanha. Durante a primavera, foi encontrado um perfil relativamente crescente na atividade de SOD conforme a planta foi ficando mais velha e mais tempo em exposição no local poluído. Nota-se que, nos três últimos dias de amostragem, a atividade da enzima foi significativamente maior do que nos

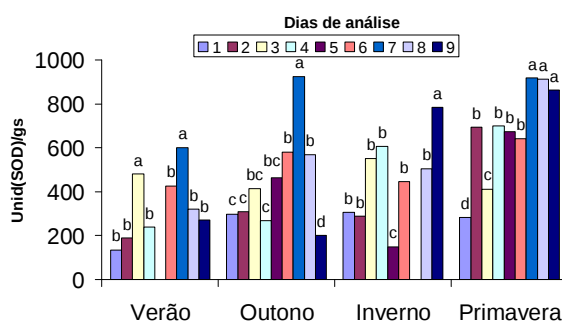
outros dias. A campanha de primavera se caracterizou também pela maior atividade da enzima nas plantas de *I. nil*, quando comparada aos valores obtidos na campanha de verão (Figura 3.8B).

A atividade da enzima POD nas folhas de *Ipomoea nil*, durante a campanha de outono, apresentou-se pouco variável. Logo no início da campanha, houve uma diferença significativamente maior quando comparada aos outros dias de análise. O perfil do antioxidante nas plantas expostas na campanha de inverno não variou significativamente ao longo dos dias de análise. Durante a campanha de primavera, foi observada maior atividade da enzima no quarto dia de análise, sendo seguido por uma ligeira queda nos níveis do antioxidante nas folhas e apresentando um outro pico significativamente maior no fim do período de análises. A atividade de POD ao longo das estações variou bastante, sendo maior nas plantas durante a campanha de primavera. Os menores valores da atividade enzimática nas plantas expostas no parque do Ibirapuera ocorreram no outono (Figura 3.8C).

a) AA



b) SOD



c) POD

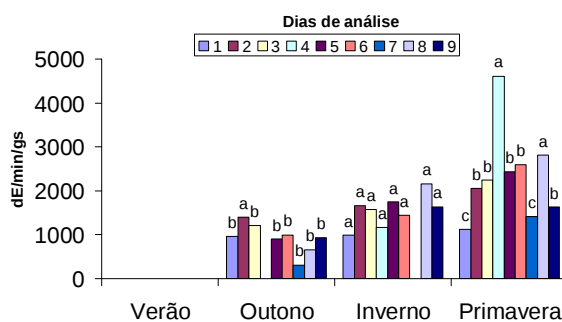
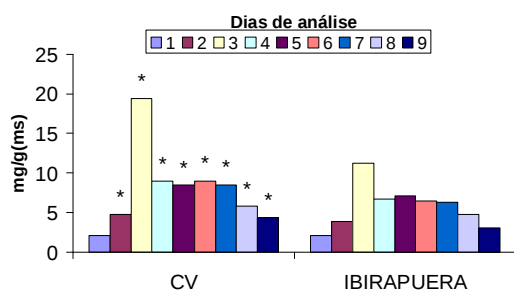


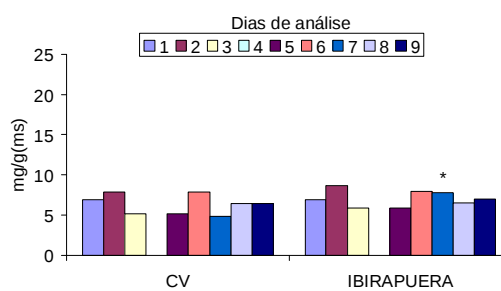
Figura 3.8. Perfis médios dos antioxidantes, para as folhas 5, 6 e 7, de plantas de *I. nil* Scarlat O'Hara, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. Figura A. Ácido ascórbico (AA); Figura B. Superóxido dismutase (SOD); Figura C. Peroxidases (SOD). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os dias de amostragem em cada estação.

Nas Figuras 3.9 a 3.11, encontram-se os valores médios para os antioxidantes analisados em plantas expostas na casa de vegetação (local de referência) e no parque do Ibirapuera, ao longo dos dias de exposição em cada campanha experimental. Verificou-se que, na campanha de verão, as concentrações de ácido ascórbico nas plantas expostas no parque do Ibirapuera foram, em todos os dias de análise, significativamente menores do que nas plantas expostas na casa de vegetação, resultado que não se repetiu nas outras campanhas. Nestas, os perfis médios de AA nas plantas de ambos os locais foram, com raras exceções, semelhantes (Figura 3.9). O perfil de SOD das plantas expostas em ambos ambientes foi bastante semelhante ao longo das campanhas, com exceção da campanha de outono, quando a atividade dessa enzima foi significativamente diferente nas plantas dos dois locais em um dos dias analisados (Figura 3.10). As peroxidases não apresentaram diferença significativa em relação ao ambiente em que as plantas foram expostas (Figura 3.11).

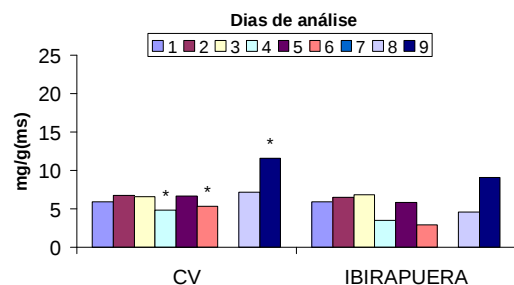
a) verão



b) outono



c) inverno



d) primavera

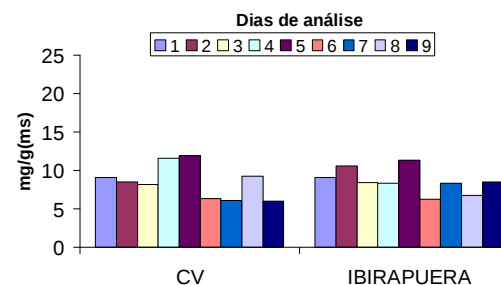
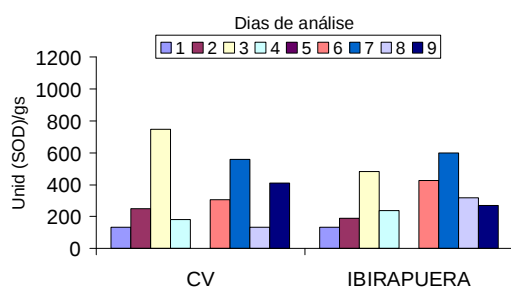
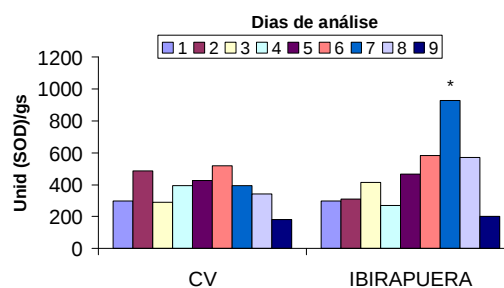


Figura 3.9. Perfis médios de ácido ascórbico em folhas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara' expostas na casa de vegetação com ar filtrado (CV) e no parque do Ibirapuera, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Verão; B. Outono; C. Inverno; D. Primavera. * indica valor significativamente superior ao observado no mesmo dia de análise em plantas mantidas no outro local.

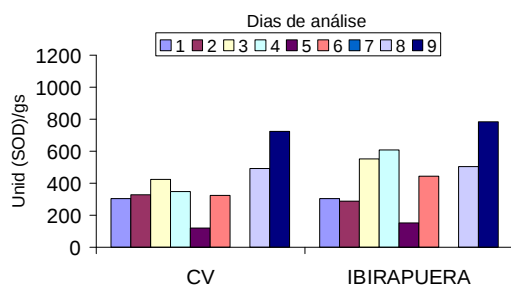
a) verão



b) outono



c) inverno



d) primavera

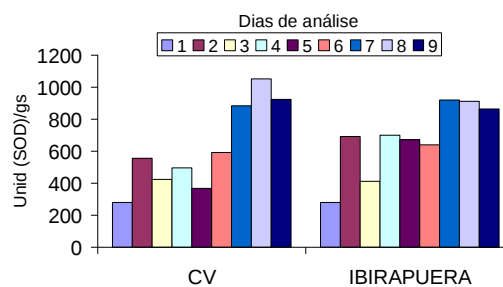
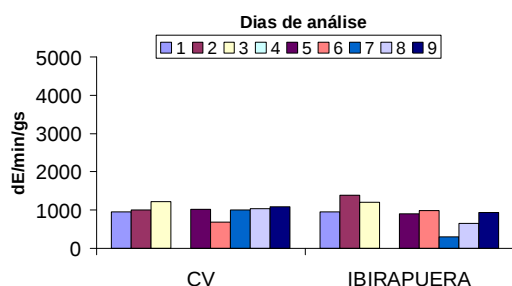
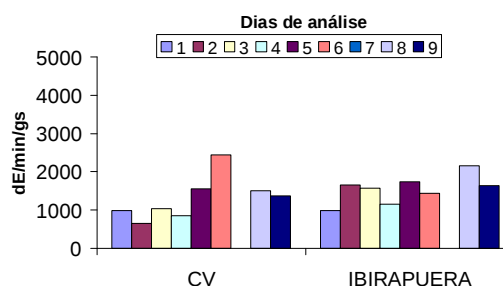


Figura 3.10. Perfis médios de superóxido dismutase em folhas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara' expostas na casa de vegetação com ar filtrado (CV) e no parque do Ibirapuera, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Verão; B. Outono; C. Inverno; D. Primavera. * indica valor significativamente superior ao observado no mesmo dia de análise em plantas mantidas no outro local.

a) outono



b) inverno



c) primavera

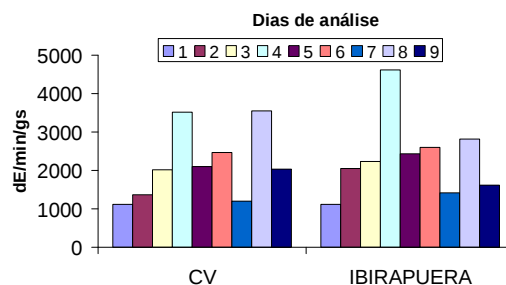


Figura 3.11. Perfis médios de peroxidases em folhas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara' expostas na casa de vegetação com ar filtrado (CV) e no parque do Ibirapuera, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Outono; B. Inverno; C. Primavera. Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Em média, todos os antioxidantes foram respectivamente mais e menos expressivos nas campanhas da primavera e do verão, nas plantas provenientes do parque do Ibirapuera. Os valores médios para as enzimas SOD e POD tenderam sempre a ser mais altos nas plantas do parque do Ibirapuera do que nas mantidas sob ar filtrado em casa de vegetação. A concentração média de AA, por sua vez, foi menor no local poluído, no verão e no inverno (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Valores médios de concentração de ácido ascórbico (AA- $\mu\text{g/g ms}$) e da atividade de superóxido dismutase (SOD- Unid/g ms) e peroxidases (POD- dE/min/g ms) em plantas de *I. nil* ‘Scarlat O’Hara, expostas, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental, na casa de vegetação com ar filtrado (CV) e no parque do Ibirapuera (IBI).

	AA		SOD		POD	
	CV	IBI	CV	IBI	CV	IBI
Verão	7,3 A	5,6 B	314,5 B	336,4 B	#	#
Outono	6,3 A	7,1 AB	370,5 B	448,1 AB	1008,4 B	921,9 C
Inverno	6,9 A	5,7 B	384,0 B	454,5 AB	1300,2 B	1547,8 B
Primavera	8,6 A	8,6 A	619,8 A	677,3 A	2153,3 A	2325,0 A

A análise de componentes principais (ACP) indicou qualitativamente a sazonalidade que ocorreu entre os fatores bióticos no parque do Ibirapuera ao longo das quatro campanhas realizadas.

A análise de componentes principais para os fatores bióticos explicou 92,7% da variabilidade dos dados nos eixos um e dois, dos quais o eixo um teve uma explicabilidade de 59,7% e o eixo dois 33%. POD apresentou uma forte relação com o eixo 1 enquanto AA e SOD apresentaram uma forte relação com o eixo 2 (Tabela 3.5). No lado positivo do eixo 1, as unidades amostrais da primavera mostraram-se associadas aos altos valores de POD. As unidades referentes a essa campanha ainda se associaram fortemente com os altos valores de AA e SOD no lado negativo do eixo 2. No lado positivo do eixo 2 observa-se uma associação das unidades amostrais referentes à estação de verão aos baixos valores de

AA e SOD. Para as estações de outono e inverno observa-se a associação pontual de algumas unidades aos altos valores de AA e SOD no lado negativo do eixo 2 (Figura 3.12). O início e o término da campanha de verão foram associados aos baixos valores de AA enquanto toda a campanha foi caracterizada por baixos valores de SOD nas plantas. A campanha de outono não ficou caracterizada pela prevalência de nenhum dos antioxidantes analisados. A campanha de inverno se associou aos baixos valores de POD, ao passo que a campanha de primavera foi caracterizada pela associação aos altos valores de AA, SOD e POD (Figura 3.12).

Tabela 3.6. Relação dos valores médios dos fatores bióticos com os eixos um e dois da análise de componentes principais (ACP) realizada para os dados das plantas expostas no parque do Ibirapuera.

Antioxidantes	Eixo 1	Eixo 2
	r	r
AA	0,33	-0,61
SOD	0,15	-0,96
POD	0,99	0,12

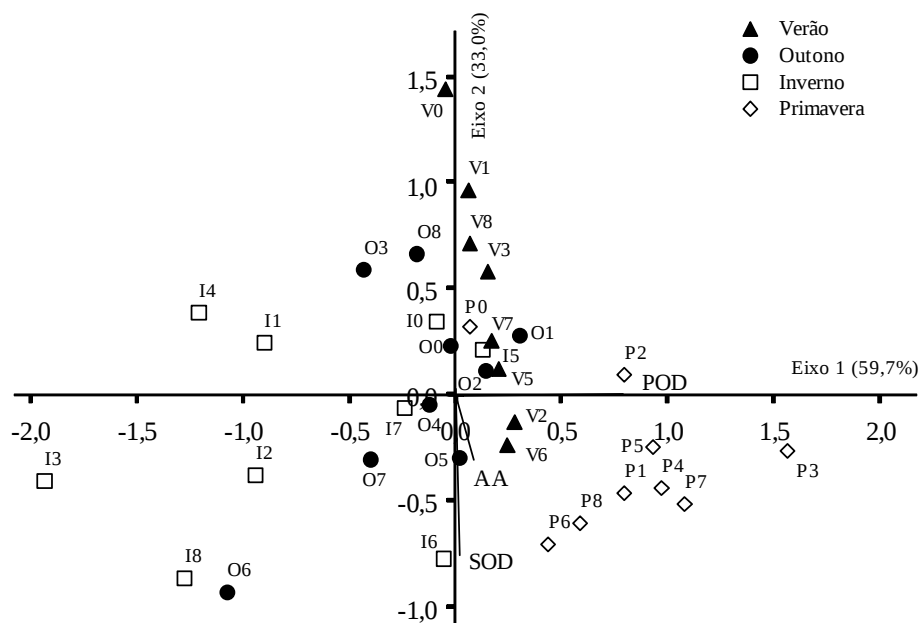


Figura 3.12. Gráfico da análise de componentes principais para os antioxidantes em folhas plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara' expostas no parque do Ibirapuera, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. AA- ácido ascórbico, SOD – superóxido dismutase e POD – peroxidases. As letras ao lado dos símbolos representam a estação do ano (V-verão; O-outono; I-inverno e P-primavera) e os números indicam o dia em que foi realizada a análise durante cada campanha (1 a 9 dias de análise).

C. Injúrias foliares

Foram observadas injúrias foliares visíveis em todas as campanhas experimentais, variando, entre elas, a extensão da área foliar afetadas pelas mesmas. Todas as injúrias consideradas na análise foram observadas na superfície adaxial das folhas, entre as nervuras. Houve momentos em que as áreas ocupadas por clorose eram maiores e irregulares em formato (Figura 3.13A) e, em outros, em que foram observadas manchas escuras irregulares em tamanho e formato, aparentando um estágio inicial para a formação de necroses (Figura

3.13B). Necroses foliares de tonalidade escura e formato e dimensões irregulares também foram observadas, associadas ou não a áreas cloróticas, como ilustrado na Figura 3.13C.

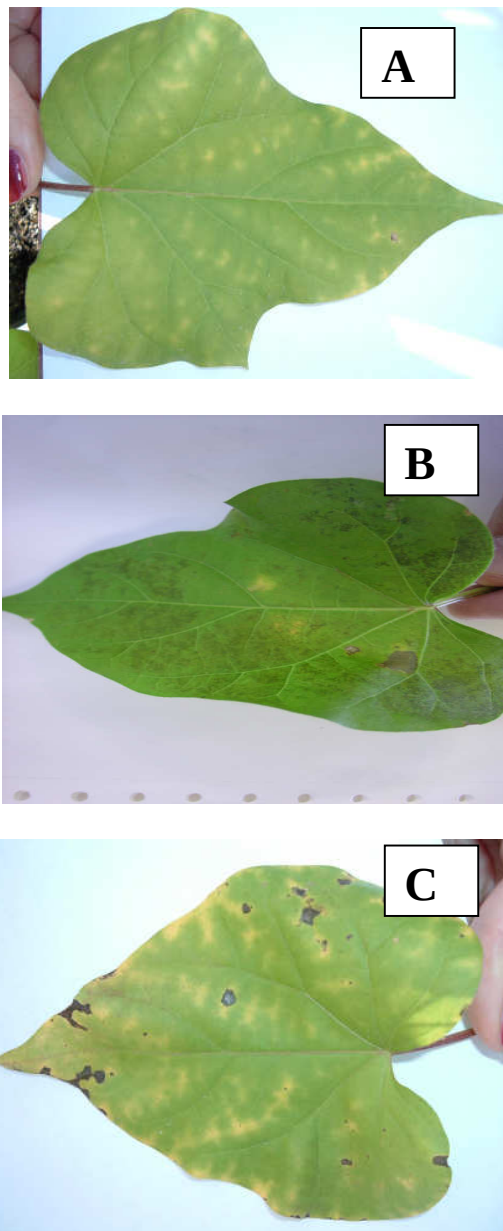
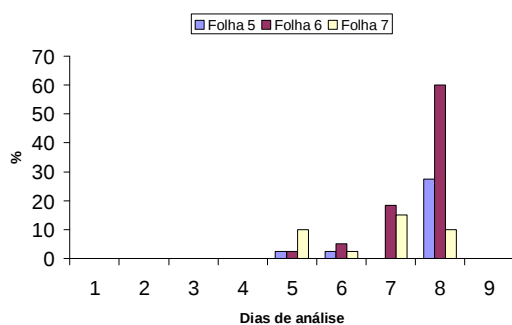


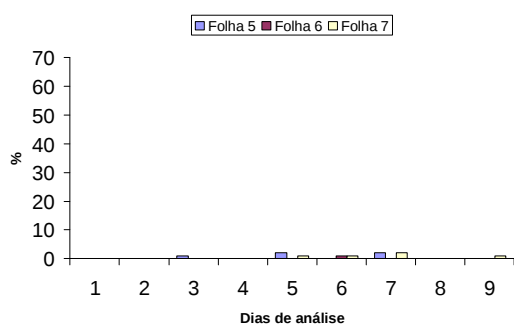
Figura 3.13. Injúrias foliares em plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara expostas no parque do Ibirapuera. A. folha com 15% de clorose. B. folha com 20% de necrose. C. folha com 25% de injúria (cloroses e necroses).

Em todas as campanhas, as injúrias foliares sempre surgiram após a primeira semana de exposição, entre o terceiro e o quinto dia de análise (Figuras 3.14 e 3.15). Na campanha de verão, observou-se uma maior porcentagem de danos na folha 6, especialmente no final do período. Essa foi a estação do ano na qual as plantas mostraram a maior área foliar afetada. Os danos se intensificaram do meio para o fim da campanha. A campanha de outono foi marcada por apresentar baixa porcentagem de danos foliares, apesar deles terem surgido precocemente em relação à campanha de verão (dia 3 de análise). A campanha de inverno foi caracterizada por apresentar uma maior intensidade de danos nas três folhas analisadas ao longo do período de exposição. Durante a campanha de primavera, os primeiros danos também ocorreram na primeira semana de exposição. Esses valores não foram progressivos, porém a intensidade de injúrias manteve-se até o final da campanha, mesmo que em menores porcentagens.

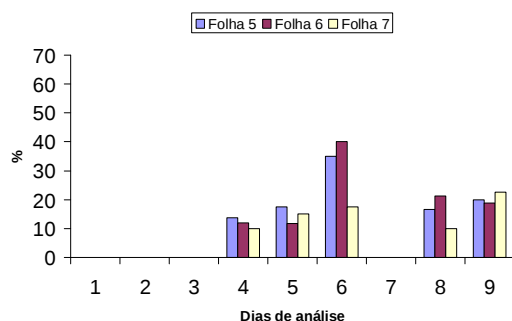
a) verão



b) outono



c) inverno



d) primavera

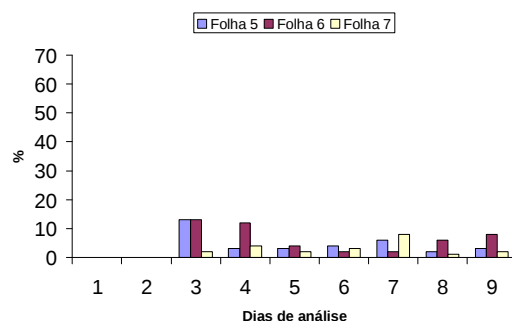


Figura 3.14. Valores médios da porcentagem de área foliar afetada por injúrias visíveis nas folhas 5, 6 e 7 de plantas de *I. nil*, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental. A. Verão; B. Outono; C. Inverno; D. Primavera.

Expressando os dados como médias por planta, observa-se que as injúrias foliares em plantas de *I. nil* se manifestaram nas quatro campanhas, porém, em maior intensidade na campanha de verão. No outono, estimou-se baixa porcentagem média de área foliar coberta por injúrias foliares. Na campanha de inverno, pôde-se observar uma porcentagem média relativamente alta de injúrias quando comparadas às outras campanhas, e na de primavera, verificou-se uma porcentagem média relativamente constante de danos foliares ao longo da exposição, porém, inferior à observada no inverno e no verão.

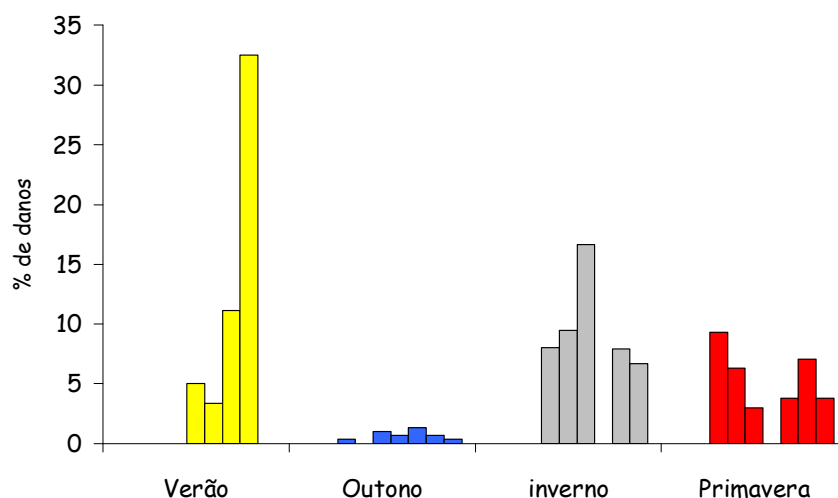


Figura 3.15. Porcentagem média de área foliar afetada por sintomas foliares, para as folhas 5, 6 e 7, de plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara expostas no parque do Ibirapuera, em nove dias de análise, ao longo dos 28 dias de cada campanha experimental.

Discussão

O ano de 2006 foi atípico para algumas características abióticas. Observou-se, por exemplo, maior radiação na campanha de inverno do que na de primavera. Tal fato pode ser atribuído à alta nebulosidade ocorrida no início da segunda semana desta última. Estas condições meteorológicas atípicas se refletiram nas concentrações de ozônio na atmosfera, que apesar de ter sido registrada uma sazonalidade marcante, não foram observados altos índices do poluente no ar, nem mesmo uma frequência repetida de dias de ultrapassagem do padrão proposto pela CETESB.

Neste estudo, observou-se que a mesma tendência que as plantas de *Ipomoea nil* expostas na casa de vegetação apresentavam em relação ao conteúdo e atividade dos antioxidantes nas diferentes folhas se repetiu quando elas foram expostas nesse ambiente poluído. Isto

quer dizer que as variações sazonais naturais na fisiologia e metabolismo das plantas, em resposta a estímulos climáticos, não devem ter sido alteradas pelos fatores do ambiente poluído supostamente indutores do estresse oxidativo. As mudanças pontuais nos níveis dos antioxidantes nas plantas do ambiente poluído, em relação aos obtidos para plantas do local de referência, poderiam ser atribuídas a ocorrências esporádicas de picos nesses fatores. É possível que, sob amplitude típica de variação nos fatores abióticos no local de exposição, as plantas de *I. nil* venham a apresentar respostas antioxidativas distintas das encontradas neste estudo.

Tanto as folhas mais velhas quanto as mais novas quando, expostas ao ambiente poluído, apresentaram um mesmo perfil na defesas antioxidativas. Aliás, a semelhança nos níveis dos antioxidantes entre as 5^a, 6^a e 7^a folhas mais velhas de plantas de *I. nil* ao longo das exposições, revelada por meio de análises de correlação de Pearson (dados não mostrados), é mais evidente quando estas foram mantidas no ambiente poluído do que quando o foram no ambiente sem poluição. Isto mostra que as diferenças na idade da folha e em seu grau de expansão, no presente estudo, não foram importantes sob esse aspecto como já foi demonstrado em outros estudos.

Craker & Starbuck (1973) sugeriram que folhas maiores podem facilitar a movimentação dos poluentes aéreos no interior das folhas, o que exige uma maior eficiência do seu sistema de defesa. Esses autores ainda colocam que a movimentação dos poluentes no interior das folhas possa nem sempre estar relacionada à movimentação estomática. Um outro fator importante a se considerar é a idade da planta, pois o grau de desenvolvimento fisiológico, bioquímico e morfológico pode afetar sua resposta de defesa contra a ação do estresse oxidativo causado por ozônio. Rebbeck *et al.* (1993) observaram que folhas mais velhas de *Picea rubens* tinham uma menor taxa de absorção de ozônio do que folhas mais

novas. Grulke & Miller (1994) mostraram que folhas de plantas adultas de *Sequoiadendron giganteum* apresentaram uma menor sensibilidade ao ozônio do que folhas de plantas jovens dessa espécie. Uma das explicações para estes fatos foi apresentada por Castagna *et al.* (2001), de que a queda na condutância estomática em folhas maduras pode estar relacionada à redução na eficiência da carboxilação dessas folhas. Corroborando esta idéia, Musselman & Massman (1999) colocam que planta exposta à poluição pode apresentar alterações na condutância estomática. Alguns autores consideram que a atividade de POD aumenta com a idade dos tecidos (Iqbal *et al.* 1996, Klumpp *et al.* 1999). Isto pode explicar porque, durante a campanha de inverno e primavera, a POD tendeu a estar mais ativa na folha mais velha de *I. nil* (folha 5).

A diminuição da movimentação estomática nas plantas de *I. nil*, na campanha de verão realizada no parque do Ibirapuera, pode explicar, pelo menos parcialmente, a menor concentração de AA e menor atividade de SOD, quando comparadas às obtidas em outras campanhas do ano. Segundo Musselman & Massman (1999), o fluxo de ozônio para dentro da planta pode ser definido como um produto da condição estomática. Moraes *et al.* (2006) observaram que plantas jovens de *Caesalpinia echinata*, em condições de fumigação, não apresentaram uma alta atividade do sistema de defesa antioxidativo e atribuíram este fato a baixa condutância estomática, que provavelmente limitou a absorção do poluente e a futura formação de EAO. Como mostra a análise de componentes principais, a campanha de verão ficou marcada pelos maiores valores de temperatura e radiação e foi a que registrou uma média mais alta dessas variáveis ambientais, o que provavelmente pode ter restringido a abertura dos estômatos. Nessas condições, a absorção estomática de ozônio, em alta concentração durante o verão, seria menor e, conseqüentemente, as respostas antioxidativas também seriam menos intensas. Além disso, nessas condições ambientais, tais respostas

menos intensas poderiam ser explicadas também pela restrição da fotossíntese pelo fechamento estomático, o que contribuiria para diminuição da produção natural de espécies ativas de oxigênio e de antioxidantes, como foi comentado no capítulo anterior.

Segundo Sheriff (1979), um aumento na temperatura da folha, porém ainda abaixo do *optimum* para fotossíntese abaixa a concentração de CO₂ intercelular, o que resulta num aumento da abertura estomática, porém, se a temperatura da folha for acima do *optimum* para fotossíntese, a concentração de CO₂ pode aumentar e resultar num maior fechamento estomático. Vergé *et al.* (2002) observaram que plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Bel W3 expostas ao ozônio troposférico numa condição de alta radiação, velocidade de vento e baixa umidade relativa não apresentaram injúrias quando comparadas às outras que estavam em condições diversas, devido a uma provável alta evaporação e conseqüentemente uma tendência ao fechamento estomático. Porém, no presente estudo, a possível diminuição da condutância estomática e, conseqüente diminuição do fluxo de ozônio para o interior da folha, não chegou a impedir a ocorrência de injúrias foliares no verão, que, inclusive, foram as mais extensas observadas neste estudo. Possivelmente, devido aos níveis baixos das defesas antioxidativas nesse período, o equilíbrio pró-oxidante-antioxidante deve ter se rompido, resultando em distúrbios celulares extensivos e visíveis ao olho nu.

Isto, na realidade, parece indicar a capacidade elástica da planta em suportar e reparar os danos sofridos. Segundo Larcher (2000), quando uma planta está sob uma condição de estresse, ela passa primeiramente por uma fase de “alarme”, caracterizada pela perda da estabilidade dos processos fisiológicos e bioquímicos. Caso ela permaneça sob o estresse, haverá uma restituição nos processos de reparo, fato que levará a planta a uma maior resistência, chamada segundo o autor, fase de “rustificação”. Se a condição estressante

permanecer, a planta provavelmente entrará numa fase denominada “exaustão”, na qual ela fica mais vulnerável a infecções e conseqüentemente morre. Na campanha de verão, as plantas de *I. nil* pareceram ter alcançado a fase de “exaustão” mais rapidamente do que aconteceu em outras campanhas.

Por outro lado, a campanha de primavera foi a que registrou os maiores valores de antioxidantes analisados nas folhas de *I. nil* expostas no parque do Ibirapuera. Segundo Raychaudhuri & Deng (2000), durante a adaptação ao aumento do estresse oxidativo, os níveis de SOD podem aumentar, dependendo da espécie da planta, estágio de desenvolvimento ou do grau de condição do estresse. Um fator que pode acentuar tais reações de defesa é a temperatura, que segundo Scandalios (1993), pode levar a um aumento na produção de SOD. Deve-se considerar que um aumento na atividade de SOD gera como consequência uma maior produção de H_2O_2 , que, por sua vez, exigirá uma maior atividade de POD (ascorbato peroxidase, em particular) e ácido ascórbico (AA) como substrato para a desintoxicação da célula em relação ao H_2O_2 . Assim, maior atividade de SOD e de POD e maior concentração de AA podem indicar eficiência da espécie em manter o equilíbrio pró-oxidante-antioxidante. Sendo assim, é possível supor que a intensidade de injúrias foliares em plantas de *I. nil* mantidas no Ibirapuera na primavera poderia ter sido maior, em resposta ao ozônio, caso essas espécies antioxidativas tivessem sido menos eficiente. Nesse período, a fase de “rustificação”, definida por Larcher (2000), estaria mais evidente. Cabe lembrar, no entanto, que o aumento na atividade de POD não é necessariamente explicado pela interferência dos poluentes aéreos nas plantas. Segundo Iqbal *et al.* (1996), o aumento na atividade dessa enzima varia de acordo com as estações do ano, situações ambientais e funções endógenas da planta.

Entre os antioxidantes analisados, ácido ascórbico pareceu ser fundamental na defesa da

planta contra o estresse oxidativo que foi intensificado pelas condições do ambiente poluído, mostrando que neste caso, ele provavelmente atuou como uma primeira linha de defesa. Isto pôde ser demonstrado, por exemplo, na campanha de verão, quando a exposição das plantas ao ozônio foi intensa e quando o conteúdo desse antioxidante nas plantas expostas no parque do Ibirapuera foi significativamente menor, durante todo o período, do que o das plantas expostas na casa de vegetação. Moraes *et al.* (2000) observaram que a redução de ácido ascórbico em *Tibouchina pulchra* após sua exposição a um ambiente perturbado estava relacionada à redução na síntese desse antioxidante ou ao alto consumo pelas espécies ativas de oxigênio. Segundo Smirnoff (1996), Torsethaugen *et al.* (1997) e Potters *et al.* (2002), Conklin & Barth (2004), o ácido ascórbico apresenta-se como uma primeira linha de defesa para muitas espécies de plantas, o que indica que a sua menor concentração nas plantas expostas no parque do Ibirapuera deve-se ao fato dele já ter sido parcialmente consumido. Esse fato ocorre novamente durante a campanha de inverno, porém em menor intensidade, o que pode ser justificado pelas condições ambientais não terem sido tão desfavoráveis.

SOD, em média, mostrou uma maior atividade em plantas expostas no parque do Ibirapuera do que naquelas mantidas sob ar filtrado. Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Chernikova *et al.* (2000), que encontraram uma maior atividade de SOD e glutathione-redutase em plantas de *Glycine max* L. cv. Essex quando expostas ao ozônio em câmaras de topo aberto. Scebba *et al.* (2003) também encontram uma maior atividade de SOD em plantas de *Trifolium repens* após fumigação com ozônio.

A intensidade de injúria foliar em plantas expostas ao ozônio depende preponderantemente da sensibilidade da espécie ao poluente. Muitos estudos têm sido feitos nesta área, a fim de comparar as respostas antioxidativas para as espécies, variedades ou cultivares com

diferentes graus de sensibilidade para o ozônio (Heggstad 1991; Karlsson *et al.* 1995; Ranieri *et al.* 1996; Bulbovas 2005). *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara mostrou-se aparentemente sensível ao ozônio, uma vez que, em todas as campanhas, danos visíveis semelhantes aos causados por esse poluente a outras espécies vegetais, foram observados. Qualitativamente, a intensidade dos danos refletiu o nível de contaminação do ambiente por ozônio. As maiores porcentagens de injúrias foliares nas plantas foram encontradas na campanha de verão, quando a dose acumulada de ozônio (AOT40) foi mais alta e as menores foram observadas no outono refletindo a baixa perturbação do ambiente por ozônio observada. Contudo, o grau de sensibilidade dessa cultivar estudada ao ozônio não pode ser estabelecido somente a partir dessa comparação qualitativa. Há que se considerar também a eficiência do sistema de defesa antioxidativo, que pareceu alta em alguns períodos no presente estudo e a ocorrência de múltiplos estresses no ambiente e não somente ozônio, aos quais as plantas também respondem (Bray *et al.* 2000), o que pode aliviar ou intensificar os danos causados por ozônio. É preciso, ainda, estabelecer curvas do tipo dose x resposta, em laboratório, simulando, na medida do possível, condições ambientais próximas às observadas no ambiente poluído, a fim de definir doses críticas a partir dos quais injúrias foliares surgem e o modelo que melhor explica a relação entre concentrações de ozônio e intensidade de injúrias foliares.

Sintetizando, os resultados obtidos nesta segunda fase do trabalho indicam que *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara parece ser, de fato, sensível ao ozônio e que a intensidade dos danos reflete qualitativamente o nível de contaminação do ambiente por ozônio. Contudo, os diferentes fatores de estresse oxidativo presentes no ambiente poluído, de origem meteorológica ou de contaminação atmosférica, incluindo o próprio ozônio, podem estimular o sistema de defesa da planta, comprometendo, assim, a ocorrência de danos foliares, em resposta ao

poluente em questão, ou mesmo causando um retardamento no surgimento de injúrias visíveis.

Referências bibliográficas

- Ashmore M, Toet S, Emberson L. 2006. Ozone – a significant threat to future world food production? *New phytologist* 170: 201-204
- Bray EA, Bailey-Serres J & Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan BB, Gruissen W & Jones RL, eds.). American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158-1203.
- Bulbovas P. 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras de resistência à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP., 102p.
- CETESB. 2004. Caracterização das Estações da Rede Automática de monitoramento da Qualidade do Ar na RMSP. Estação Ibirapuera. Julho 2004.
- Chemoldes W L. 1989. The chemistry of ozone deposition to plant leaves: Role of ascorbic acid. *Environ. sci. technol.* 23: nº 05
- Chernikova T, Robinson J M, Lee E H, Mulchi C L. 2000. Ozone tolerance and antioxidant activity in soybean cultivars. *Photosynthesis research* 64: 15-26.
- Conklin, P L; Barth, C. 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, cell and environment.* 27: 959-970.

- Craker L E, Starbuck J S. 1973. Leaf age and air pollutant susceptibility: uptake of ozone and sulfur dioxide. *Environmental research* 6: 91-94.
- Foyer C H, Lopes-Delgado H, Dat J F, Scott I N. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. *Plant Physiology* 100: 241-254.
- Guri A. 1983. Variation in glutathione and ascorbic acid content among selected cultivars of *Phaseolus vulgaris* prior to and after exposure to ozone. *Can J plant Sci* 63: 733-737
- Gulke N E, Miller P R. 1994. Changes in gas exchange characteristics during the life span of giant sequoia: implication for response to current and future concentrations of atmospheric ozone. *Tree physiology* 14: 659-668.
- Heggestad H E. 1991. Origin of Bel-W3, Bel C and Bel B tobacco varieties and their use as indicator of ozone. *Environmental pollution* 74: 264-291.
- Iriti M, Belli L, Cristina N, Lorenzini G, Gerosa G, Faoro F. 2005. Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environmental pollution* 141: 275-282.
- Iqbal M, Abidin M Z, Mahmooduzzafar M Y, Agrawal M. 1996. Resistance mechanism in plants against air pollution. In: *Plant response to air pollution* (M. Yunus & M. Iqbal *et al.* eds). John Wiley and Sons, Chichester, p. 195-240.
- Karlsson G P, Sellden G, Skarby L, Pleijel H. 1995. Clover as an indicator plant for phytotoxic ozone concentration: visible injury in relation to species, leaf age and exposure dynamics. *New phytologist* 129: 355-365.

- Klumpp G, Furlan C M, Domingos M, Klumpp A. 1999. Response os stress indicators and growth paramenters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil. The science of the total environment 246: 79-81.
- Larcher W. 2000. Ecofisiologia Vegetal. Rima Artes e Textos, São Carlos.
- Laurence J. A. & Weinstein L. H. 1981. Effects of air pollutants on plant productivity. Annual review of phytopathology 19: 257-271.
- Madamanchi N R, Hausladen A, Alscher R G, Amundson R G, Fellows S. 1991. Seasonal changes in antioxidants in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) from three field sites in the northeastern United States. New Phytologist. 118: 331-338.
- Mayer H. 1999. Air pollution in cities. Atmospheric environmental 33: 4029-4037.
- Moraes R M, Delitti W B C, Moraes J A P V. 2000. 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, Bulbovas P, Furlan C M, Domingos M, Meireles S, Delitti W B C, Sanz M J. 2006. Physiological responses of saplings of *Caesalpina echinata* Lam., a brazilian tree species, under ozone fumigation. Ecotoxicology and environmental safety 63: 306-312.
- Musselman R C, Massman W J. 1999. Ozone flux to vegetation and its relationship to plant response and ambient air quality standards. Atmospheric pollution 33: 65-73.

- Pasqualini S, Della Torre G, Ferranti F, Ederli L, Piccioni C, Reale L & Antonielli M. 2002. Salicylic acid modulates ozone-induced hypersensitive cell death in tobacco plants. *Physiologia plantarum* 115: 204-212
- Pitcher L H, Zilinskas B A. 1996. Over expression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant physiology* 110: 583-588.
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N. 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant physiology biochemistry* 40: 537-548.
- Ranieri A, D'Urso G, Nali C, Lorenzini G, Soldatini G F. 1996. Ozone stimulates apoplastic system in pumpkin leaves. *Physiologia Plantarum* 97: 381-387.
- Raychaudhuri S S, Deng X W. 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The botanical review* 66: 89-98.
- Rebbeck J, Jensen K F, Greenwood M S. 1993. Ozone effects on grafted mature and juvenile red spruce: photosynthesis, stomatal conductance and chlorophyll concentration. *Canadian Journal of forest research*. 23: 450-456.
- Scandalios J G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology* 101: 7-12.
- Scebba F, Pucciarelli I, Soldatini G F, Ranieri A. 2003. O₃-induced changes in the antioxidant systems and their relationship to different degrees of susceptibility of two clover species. *Plant science*. 165: 583-593
- Schwartz J, Fellow V. 2006. Air pollution: Why is public perception so different from reality? *Environmental progress* 25, n°4.

Sheriff D W. 1978. Stomatal aperture and the sensing of the environment by guard cells.

Plant, cell and environment 2: 15-22.

Smirnoff N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. Annuals of botany. 78: 661-669.

SVMA 2004. Secretaria municipal do verde e do meio ambiente. Atlas ambiental do município de São Paulo – O verde, o território, o ser humano: diagnósticos e bases para a definição de políticas públicas para as áreas verdes do município de São Paulo.

Torsethaugen G, Pitcher L H, Zilinskas A, Pell E J. 1997. Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. Plant physiology 114:529-537

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

Vergé X, Chapuis A, Delpoux M. 2002. Bioindicator reliability: the exemplo of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Environmental pollution 118: 337-349.

Capítulo IV

Potencial bioindicador de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara para ozônio troposférico da cidade de São Paulo/SP

Introdução

O ozônio, um gás inodoro, instável e de coloração azul pálida, está presente tanto na estratosfera quanto na troposfera do planeta. Na estratosfera, ele apresenta uma função benéfica aos organismos vivos por absorver e filtrar a radiação ultravioleta do sol (Krupa & Manning 1988). Já na troposfera, ele tem preocupado não somente cientistas, mas também autoridades políticas devido à sua alta toxicidade. Em grandes cidades, a concentração de ozônio na troposfera depende do volume de veículos em circulação e da intensidade das atividades urbanas (Mayer 1999; Domingos *et al.* 2002).

Na cidade de São Paulo, terceiro maior conglomerado urbano do mundo, com uma população superior a 17 milhões de habitantes, uma frota veicular composta por mais de 7,4 milhões de carros e caminhões e com cerca de 2000 indústrias com alto potencial poluidor dos precursores do ozônio, o padrão de qualidade do ar ($160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para uma hora) e o nível de atenção ($200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para uma hora) para esse poluente são comumente ultrapassados em alguns pontos da cidade (CETESB 2005). Tal ultrapassagem ocorre principalmente entre os meses de outubro a março. Outros poluentes preocupantes que compõem a atmosfera de São Paulo são dióxido de enxofre (SO_2), material particulado (MP), monóxido de carbono (CO) e dióxido de nitrogênio (NO_2).

Tais poluentes podem ser monitorados de forma precisa através de métodos físico-químicos, atividade que vem sendo executada pela CETESB em São Paulo, que é a companhia estadual responsável por avaliar e fiscalizar a qualidade do ar no âmbito do estado todo. Porém, alguns países do mundo utilizam seres vivos, entre eles plantas, para indicar a presença em níveis tóxicos ou estimar a concentração desses poluentes na atmosfera, método denominado biomonitoramento, que tem sido considerado como uma ferramenta barata e de fácil aplicação (De Temmerman *et al.* 2004). Além desse método

indicar a qualidade do ar sob ponto de vista biológico, poderia potencialmente ampliar a área de abrangência do monitoramento, desde que um modelo confiável entre respostas indicadoras vegetais e níveis de contaminação atmosférica do poluente em questão possa ser proposto.

Em regiões tropicais, especialmente no Brasil, algumas espécies vegetais têm sido propostas para biomonitoramento de poluentes aéreos em geral, entre elas *Tibouchina pulchra* (Klumpp *et al.* 2000; Furlan *et al.* 2004), *Psidium guajava* (Klumpp *et al.* 1997; Moraes *et al.* 2002), *Tradescantia sp.* (Ferreira *et al.* 2007) e *Tillandsia usneoides* (Figueredo *et al.* 2007).

A cultivar Bel W3 de *Nicotiana tabacum*, em especial, tem sido amplamente usada em países do hemisfério norte (Vergé *et al.* 2002; Klumpp *et al.* 2006) em estudos de biomonitoramento devido a sua sensibilidade a baixos níveis de ozônio e surgimento de necroses típicas como resposta ao estresse, o que a classifica como uma boa indicadora dos efeitos biológicos do O₃. Como foi mencionado na introdução desta dissertação, *N. tabacum* ‘Bel-W3’ mostrou-se adequada para discriminar locais e épocas mais e menos afetados por ozônio na cidade de São Paulo, mas a intensidade de injúrias foliares foi pouco explicada pela concentração do poluente (Sant’Anna 2007). Portanto, a procura de plantas bioindicadoras mais adequadas para indicar, se possível quantitativamente, a presença de ozônio em São Paulo, ainda se faz necessária, fato que motivou a realização do presente estudo. Como informado antes também, *Ipomoea nil* cv. Scarlet O’Hara está sendo testada como uma possível bioindicadora para ozônio com base nos estudos realizados por Nouchi & Aoki (1979), sob condições de laboratório e por Domingos *et al.* (1998, 2002), sob condições de campo no estado São Paulo.

Há de se considerar o conceito geral, conforme colocado nos capítulos anteriores, de que o sistema de defesas antioxidativo da planta, cuja expressividade pode depender de fatores de estresse presentes no ambiente onde está crescendo, pode retardar o surgimento ou modificar a intensidade de injúrias visíveis em plantas expostas em locais poluídos. Assim, o estudo das relações entre variações em fatores ambientais e respostas biológicas, entre elas antioxidativas e entre estas e a intensidade de injúrias foliares nessas plantas pode contribuir para caracterizar a espécie vegetal em estudo como uma boa indicadora de ozônio ou não.

Portanto, neste capítulo final, objetivou-se avaliar o potencial bioindicador de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara, por meio do estabelecimento das mencionadas relações, utilizando os resultados obtidos para plantas mantidas por 28 dias, nas quatro estações do ano, em um local da cidade de São Paulo contaminado predominantemente por ozônio - parque do Ibirapuera, apresentados no capítulo anterior. Sob ponto de vista prático, procurou-se verificar se essa *Ipomoea* poderá ser utilizada em programas de biomonitoramento de ozônio na cidade de São Paulo, ou ainda estender para outras regiões de clima tropical.

Material e métodos

As relações entre variações em fatores ambientais e respostas antioxidativas de plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara', mantidas por 28 dias no parque do Ibirapuera, nas quatro estações do ano (métodos analíticos empregados e resultados obtidos apresentados no capítulo III), e entre estas e a intensidade de injúrias foliares, foram testadas por meio de análises estatísticas.

Inicialmente, realizaram-se análises de correlação de Pearson com o objetivo de fazer uma seleção de quais fatores, entre os meteorológicos (radiação, umidade relativa do ar, temperatura e velocidade de vento) ou os de poluição (MP, NO₂ e O₃) no parque do Ibirapuera provavelmente influenciaram as respostas antioxidativas ou a porcentagem de danos foliares. Essa ferramenta estatística foi utilizada em cada campanha separadamente. Para todas as campanhas experimentais, aplicaram-se as análises de correlação de Pearson (Sigma Stat for windows version 1.0) entre valores médios de antioxidantes por planta amostrada em cada dia de análise e os dados do ambiente referentes ao quinto ou sexto dia anterior à análise dos antioxidantes em laboratório. Esta decisão foi baseada na obtenção de coeficientes de correlação mais altos e significativos entre os propostos em matrizes de correlação entre os níveis dos antioxidantes em cada dia de análise e os valores médios para os fatores abióticos no próprio dia de análise e nos 10 dias que antecederam a amostragem (dados não mostrados).

A seguir, realizou-se uma análise de correspondência canônica (ACC) a fim de resumir a variabilidade total dos dados e avaliar qualitativamente a relação entre os fatores bióticos e abióticos. Tal análise foi realizada com os valores médios dos antioxidantes obtidos para as plantas retiradas do campo em cada dia de análise por estação do ano e médias diárias dos fatores abióticos cinco a seis dias antes do dia da amostragem das plantas. Essa análise foi realizada com quatro variáveis biológicas (antioxidantes e intensidade de injúrias foliares) e quatro variáveis ambientais (temperatura, radiação global, material particulado e ozônio).

Por fim, para cada campanha experimental e também para todo o conjunto de dados agrupados numa única matriz, foram realizadas análises de regressão multivariada para determinar o quanto da variação nos níveis dos antioxidantes (variáveis dependentes) pode ser explicada por fatores abióticos (variáveis independentes: temperatura, umidade relativa,

radiação global, velocidade do vento, ozônio e material particulado), e quais deles contribuem significativamente para explicar tais respostas antioxidativas. Essas análises foram feitas com os valores médios dos antioxidantes obtidos para cada planta retirada do campo em cada dia de análise e médias diárias dos fatores abióticos cinco a seis dias antes da amostragem das plantas, tomando por base, também, os resultados das análises de correlação nas matrizes de dados referidas no parágrafo anterior. Essas análises multivariadas foram realizadas pelo método *stepwise* (passo a passo). O procedimento de ajuste de cada regressão iniciou com um modelo saturado, com todas as variáveis presentes, removendo aquelas de menor participação para explicar as variações nos antioxidantes e novos ajustes foram feitos. Ao final, permaneceram somente as variáveis que contribuíram significativamente para explicar as variações nas variáveis biológicas.

Finalmente, o mesmo método de análise de regressão multivariada foi utilizado para avaliar o quanto da variabilidade na porcentagem de área foliar afetada por danos visíveis pôde ser explicada pelas defesas antioxidativas e pelos fatores abióticos.

Resultados e Discussão

As análises de correlação de Pearson indicaram algumas relações significativas entre os níveis dos antioxidantes e a condição ambiental cinco a seis dias antes (Tabela 4.1). A temperatura se relacionou positivamente com POD no outono e com SOD na campanha da primavera. A umidade relativa teve forte influência positiva nos antioxidantes na campanha de outono, porém, na primavera essa relação foi inversa com AA. Enquanto as relações entre radiação global e AA ou POD no outono e AA na primavera foram positivas a obtida entre tal fator abiótico e AA no inverno foi negativa. Foi observada relação positiva entre ozônio e AA apenas nas campanhas de verão e de inverno. Essa relação foi inversa na

campanha de outono. A AOT40 teve uma relação positiva com SOD no outono e primavera, com AA na campanha de inverno e uma relação negativa com POD no outono. Na campanha de primavera, o ozônio se relacionou somente com POD e essa relação foi positiva. Esse método estatístico não identificou relações significativas entre os antioxidantes foliares e os níveis de material particulado em todas as campanhas. Pôde-se observar, assim, que houve uma influência importante das condições ambientais na flutuação dos níveis de antioxidantes em plantas de *I. nil* quando expostas no local poluído, assim como ocorreu nas plantas mantidas em casa de vegetação com ar filtrado (ver Tabela 3.4 – capítulo III). Considerando a diversidade de relações significativas encontradas, pode-se esperar que as mencionadas flutuações nos antioxidantes tenham sido conseqüências, na verdade, da ação combinada de fatores climáticos e de poluentes atmosféricos, de caráter oxidativo. As análises multivariadas descritas a seguir identificaram quais fatores, dentre os testados, podem explicar mais fortemente as respostas antioxidativas das plantas de *I. nil* mantidas no ambiente poluído.

Tabela 4.1. Coeficientes de correlação de Pearson ® entre antioxidantes em plantas de *Ipomoea nil* ‘Scarlat O’Hara expostas no parque do Ibirapuera, nas diferentes estações do ano, e as condições ambientais cinco a seis dias antes da análise das plantas. T-temperatura (°C), U-umidade relativa do ar (%), RAD-radiação global (W/m²), VV-velocidade do vento (m/s), O₃-ozônio (ppb), AOT40 (valor acumulado de ozônio acima do limite horário de 40 ppb – ppb.h), MP- material particulado (µg/m³), NO₂-dióxido de nitrogênio (µg/m³).

Campanha	Antioxidante	T	UR	RAD	VV	O ₃	AOT40	MP ₁₀	NO ₂
Verão	AA	0,08	0,13	0,03	0,02	0,45*	-0,24	0,17	0,24
	SOD	0,28	-0,28	0,29	-0,33	0,15	0,05	0,23	0,60*
	POD	#	#	#	#	#	#	#	#
Outono	AA	-0,05	0,65*	0,56*	0,34	-0,56*	0,33	0,10	#
	SOD	-0,17	0,74*	-0,39	-0,21	0,07	0,51*	0,56	#
	POD	0,53*	0,51*	0,65*	-0,09	0,25	-0,59*	-0,51	#
Inverno	AA	0,31	0,61*	-0,72*	-0,35	0,46*	0,58*	-0,37	0,25
	SOD	-0,01	0,33	-0,20	-0,04	-0,002	0,26	-0,27	0,12
	POD	-0,09	0,19	0,03	0,10	-0,16	-0,08	0,23	0,30
Primavera	AA	-0,29	-0,46*	0,37*	-0,02	0,27	-0,29	0,12	0,45
	SOD	0,49*	0,10	-0,18	0,37*	-0,29	0,64*	-0,26	-0,41
	POD	-0,17	0,03	-0,06	-0,08	0,63*	-0,16	0,30	0,24

Análise não realizada por falta de dados.

Os resultados da análise de correspondência canônica (ACC) encontram-se sintetizados nas Tabelas 4.2 e 4.3 e na Figura 4.1. Os autovalores para o eixo 1 ($\lambda = 0,092$) e 2 ($\lambda = 0,023$) explicaram 18,3% da variabilidade dos dados. A elevada correlação espécies antioxidativas-ambiente de Pearson para o eixo 1 ($r = 0,566$) e 2 ($r = 0,496$) indicou uma relação entre a distribuição das espécies antioxidativas e as variáveis ambientais. O teste Monte Carlo de permutação demonstrou que a correlação entre as espécies antioxidativas e as condições ambientais foram estatisticamente significativas nos eixos 1 e 2 (respectivamente $p = 0,3$; $p = 0,02$).

O coeficiente canônico indicou que a radiação solar foi a variável de maior peso na ordenação do eixo 1 e no eixo 2 foi a concentração de ozônio.

No lado positivo do eixo 1, foram alocadas todas as unidades amostrais referentes às campanhas de verão e inverno, associadas aos maiores valores de radiação solar, tendo a maior atividade de SOD e maior formação de danos relacionados com estas unidades amostrais. No lado negativo do eixo 1, encontram-se as unidades amostrais referentes às campanhas de outono e primavera, as quais foram mais associadas aos altos valores de MP, sendo associadas a maior produção e atividade de AA e POD. Desta forma, o eixo 1 representou a sazonalidade, onde a radiação solar apresentou peso maior na ordenação.

Considerando o eixo 2, verificou-se que, em seu lado positivo, as campanhas de verão e primavera foram associadas aos altos valores de temperatura e de ozônio, contrapondo seu lado negativo, cujas unidades foram associadas aos baixos valores destas variáveis. As unidades amostrais da primavera apresentaram associação a uma maior produção de POD e AA e estiveram relacionadas aos menores atividade de SOD e intensidade de danos. Desta forma, o eixo 2 representou principalmente a poluição.

Tabela 4.2. Correlações das variáveis abióticas (n = 36) com os componentes principais 1 e 2.

Variáveis	Componentes principais	
	Eixo 1	Eixo 2
Temperatura	0,21	0,83
Radiação	0,81	0,12
Material Particulado	-0,48	-0,43
Ozônio	-0,36	0,76
Variação explicada	14,6%	3,7%

Tabela 4.3. Correlações de Pearson, coeficientes canônicos e correlações “intra-set” das variáveis ambientais com os dois primeiros eixos da ACC.

Variável ambiental	Correlação com os eixos		Coeficiente Canônico	
	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2
Temperatura	0,11	0,41	-0,06	0,39
Radiação	0,47	0,34	-0,31	0,63
Ozônio	-0,21	-0,25	-0,42	-0,04
MP	-0,28	0,03	0,87	-0,08

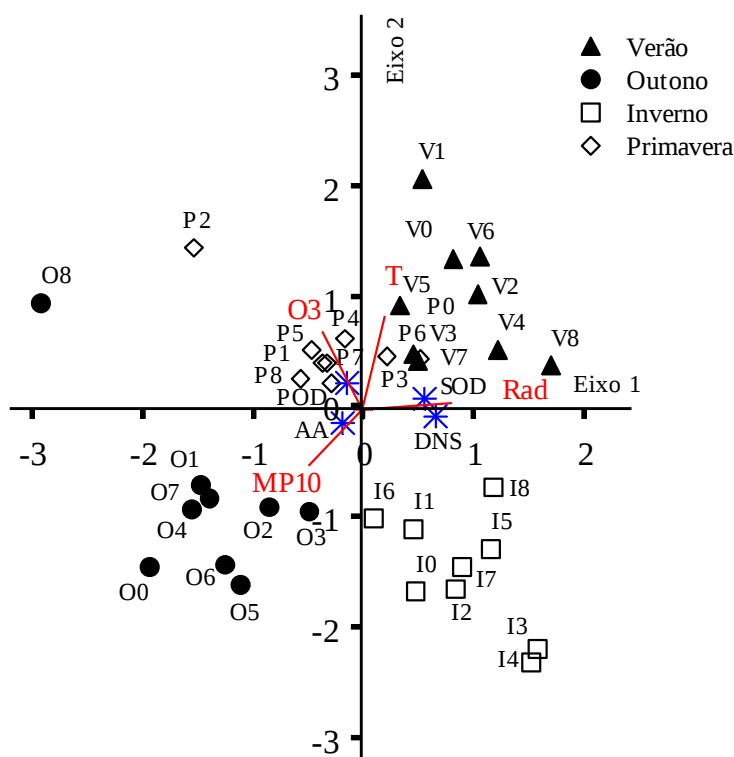


Figura 4.1. Gráfico da análise de correspondência canônica para os dados referentes ao parque do Ibirapuera e às plantas lá expostas..T-temperatura em °C, Rad- Radiação global em W/m², MP-material particulado em (µg/m³), O₃-ozônio (ppb), AA- ácido ascórbico, SOD- superóxido dismutase, POD- peroxidase, DNS- porcentagem de danos. As letras ao lado dos símbolos representam a estação do ano (V-verão; O-outono; I-inverno e P-primavera) e os números indicam o dia em que foi realizada a análise durante cada campanha (1 a 9 dias de análise).

O ano de 2006 foi um pouco atípico para algumas características climáticas. Observaram-se, por exemplo, altos valores de radiação durante a campanha de inverno. Esse fato pode ter uma influência indireta na porcentagem de danos encontrada nas folhas de *I. nil*, uma vez que esse é um fator determinante para a formação do ozônio, e também um possível promotor de estresse oxidativo (Bray *et al.* 2000). A alta porcentagem de danos na campanha de verão está diretamente relacionada à baixa eficiência do sistema de defesa antioxidativo durante a campanha e, como mostra a análise, uma associação das unidades amostrais referentes a essa campanha com altos valores de ozônio.

Mesmo a análise mostrando uma relativa associação entre valores da campanha de verão com uma maior produção de SOD, a ação dessa enzima pareceu não ter sido suficientemente capaz de desintoxicar as plantas das EAO que foram formadas em época em que o estresse oxidativo era mais pronunciado. Segundo Chernikova *et al.* (2000), uma alta atividade de glutathione redutase ou superóxido dismutase individualmente não foi suficiente para reduzir os efeitos do estresse causado por ozônio em *Glycine max*. É de se esperar uma maior atividade da enzima em épocas mais quentes. Segundo Scandalios (1993), tanto a temperatura quanto a luminosidade conduzem a planta a uma maior atividade da enzima. A ACC evidencia a associação dos altos valores de AA e POD às campanhas de outono e primavera. Isto justifica, em parte, a baixa porcentagem de danos foliares nas plantas expostas ao ambiente poluído durante a campanha de outono e a menor intensidade de injúrias do que seria esperado nas plantas usadas na campanha da primavera. Assim, a análise indica, em seu conjunto, que a intensidade de injúrias foliares pode ser em partes associada às concentrações atmosféricas de ozônio no período de realização do estudo e que a relação entre essas variáveis foram mediadas pelas respostas antioxidativas das plantas. As análises de regressão multivariada, descritas a seguir, demonstraram

quantitativamente algumas das tendências evidenciadas pela ACC para cada campanha experimental.

Em geral, verificou-se que as variações nos três antioxidantes em plantas expostas ao longo do ano foram explicadas por uma combinação linear de variáveis meteorológicas e de poluentes (Tabelas 4.4 e 4.5).

A análise realizada para os dados obtidos na campanha de verão mostrou, quando o ácido ascórbico foi a variável dependente, uma relação inversa com a temperatura e positiva com ozônio e radiação global. Para a análise de SOD, observou-se uma relação negativa com a temperatura, umidade e velocidade de vento, porém apresentou uma relação positiva com os dados de poluição ozônio e material particulado. O ácido ascórbico, na campanha de outono, foi influenciado negativamente pelo ozônio. Já a enzima superóxido dismutase mostrou ser influenciado negativamente pela umidade, radiação global e positivamente pela temperatura, material particulado e velocidade de vento. POD, nessa mesma campanha, foi influenciada negativamente pelos poluentes ozônio e material particulado e também pela velocidade de vento. O ácido ascórbico na campanha de inverno mostrou uma relação inversa com radiação, vento e material particulado. SOD foi influenciada negativamente, nesta campanha, apenas pelo material particulado. Os dados de POD obtidos no inverno mostraram uma relação positiva com velocidade de vento e material particulado e negativa com radiação. Durante a campanha de primavera, AA mostrou ser influenciado negativamente pela temperatura umidade relativa e material particulado e positivamente pelo ozônio. Já a enzima superóxido dismutase mostrou uma relação positiva com temperatura e velocidade de vento e POD uma relação positiva com umidade relativa e ozônio (Tabela 4.4).

Além de apontar quais variáveis contribuíram significativamente para explicar as respostas antioxidativas, as análises multivariadas indicaram que entre 12% (outono) e 88% (inverno) das variações nos teores de AA, entre 5% (inverno) e 88% (verão) das variações na atividade da SOD e entre 35% (inverno) e 57% (primavera) das variações na POD foram explicadas por oscilações nesses fatores (Tabela 4.5).

Quando todos os resultados são agrupados em uma única matriz (V+O+I+P nas Tabelas 4.4 e 4.5), reforçou-se que as respostas antioxidativas de plantas de *I. nil* no ambiente do parque do Ibirapuera foram influenciadas por um conjunto de condições meteorológicas e de contaminação atmosférica cinco a seis dias antes da data de análise. Concentrações mais altas de ácido ascórbico foram explicadas por umidade relativa, radiação e concentrações de material particulado mais baixas e maior contaminação atmosférica por ozônio. A atividade da SOD foi maior na medida em que a radiação foi mais baixa e a velocidade do vento e níveis de ozônio foram mais altos. A atividade da POD aumentou quando temperatura, umidade relativa, vento e ozônio também aumentaram.

Tabela 4.4. Variáveis ambientais identificadas pela análise de regressão multivariada *stepwise* como determinantes ($p < 0,05$) das oscilações nas concentrações foliares de ácido ascórbico (AA) e na atividade de superóxido dismutase (SOD) e das peroxidases (POD) em plantas expostas no parque do Ibirapuera nas diferentes estações do ano. T- temperatura ($^{\circ}\text{C}$), UR-umidade relativa do ar (%), RAD- radiação global (W/m^2), VV- velocidade do vento (m/s), O_3 - ozônio (ppb), MP- material particulado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), NO_2 -dióxido de nitrogênio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Campanhas	Antioxidante	T	UR	RAD	VV	O_3	MP ₁₀
Verão	AA	-	ns	+	ns	+	ns
	Log ₁₀ SOD	-	-	ns	-	+	+
	POD	#	#	#	#	#	#
Outono	Raiz ² AA	ns	ns	ns	ns	-	ns
	Rank SOD	+	-	-	+	ns	+
	POD	ns	ns	ns	-	-	-
Inverno	Raiz ² AA	ns	ns	-	-	ns	-
	SOD	ns	ns	ns	ns	ns	-
	POD	ns	ns	-	+	ns	+
Primavera	AA	-	-	ns	ns	+	-
	SOD	+	ns	ns	+	ns	ns
	POD	ns	+	ns	ns	+	ns
V+O+I+P [@]	AA	ns	-	-	ns	+	-
	Log ₁₀ SOD	ns	ns	-	+	ns	+
	Raiz ² POD	+	+	ns	+	+	ns

#: Análise não realizada por falta de dados.

@: Dados do verão, outono, inverno e primavera agrupados.

(-): Influência negativa; (+) influência positiva; ns: variável removida do modelo.

Tabela 4.5. Coeficientes de determinação (R^2) e níveis de significância (p) para os modelos de regressão propostos na tabela 4.4.

Antioxidantes		Verão	Outono	Inverno	Primavera	V+O+I+P[@]
AA	R^2	0,45	0,12	0,88	0,58	0,33
	p	<0,05	0,08	<0,01	<0,01	<0,01
SOD	R^2	0,88	0,79	0,05	0,43	0,20
	p	<0,01	<0,01	0,29	<0,01	<0,01
POD	R^2	#	0,57	0,35	0,57	0,57
	p	#	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

#: Análise não realizada por falta de dados.

@: Dados do verão, outono, inverno e primavera agrupados.

Verificou-se, assim, que a influência de determinados fatores ambientais sobre o mesmo antioxidante ora foi positiva e ora negativa, dependendo da época do ano. Comparando esses dados com os dados obtidos no capítulo anterior, pode-se perceber que quando a planta está exposta ao ambiente poluído ela aumenta essa relação de comunicação entre os seus órgãos. Segundo Pastori *et al.* (2003), uma baixa concentração de ácido ascórbico, por exemplo, pode levar a ativação de um conjunto de genes capazes de enviar uma mensagem de deficiência de AA em plantas, ao passo que altas concentrações deste antioxidante podem não somente levar a uma repressão dessas transcrições, mas também resultar em mudanças de outras transcrições no metabolismo celular.

É de se esperar que, em plantas expostas ao ambiente poluído por ozônio, os níveis de antioxidantes ou atividades enzimáticas do ciclo ascorbato-glutationa aumentem (Castillo & Grappin 1988, Ranieri *et al.* 1996; Luwe 1996, Bray *et al.* 2000). Este foi um fato marcante no presente estudo também. O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C é um potente defensor da planta contra algumas EAO (Castillo & Greppin 1988; Muggli 1993; Polle *et al.* 1995). Essa defesa pode se dar através do aumento de sua

concentração, frente a uma situação de estresse oxidativo, conforme observado neste estudo, nas campanhas de verão e primavera, assim como foi mostrado para todo conjunto de dados. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Bulbovas (2005), que apontou uma relação positiva entre o ozônio e AA analisados em plantas de *Caesalpinia echinata* também expostas na região do parque do Ibirapuera. Porém, alguns estudos já mostraram uma relação negativa do poluente com o ácido ascórbico (Hausladen *et al.* 1990; Madamanchi *et al.* 1991), como aconteceu no presente estudo, na campanha de outono.

Alguns autores têm reportado a importância de SOD na prevenção dos efeitos oxidativos desencadeados pelo ozônio (Pitcher & Zilinskas 1996). Por outro lado, Van-Camp *et al.* (1994) mostraram que uma superprodução de Mn-SOD em mitocôndria de *Nicotiana tabacum* transgênica somente forneceu uma baixa proteção na tolerância contra o ozônio, o que indica que não basta apenas a planta ter uma alta atividade de SOD para garantir a proteção contra os efeitos do poluente, mas o local de ação da isoenzima. De qualquer modo, no presente estudo, o aumento da atividade da SOD somente foi associado significativamente no verão, e também foi apontado pela análise de correspondência canônica. Possivelmente, essa enzima é menos funcional do que ácido ascórbico para desintoxicação foliar em plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara expostas ao ozônio, hipótese que precisa ser testada experimentalmente.

A atividade da POD comprovadamente aumentou nas folhas dessa cultivar quando as concentrações de ozônio no ambiente aumentaram, o que indica que, entre as isoformas, a ascorbato peroxidase deve ter aumentado e atuado na defesa da planta contra o poluente aéreo. Brender *et al.* (1994) encontraram um aumento na atividade de ascorbato-peroxidase em folhas de trigo expostas a um ambiente poluído por ozônio durante a estação de crescimento e atribuíram o fato a uma proteção da planta.

Scebba *et al.* (2003) encontraram uma maior atividade de POD em plantas de *Trifolium repens* quando comparadas a *Trifolium pratense* em sistema de fumigação e consideraram a atividade da enzima como um papel de proteção contra o ozônio.

Variáveis meteorológicas de fato mostraram-se associadas às respostas antioxidativas de plantas mantidas no ambiente poluído, tanto enzimáticas quanto não enzimáticas, como já havia sido observado nas plantas mantidas na casa de vegetação sob ar filtrado. Raychaudhuri & Deng (2000) reportaram que mudas de milho expostas a 4° C durante sete dias não sobreviveriam a menos que elas fossem previamente expostas a 14° C por três dias. Um aumento na atividade de SOD pôde aumentar a capacidade da planta em se defender, pelo fato de neutralizar o radical superóxido.

Neste estudo, observa-se que tanto AA quanto POD foram influenciadas pela umidade relativa. Esse fator ambiental interfere na movimentação estomática e, conseqüentemente, na fotossíntese e na maior ou menor produção de espécies tóxicas de oxigênio, acabando por afetar o sistema de defesas. Indiretamente, o fluxo de poluentes gasosos para o interior da folha, assim como a intensidade de injúrias foliares, também são alterados. Por isso, Keitel & Erhardt (1987) mostraram que a proporção de injúria foliar em tabaco Bel W3, em resposta a uma concentração constante de ozônio, variava dependendo da umidade relativa. Os poluentes, assim, pareceram não interferir nas respostas metabólicas naturais das plantas da cultivar Scarlet O'Hara de *I. nil*. Por outro lado, é possível esperar que a intensidade das respostas antioxidativas às variações climáticas possa interferir nas relações entre distúrbios celulares ou morte celular e concentrações de ozônio na atmosfera. Somam-se a isso as respostas de defesa estimuladas pelo próprio poluente. Isto pode comprometer, inclusive, a eficiência da planta como bioindicadora da presença de ozônio na atmosfera, no caso desses distúrbios serem as reações indicadoras utilizadas no biomonitoramento, como as necroses

foliares. Em última análise, a severidade das respostas de defesa contra o estresse oxidativo pode atrasar a manifestação de injúrias foliares ou restringir sua progressão.

Portanto, no presente estudo, realizou-se, finalmente, uma análise multivariada na qual a porcentagem de danos foliares foi considerada a variável dependente. Nesta análise, procurou-se relacionar a porcentagem média de injúrias foliares para todas as plantas amostradas em cada dia de amostragem (dados de todas as campanhas tratados conjuntamente) com valores médios para os antioxidantes foliares determinados em plantas amostradas cinco a seis dias antes do dia de estimativa das injúrias foliares e com valores médios para os fatores abióticos 11 a 12 dias antes desse mesmo dia de estimativa de danos. Para tanto, partiu-se do princípio de que houve uma defasagem de tempo entre mudanças ambientais e reações de defesa contra o estresse oxidativo (cinco a seis dias, conforme demonstrado anteriormente). Assim, considerou-se a necessidade somar a esta mais um intervalo de tempo delimitado entre a perda de eficiência do sistema de defesas, ou seja, entre o rompimento do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante, e a ocorrência de morte celular extensiva e visualização de injúrias foliares. No presente estudo, assumiu-se que esse segundo intervalo de tempo seria também de cinco a seis dias.

O resultado desse teste foi altamente significativo ($p < 0,001$) e indicou que a intensidade de danos foliares foi fortemente explicada pelas variáveis inseridas no modelo ($R^2 = 0,97$), conforme a equação abaixo.

$$\text{Danos} = \text{Constante} - \underbrace{\text{AA} - \text{POD}}_{(5 \text{ dias antes})} - \underbrace{\text{MP}_{10} + \text{Temperatura} + \text{Radiação}}_{(10 \text{ dias antes})}$$

A porcentagem de injúrias visíveis aumentou na medida em que a atividade da SOD, a temperatura do ar e a radiação global aumentaram. Por tais fatores meteorológicos estarem estreitamente associadas à formação de ozônio na troposfera, não se pode descartar uma

possível interferência positiva desse poluente, apesar de não ter sido identificado como um fator determinante na análise multivariada. Esse teste ainda mostrou que a ocorrência de danos foliares é restringida (relação negativa), pelo aumento da concentração de ácido ascórbico e da atividade da peroxidase, assim como da concentração de material particulado. Contudo, o n amostral para realização desta análise foi pequeno, de modo que o modelo proposto pode ainda não representar de forma reprodutível as relações entre as variáveis.

Em síntese, os resultados mostrados neste capítulo indicaram que os antioxidantes analisados realmente estão atuando de forma significativa na defesa das plantas que cresceram no ambiente poluído de São Paulo, não somente retardando o início da visualização das injúrias visíveis como também restringindo a ampliação da área foliar afetada pelas mesmas. Esse efeito foi evidente, em especial, na campanha da primavera. Desse modo, o uso de *Ipomoea nil* ‘Scarlat O’Hara’ como planta bioindicadora de ozônio troposférico para a cidade de São Paulo, dependendo das condições ambientais durante o biomonitoramento, pode vir a ser inviável. No entanto, estudos recém iniciados deverão testar o modelo proposto na presente dissertação e, conseqüentemente, a veracidade dessa suposição.

Referências bibliográficas

Bray EA, Bailey-Serres J & Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants (Buchanan BB, Gruissen W & Jones RL, eds.). American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158-1203.

- Brender J, Weijel H J, Wegner U, Jäger H J. 1994. Response of cellular antioxidants to ozone in wheat flag leaves at different stages of plant development. *Environmental pollution* 84: 15-21.
- Bulbovas P. 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras de resistência à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP. 102p.
- Catsillo F J, Greppin H. 1988. Extracelular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and experimental botany* 28: 231-238.
- CETESB. 2004. Caracterização das Estações da Rede Automática de monitoramento da Qualidade do Ar na RMSP. Estação Ibirapuera. Julho 2004.
- CETESB. 2005. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo – 2004. Série Relatórios.
- Chernicova T, Robinson J. M., Lee E. H. & Mulchi C. L. 2000. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynthesis research*. 64: 15-26
- De temerman L., Bell J. N. B., Gareec J. P., Klumpp A., Krause G. H. M., Tonneijck A. E. G. 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: *Urban air pollution, Bioindication and Environmental Awareness* (Klumpp A, Ansel W, Klumpp G) Cuvillier Verlag, Göttingen, pp 337 – 374.

- Domingos M, Bourotte C, Klumpp A, Klumpp G. & Forti MC. 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In *Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo* (Bicudo DC, Forti MC & Bicudo CEM, orgs.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 221-249.
- Domingos M, Klumpp A, Klumpp G. 1998. Air pollution on the atlantic forest in the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230-236.
- Ferreira M I, Domingos M, Gomes H A, Saldiva P H N, Assunção J V. 2007. Evaluation of mutagenic potencial of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, São Paulo – SP, Brazil, using the *Tradescantia* Stamen-hair assay.
- Figueiredo A M G, Nogueira C A, Saiki M, Milian F M, Domingos M. 2007. Assessment of atmospheric metallic pollution in the metropolitan region of São Paulo, Brazil, employing *Tillandsia usneoides* L. as bioindicator. 145: 279-292
- Furlan C M, Salatino A, Domingos. 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.
- Hausladen A, Madamanchi N R, Fellows S, Alscher R G, Amundson R G. 1990. Seasonal changes in antioxidants in red spruce as affected by ozone. *New phytologist* 115: 447-458.

- Klumpp A, Ansel W, Klumpp G, Vergne P, Sifakis N, Sanz M J, Rasmussen S, Ro-Poulsen H, Ribas A, Peñuelas J, Kambezidis H, He S, Garrec J P, Calatayud V. 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in european cities part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric environment* 40: 7437-7448.
- Klumpp A, Domingos M, Moraes R M and Klumpp G. 1997. 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 complex of Cubatão, Brazil. *The science of the total environment* 246: 19-91
- Krupa S V, Manning W J. 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental pollution* 50: 101-137
- Luwe W F M. 1996. Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus silvatica* L.) leaves: seasonal variation and response to changing ozone concentrations in air. *Plant, cell and environment* 19: 321-328.
- Madamanchi N R, Hausladen A, Alscher R G, Amundson R G, Fellows S. 1991. Seasonal changes in antioxidants in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) from three field sites in the northeastern United States. *New Phytologist*. 118: 331-338.
- Mayer H. 1999. Air pollution in cities. *Atmospheric environment*. 33: 4029-4037.
- Moraes R M, Klumpp A, Furlan C M, Klumpp G, Domingos M, Rinaldi M C S & Modesto I F. 2002. Tropical fruit trees as bioindicators of industrial air pollution in southeast Brazil. *Environmental international* 28: 367-374.

- Nouchi I & Aoki K. 1979. Morning glory as a photochemical oxidant indicator. *Environmental Pollution* 18: 289-303.
- Pitcher L H, Zilinskas B A. 1996. Overexpression of CuZn superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiology* 110: 583-588.
- Polle A, Wieser G., Havranek W M. 1995. Quantification of ozone influx and apoplastic ascorbate content in needles of Noeway spruce trees (*Picea abies* L. Karst) at high altitudes. *Plant, cell and environment* 18: 681-688.
- Ranieri A, D'Urso G, Nali C, Lorenzini G, Soldatini G F. 1996. Ozone stimulates apoplastic system in pumpkin leaves. *Physiologia Plantarum* 97: 381-387.
- Raychaudhuri S. S., Deng X. W. 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The botanical review* 66(1): 89-98.
- Sant'ana, S R M, Sposito M, Domingos M, Souza S R. 2007. Suitability of *Nicotiana tabacum* Bel W3 for biomonitoring ozone in São Paulo, Southeast Brazil. *Environmental Pollution* (London) – No Prelo.
- Scandalios J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*. 101: 7-12.
- Scebba F, Pucciarelli I, Soldatini G F, Ranieri A. 2003. O₃-induced changes in the antioxidant systems and their relationship to different degrees of susceptibility of two clover species. *Plant science*. 165: 583-593.
- Van-Camp W, Willekens H, Bowler C, Van Montagu M, Inzé D, Reupold-Popp P, Sandermann H J, Langebartels C. 1994. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Biotechnology* 12: 165-168.

Vergé X, Chapuis A, Delpoux M. 2002. Bioindicator reliability: the exemplo of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Environmental pollution 118: 337-349.

Capítulo V

Conclusões Finais

Pode-se concluir a partir deste estudo que:

- Há uma sazonalidade no perfil dos antioxidantes de *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ ao longo das quatro estações do ano decorrente de alguns estímulos ambientais.
- *Ipomoea nil* cv. Scarlet O’Hara parece ser sensível ao ozônio. Porém, a eficiência do sistema de defesa antioxidativo parece retardar o surgimento e a ampliação dos sintomas visíveis.
- O uso de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O’Hara como planta bioindicadora de ozônio troposférico para a cidade de São Paulo pode vir a ser inviável dependendo das condições ambientais durante o biomonitoramento.