

SILVIA MARIA ROMANO SANT'ANNA

**POTENCIAL DE USO DE *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' PARA
BIOMONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO
ATMOSFÉRICA POR OZÔNIO, NA CIDADE DE SÃO PAULO**

SÃO PAULO

2007

SILVIA MARIA ROMANO SANT'ANNA

**POTENCIAL DE USO DE *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ PARA
BIOMONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO
ATMOSFÉRICA POR OZÔNIO, NA CIDADE DE SÃO PAULO**

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

ORIENTADORA: Dra. MARISA DOMINGOS

CO-ORIENTADORA: Dra. SILVIA RIBEIRO DE SOUZA

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Sant'Anna, Silvia Maria Romano

S231p Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo / Silvia Maria Romano Sant'Anna -- São Paulo, 2007.
116 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2007

Bibliografia.

1. Solanaceae. 2. Biomonitoramento. 3. Oxidante fotoquímico. I. Título

CDU 582.951.4

Dedico esse trabalho à Célia, Osvaldo, Tia
Maria, Tia Cora, Ricardo e Henrique.

“Nós, tendo nascido no mundo natural e aí evoluído passo a passo através de milhões de anos, estamos presos pelo resto da vida em nossa ecologia, nossa fisiologia e até nosso espírito”

(Edward O. Wilson)

Agradecimentos

Agradeço a FAPESP por apoiar meu trabalho, ao Instituto de Botânica por me dar condições para desenvolvê-lo e a CETESB pelo espaço e dados cedidos.

Agradeço à Marli, Valdenice, Amariles e Dorinha, que sempre me ajudaram com muita dedicação e bom humor. Agradeço aos amigos e colegas que ajudaram diretamente, ensinando, emprestando material, apoiando, criticando, discutindo, tirando dúvidas, trazendo mais dúvidas, questionando, escutando, compartilhando e participando. Agradeço às minhas orientadoras, Marisa Domingos e Silvia Ribeiro, que fizeram tudo isso e ainda acreditaram em mim, assumiram esse compromisso comigo e me forneceram excelentes modelos profissionais.

Agradeço ao Andreas Klumpp por ter fornecido as sementes e por sempre me auxiliar, fornecendo separatas e tirando dúvidas. Agradeço ao Marcos Aidar, João Godoy e Sabrina Ribeiro pelo ensinamento e empréstimo de equipamento para as medições de fluorescência. Agradeço à Andreza Portella por me ensinar a utilizar o programa para elaboração de mapas.

Agradeço todos que já passaram ou estão na minha vida. Aos meus professores que dedicaram seus tempos ensinando e assim pude aproveitar seus conhecimentos. Agradeço aos amigos que não vejo mais, do colégio, da rua, do prédio, da faculdade, do trabalho e de outras cidades.

Agradeço os amigos que são meus amigos até hoje, que mesmo sem querer, fizeram parte, alguns até sem nem saberem com o que trabalho. Agradeço aos amigos e familiares que se interessaram, acompanharam e até visitaram meu local de trabalho. Os agradeço também por me possibilitarem incríveis gargalhadas e papos furados e pelos momentos de total esquecimento do trabalho.

Agradeço aos meus pais por serem os pilares da minha vida, pois nunca desistiram de me mostrar o valor da vida, de me ensinarem que sempre tenho escolhas e que as consequências vêm junto e, por me incentivarem a sempre querer crescer e aprender. Agradeço meu irmão por ser meu amigo, conselheiro e parceiro, e ainda me desafiar a enfrentar meus limites. Agradeço ao amor da minha vida pelo apoio, incentivo, me fazer lutar para realizar meus sonhos e por permitir compartilhar as nossas vidas.

Agradeço de todo coração todas essas pessoas por fazerem de mim o que sou agora.

Índice

Resumo	01
Abstract	03
Capítulo 1	Introdução, justificativa e objetivos
Introdução geral	05
Justificativa e objetivos	16
Referências bibliográficas	19
Capítulo 2	Potencial de <i>Nicotiana tabacum</i> ‘Bel W3’ para biomonitoramento do ozônio troposférico na cidade de São Paulo
Resumo	32
Introdução	33
Material e métodos	36
Resultados	42
Discussão	49
Referências bibliográficas	54
Capítulo 3	Exposição de <i>Nicotiana tabacum</i> ‘Bel W3’ a doses controladas de O₃ e H₂O₂ em câmaras de fumigação: avaliação de danos foliares e fluorescência da clorofila <i>a</i>
Resumo	61
Introdução	62
Material e métodos	65
Resultados	68
Discussão	74
Referências bibliográficas	79

Capítulo 4	Potencial de uso de <i>Nicotiana tabacum</i> ‘Bel W3’ como bioindicadora de ozônio na cidade de São Paulo, SP: uma avaliação crítica	
	Avaliação crítica	87
	Referências bibliográficas	93
Conclusão geral		95
Anexo		96

Resumo

Um dos principais poluentes aéreos é o ozônio (O_3), por se encontrar em altos níveis, por participar ativamente da química atmosférica e por ser considerado um dos mais fitotóxicos. Entretanto, durante o processo de sua formação (*smog* fotoquímico) são formados diversos outros oxidantes, entre os quais o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Assim, objetivou-se avaliar o potencial de *N. tabacum* 'Bel W3', cultivar já padronizada como bioindicadora de O_3 nas regiões de clima temperado, para o biomonitoramento na cidade de São Paulo; analisar experimentalmente se O_3 e H_2O_2 , em diferentes níveis, podem promover alterações fisiológicas e necroses foliares; e estabelecer o modelo que melhor ajusta a relação entre as respostas biológicas estudadas e a concentração desses poluentes. Inicialmente, foram realizadas exposições de *N. tabacum* em diferentes áreas da cidade e foi determinada a porcentagem de área foliar com necroses. *N. tabacum* mostrou-se adequada para biomonitoramento qualitativo da presença de O_3 na cidade, pois diferenciou as áreas e épocas do ano mais e menos contaminadas. Porém, análises de regressão mostraram que apenas uma pequena parte dos danos pode ser explicada pela concentração de O_3 e que a relação entre ambas não foi linear, sugerindo que outros fatores poderiam interferir no aparecimento de necroses. Posteriormente, foram realizados experimentos em câmaras de fumigação expondo plantas de *N. tabacum* ao O_3 e ao H_2O_2 , e foram analisadas a porcentagem de necroses foliares e a razão $F_v:F_m$. As necroses foliares observadas foram similares, porém, na presença de H_2O_2 , *N. tabacum* também apresentou coloração prata na superfície abaxial da folha. Os danos mais intensos ocorreram quando o O_3 foi aplicado individualmente, e a porcentagem máxima de dano foliar foi observada quando as plantas foram fumigadas com 40 ppb de O_3 . A razão $F_v:F_m$ foi significativamente reduzida, especialmente quando o O_3 esteve envolvido. Além disso, foi verificado que H_2O_2 , quando misturado ao O_3 , provoca efeito antagônico sobre a planta, diminuindo os efeitos maléficos deste. A partir dessas informações

experimentais, foi realizada nova análise de regressão entre intensidades de danos foliares e concentrações médias de O₃ até 40 ppb, utilizando dados provenientes do estudo de campo, tendo sido encontrada, então, relação linear significativa. Conclui-se, assim, que *N. tabacum* tem seu uso limitado para biomonitoramento quantitativo em ambiente contaminado por O₃, quando em concentrações médias acima de 40 ppb.

Palavras-chave: Solanaceae, biomonitoramento, oxidante fotoquímico

Abstract

Ozone (O_3) is one of the most important air pollutants because of its high atmospheric concentrations and chemical reactivity. In addition, it is one of the most phytotoxic substances due to its high oxidative power. Besides, in its build-up process (photochemical smog) other oxidants, among them the hydrogen peroxide (H_2O_2), are formed which are potentially phytotoxic as well. This study aimed to analyze the *N. tabacum* 'Bel W3' potential for biomonitoring the O_3 levels in the city of São Paulo; to determine experimentally whether O_3 and H_2O_2 , at different levels, can promote physiological changes and leaf necrosis and to establish a model that best describes the relationship between the studied biological answers and these pollutants contents. First, *N. tabacum* plants were exposed in different areas of the city, after this, which the percentage of leaf injury was determined. *N. tabacum* proved suitable to qualitatively biomonitor the O_3 presence in the city. However, regression analyses showed that only a small part of the damage could be attributed to O_3 , suggesting that other oxidants and/or weather conditions may promote leaf necrosis which limit the plant use for quantitative biomonitoring purposes. Second, *N. tabacum* plants were exposed in closed chambers to O_3 and to H_2O_2 and after which one the percentage of leaf injuries and the $F_v:F_m$ ratio were determined. Similar necrosis was observed in the experiments and when H_2O_2 was present, *N. tabacum* also presented silver colored spots on the entire abaxial surface of the leaves. The more intense necrosis happened when O_3 was applied alone and the maximum injury percentage was obtained when the plants were exposed to 40 ppb. $F_v:F_m$ was significantly reduced in the three experiments, especially when O_3 was present, revealing disturbances in the photosynthetic process. Furthermore, H_2O_2 , when mixed with, O_3 , promotes an antagonistic action on the plant, reducing the toxic effects of O_3 . Based on the experimental information a new regression analysis between

percentage injury and O₃ concentration was performed using the field results, when a significant linear relationship was found. We can conclude, therefore, that *N. tabacum* has a limited use for quantitative biomonitoring where O₃ is present in average levels higher than 40 ppb.

Key-words: Solanaceae, biomonitoring, photochemical oxidants

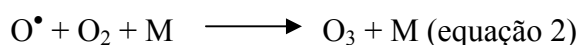
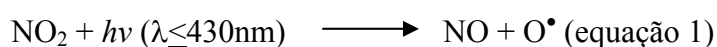
Capítulo 1

Introdução geral

A atmosfera é composta por cinco camadas caracterizadas por gradientes de temperatura vertical e denominadas, da mais externa para a mais interna, exosfera (camada em contato com o meio interplanetário), termosfera, mesosfera, estratosfera e troposfera (Brasseur & Schimel 1999, Krupa & Manning 1988). Segundo Krupa & Manning (1988), na estratosfera encontra-se a camada de ozônio (O_3), responsável por absorver a radiação solar nociva aos seres vivos, protegendo os sistemas biológicos e limitando a intensidade luminosa na troposfera. Além disso, a camada de ozônio promove o aumento da temperatura, provocando estratificação térmica, que impede que ocorra mistura vertical, confinando as moléculas de água na troposfera. Portanto, esta não é perdida para o meio interplanetário (Sánchez *et al.* 2001). A troposfera é a camada da atmosfera mais instável, possui em média 10 Km de extensão e é subdividida em troposfera livre (camada mais externa) e camada limite planetária. Essa última região da troposfera apresenta extensão aproximada de 1 Km, variável de acordo com a hora do dia e das condições meteorológicas. Ainda, nessa região os processos químicos atmosféricos são intensificados e é onde são lançados os poluentes e é formado o ozônio nocivo aos organismos vivos.

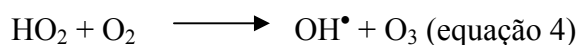
Os poluentes podem ser emitidos de fontes naturais, como os vulcões, vegetação e queimadas naturais, ou por fontes antrópicas, que são classificadas como móveis e estacionárias como, por exemplo, veículos e indústrias, respectivamente (Raven *et al.* 1993). Os poluentes emitidos diretamente da fonte são denominados primários, que, ao reagirem entre si ou com componentes existentes naturalmente na atmosfera, originam os poluentes denominados secundários (Raven *et al.* 1993).

Um dos poluentes secundários mais estudado é o ozônio devido a sua alta toxicidade e ampla distribuição horizontal, compreendendo áreas urbanas, suburbanas e florestais. Esse poluente atinge até as áreas mais remotas do planeta, pois mesmo em uma atmosfera distante de centros urbanos e com ausência de poluentes, haverá ozônio oriundo de processos naturais. Um deles é o transporte do ozônio estratosférico para troposfera. Esse processo é lento e, portanto, pouco responsável pela concentração de ozônio encontrado nessa camada (Krupa & Manning 1988). O outro é sua formação natural a partir da fotodissociação do dióxido de nitrogênio (NO_2). Nesse processo, o NO_2 é fotolizado em monóxido de nitrogênio (NO) e oxigênio atômico ($\text{O}^\bullet$) (equação 1), este último reage com o oxigênio molecular (O_2) através de um meio (M), como por exemplo o gás nitrogênio, originando o ozônio (O_3) (equação 2). Por sua vez, o O_3 reage com o NO , produzindo NO_2 e O_2 (equação 3) (Krupa & Manning 1988, Souza 1998):



Considerando somente os processos naturais, os níveis de ozônio na troposfera deveriam variar entre 20 e 80 ppb (Seinfeld 1986). Porém, em áreas onde o ar está poluído, esses níveis de ozônio são ultrapassados em várias ordens de magnitude (100-500 ppb) devido à ocorrência do processo denominado *smog* fotoquímico (Seinfeld 1986). Nesse processo extremamente complexo, o equilíbrio foto-estacionário (proporcionado pelas reações das equações de 1 a 3) é quebrado devido à presença de compostos orgânicos, como os hidrocarbonetos (R), que promovem uma cadeia complexa de reações capaz de produzir não apenas o ozônio (O_3) (equação 4), mas também outros oxidantes fotoquímicos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (equação 5), nitrato de peroxiacetila (PAN) (equação 6),

aldeídos e cetonas (Krupa & Manning 1988, Seinfeld 1989, Miguel 1992, Souza 1998, Sillman 1999, Sawyer *et al.* 2000, Manahan 1999).



A quebra desse equilíbrio foto-estacionário pode levar ao aumento ou diminuição da concentração de ozônio. Segundo Sillman (1999), a concentração de ozônio depende da razão entre emissão de óxidos de nitrogênio (NO_x) e de compostos orgânicos voláteis (COV), sendo que em áreas urbanas a formação do O_3 depende principalmente da concentração de COV e, em regiões rurais, da concentração de NO_x . A diminuição da concentração de O_3 ocorre quando há grande emissão de NO_x para a troposfera, especialmente de óxido de nitrogênio (NO) (Seinfeld 1989, Souza 1998, Sillman 1999).

A principal fonte de emissão de precursores (COV e NO_x) do processo do *smog* fotoquímico é a frota veicular (Seinfeld 1986, Krupa & Manning 1988, Seinfeld 1989, Miguel 1992, Souza 1998, Klumpp *et al.* 1999, Sawyer *et al.* 2000). Segundo Manahan (1999), a queima incompleta de combustíveis utilizados nos veículos produz NO_x e hidrocarbonetos altamente reativos fotoquimicamente. Além disso, a concentração dos oxidantes formados na troposfera depende de componentes espaciais e temporais, determinados respectivamente pela localização das fontes de emissão e pelas condições meteorológicas (Miguel 1992, Peñuelas *et al.* 1999, CETESB 2006). Locais mais próximos das fontes de emissão desses precursores geralmente são atingidos por concentrações mais baixas desse poluente e locais mais afastados, por altas concentrações (CETESB 2006). Isso ocorre porque a velocidade de formação e de decomposição do O_3 é dependente da razão COV/ NO_x e, como os locais próximos às fontes de emissão apresentam altas concentrações

desses poluentes, o O_3 é consumido rapidamente e, portanto, não é acumulado na atmosfera (Seinfeld 1986). Esse autor afirma, ainda, que o transporte do ozônio produzido nos centros urbanos para as áreas mais afastadas é outro fator que deve ser considerado.

Radiação solar, umidade relativa do ar e temperatura estão entre os fatores meteorológicos que mais influenciam a concentração de O_3 , inclusive ao longo de um dia (Figura 1.1). Além disso, nos meses de primavera e verão, há grande intensificação do processo do *smog* fotoquímico, enquanto que nos meses de outono e inverno esse processo é reduzido (Seinfeld 1986, CETESB 2006).

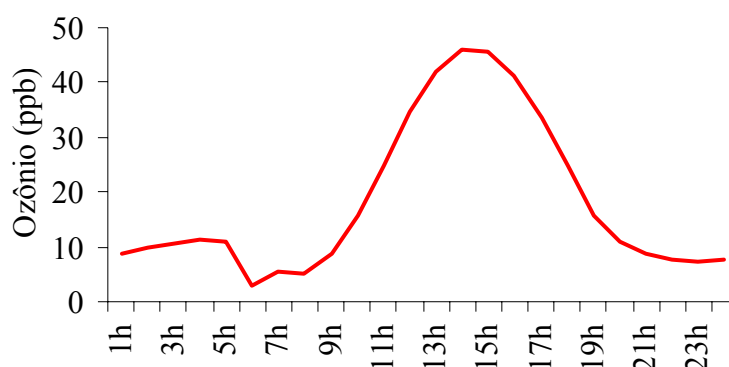


Figura 1.1: Perfil da concentração horária de ozônio.

O ozônio é o poluente oxidante de maior preocupação mundial na atualidade. Isto porque as intensas atividades antrópicas, ao emitirem seus precursores, têm proporcionado o aumento de suas concentrações na atmosfera (Emberson *et al.* 2001). Estima-se que a concentração do O_3 tem aumentado de 0,5 a 2 % ao ano no hemisfério norte (Vingarzan 2004). Além disso, o ozônio é um poluente altamente fitotóxico (Krupa & Manning 1988, Evans *et al.* 1996, Rao & Davis 1999, Saitanis *et al.* 2001, Grünhage & Jäger 2003) e tem sido responsável por muitos danos em espécies nativas e perdas na produtividade agrícola. Segundo Fumagalli *et al.* (2001), o ozônio é responsável pela perda de 17 a 39 % de

produtividade em plantações irrigadas da região do Mediterrâneo. Além disso, pode causar e/ou intensificar doenças nos seres humanos, provocando danos pulmonares, problemas cardíacos, envelhecimento precoce, câncer e morte, entre outros efeitos (Holtzman *et al.* 1983, Kehrl *et al.* 1987, Schelegle *et al.* 1989, Schelegle *et al.* 1991, Muggli 1993, Saldiva *et al.* 1994, Saldiva *et al.* 1995, Borja-Aburto *et al.* 1997, Bouthillier *et al.* 1998).

A alta toxicidade do O₃ se deve à formação de espécies ativas de oxigênio (EAO), que são moléculas que possuem oxigênio em sua composição e são bastante oxidativas, como o oxigênio molecular singlete (¹O₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), superóxido (O₂⁻) e hidroxila (OH⁻) entre outras (Halliwell & Gutteridge 1989, Muggli 1993). Nos espaços intercelulares de tecidos vegetais, o ozônio reage rapidamente com a água, causando a formação dessas espécies, que são muito agressivas às moléculas vitais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Foyer *et al.* 1994, Mudd 1996, Rao & Davis 1999, Bray *et al.* 2000).

As espécies ativas de oxigênio são freqüentemente produzidas pelos organismos vivos durante suas funções metabólicas. As principais organelas nas quais tais espécies são formadas são aquelas em que ocorre transporte de elétrons, como mitocôndrias e cloroplastos (Muggli 1993, Antonielli *et al.* 1997, Mahalingam & Fedoroff 2003). Além disso, já foi demonstrado em plantas, que as EAO, ao serem produzidas de forma ordenada, podem funcionar como sinalizadoras de mecanismos de defesa, intensificando a produção ou ativando substâncias de defesa antioxidativa (Rossetti & Bonatti 2001, Pasqualini *et al.* 2003). Dessa forma, as plantas possuem diversos mecanismos para manter o equilíbrio pró-oxidante/anti-oxidante, de modo a evitar danos celulares proporcionados pelas EAO (Iqbal *et al.* 1996). Entretanto, quando a planta está submetida a uma condição de estresse (ex: patógenos, seca ou poluentes), com conseqüente aumento da produção de EAO, o equilíbrio

pode ser quebrado e, então, a planta passa a enfrentar uma condição de estresse oxidativo (Muggli 1993).

O grau de sensibilidade de uma planta ao ozônio depende de sua capacidade de se defender contra a ação das EAO. O sistema antioxidativo, que tem como função capturar ou inativar as EAO, é composto por enzimas ou substâncias não enzimáticas solúveis ou não em água (ex: peroxidases, superóxido dismutase, ácido ascórbico, glutathione, α -tocoferol e carotenóides), que agem em rede e são oxidadas em lugar de moléculas vitais à planta (Muggli 1993, Foyer *et al.* 1994, Smirnoff 1996, Antonielli *et al.* 1997, Rao & Davis 1999, Bray *et al.* 2000, Pasqualini *et al.* 2002). Segundo Evans *et al.* (1996), alguns autores afirmam que características anatômicas, como densidade estomática, espaço intercelular, proporção de parênquima paliçádico/lacunoso, espessura da epiderme e do mesofilo, podem também determinar o grau de sensibilidade das plantas ao ozônio. Entre outros fatores que interferem na ação dos poluentes sobre as plantas, incluem-se estratégias para reduzir a entrada do poluente, como, por exemplo, restrição da abertura estomática ou aumento da quantidade de cera e tricomas cuticulares (Sharma & Butter 1975, Bobrov 1995, Evans *et al.* 1996, Pedroso 2006).

Nas plantas, a entrada do ozônio ocorre através dos estômatos abertos, onde ele se difunde rapidamente pela cavidade subestomática e pelos espaços intercelulares, produzindo as citadas EAO (Kangasjärvi *et al.* 1994, Antonielli *et al.* 1997, Peñuelas *et al.* 1999, Pasqualini *et al.* 2002). Os efeitos desses produtos tóxicos derivados do ozônio sobre as plantas vêm sendo estudados sob diferentes aspectos. Por exemplo, Evans & Fitzgerald (1993) e Soda *et al.* (2000) determinaram os efeitos histológicos provocados pelo ozônio em *Pinus elliottii* e *Pinus halepensis*. Ranieri *et al.* (1994), Rao & Davis (1999) e Tausz *et al.* (1999) estudaram as mudanças no sistema antioxidativo causado por O₃ em *Cucurbita pepo*, *Arabidopsis* e *Pinus ponderosa*. Diversos autores trataram dos efeitos no processo

fotossintético proporcionados pelo O₃ em espécies vegetais como *Hordeum vulgare*, *Spinacia oleracea*, *Fagus sylvatica*, *Carya illinoensis*, *Triticum aestivum*, *Tibouchina pulchra*, *Phaseolus vulgaris* e *Lycopersicon pimpinellifolium* (Mächer *et al.* 1995, Logan *et al.* 1999, Clark *et al.* 2000, Meyer *et al.* 2000, Moraes *et al.* 2000, Henriques 2003, Calatayud *et al.* 2004, Shi *et al.* 2005, Iriti *et al.* 2006). *Triticum aestivum* e *Trifolium repens* foram utilizados por Finnan *et al.* (1996) e Ball *et al.* (1998) para avaliar os efeitos do O₃ sobre o crescimento. Danos aos cromossomos foram determinados em plantas do gênero *Tradescantia* e em *Nicotiana plumbaginifolia* por Rodrigues *et al.* (1996) e Mancini *et al.* (2006). Danos visíveis e alterações morfológicas causados por ozônio em *Asclepias syrica* e *Prunus serotina* foram identificados por Ferdinand *et al.* (2000) e Yuska *et al.* (2003).

Assim, em função do amplo conhecimento gerado por esses e por muitos outros estudos, como os realizados por Holland *et al.* (1995), Schmieden & Wild (1995), Evans *et al.* (1996), Calatayud & Barreno (2001), Chang & Yu (2001) e Saitanis *et al.* (2001), Herbinger *et al.* (2002), Munné-Bosch & Alegre (2002), ou sintetizados em artigos ou capítulos de revisão, entre os quais os de Heath (1975), Manning & Feder (1980), Dässler & Bortitz (1988), Freedman (1995), Mudd (1996), já está bem estabelecido que o ozônio promove inúmeras alterações ao nível sub-celular de muitas plantas, tais como na estrutura fina dos componentes celulares, como desarranjo de organelas e de membranas celulares, na fisiologia e bioquímica da planta, através de alterações nas trocas gasosas, no aparato fotossintético e em outras etapas do processo fotossintético, na composição de carboidratos e nas atividades enzimáticas. Tais perturbações podem culminar com morte celular, ocasionando o aparecimento de necroses. Os danos foliares induzidos pelo ozônio podem ainda tornar a planta mais suscetível à entrada de patógenos e causar injúrias secundárias (VDI 2003).

Por outro lado, pouco se sabe sobre a ação de outros oxidantes fotoquímicos na estrutura e funcionamento das células vegetais ou sobre os efeitos desses poluentes atuando em conjunto. Com relação ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sabe-se que é uma espécie que está presente na atmosfera nas fases gasosa e aquosa, porém há poucos estudos que determinam suas concentrações nessas fases, entre eles, está o trabalho de Sigg *et al.* (1992), que encontraram concentrações entre $1,2 \cdot 10^{-5} \mu\text{mol/L}$ e $1,4 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/L}$ na fase gasosa.

Sabe-se que o peróxido de hidrogênio é uma das espécies ativas de oxigênio (EAO) mais abundante nos organismos aeróbios e que é de grande importância fisiológica, pois é uma molécula sinalizadora envolvida em uma grande variedade de processos metabólicos (Bienert *et al.* 2006, Wang & Higgins 2006). Entretanto, por ser uma EAO, também apresenta potencial para danificar moléculas vitais, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, perturbando o funcionamento celular (Foyer *et al.* 1994, Mudd 1996, Rao & Davis 1999, Bray *et al.* 2000). O H_2O_2 promove danos ao material genético por diferentes mecanismos (Mancini *et al.* 2006), é capaz de aumentar o nível de proteínas solúveis, o que pode ser explicado pela produção de compostos de proteção (Terry *et al.* 1995) e é uma das primeiras espécies ativas de oxigênio formada quando o ozônio entra na planta (Fridovich 1987, Halliwell & Gutteridge 1989, Muggli 1993).

Danos causados por poluentes em geral aos seres vivos podem ser monitorados através do uso de bioindicadores vegetais, que são organismos ou conjuntos de organismos que reagem a perturbações ambientais, de modo reprodutível e quantificável (Arndt & Schweizer 1991, VDI 1999). Essas espécies podem ser classificadas como bioacumuladoras, plantas que acumulam elementos químicos e não apresentam sintomas visíveis; biosensoras, as que reagem à poluição aérea por alterações fisiológica, metabólicas ou anatômicas não visíveis; ou bioindicadoras, as que apresentam sintomas visíveis como cloroses e necroses (De Temmerman *et al.* 2004). Além disso, o biomonitoramento pode ser qualitativo ou

quantitativo, dependendo do nível de especificidade da planta ao poluente (Arndt & Schweizer 1991).

Entre as plantas bioindicadoras sensíveis ao ozônio, a mais utilizada para biomonitoramento é a cultivar Bel W3 de *Nicotiana tabacum*, que, segundo Cronquist (1981), é uma espécie herbácea dicotiledônea pertencente à Família Solanaceae. Segundo Heggstad (1991), a cultivar bioindicadora Bel W3 (sensível), juntamente com Bel C (sensibilidade intermediária) e Bel B (resistente ao ozônio), foi resultado de pesquisa iniciada em 1957 nos Estados Unidos para explicar o aparecimento de manchas (“weather flecks”) em folhas de tabaco, inicialmente relacionadas ao clima, que causaram grandes perdas na produção de tabaco para cigarros. Mais tarde, em Beltsville e Riverside, pesquisas mostraram que as altas concentrações de ozônio eram, na verdade, as responsáveis pelas manchas. Cinco anos depois, embora não mais produzidas para fins comerciais, *N. tabacum* ‘Bel W3’, assim como *N. tabacum* ‘Bel C’ e *N. tabacum* ‘Bel B’, foram recomendadas por H.E. Heggstad e H.A. Menser como as primeiras plantas bioindicadoras de ozônio.

Outras pesquisas experimentais realizadas posteriormente reforçam o fato de *N. tabacum* ‘Bel W3’ ser altamente sensível ao ozônio. Por exemplo, Rosseti & Bonatti (2001) avaliaram mudanças histoquímicas causadas por esse poluente e por um vírus, Pasqualini *et al.* (2001) e Buuren *et al.* (2002) estudaram o sistema de defesas antioxidativas sob a ação do O₃, Pasqualini *et al.* (2002) avaliaram mudanças no processo fotossintético em tecido foliar após a fumigação com O₃ e Pasqualini *et al.* (2003) estudaram respostas de hipersensibilidade ao poluente, a partir da análise da morte celular programada durante a formação das necroses.

Além disso, a fluorescência da clorofila *a* tem sido amplamente medida em diferentes estudos para indicar mudanças no processo fotossintético em cultivares de *N. tabacum* e, conseqüentemente, para auxiliar no estabelecimento de seus níveis de sensibilidade ao ozônio. Segundo Maxwell & Johnson (2000), a fluorescência da clorofila *a* ocorre quando o

centro de reação do fotossistema II (FSII) está fechado, ou seja, quando um elétron é transferido do centro de reação para o primeiro aceptor de elétrons (Q_A). Assim, quando o complexo antena desse fotossistema receber mais energia, esta deverá ser dissipada para evitar danos. Fluorescência é uma das vias utilizadas pelas plantas para dissipar o excesso de energia não assimilada. A fluorescência (Figura 1.2) é um parâmetro utilizado para informar o estado do FSII e, indiretamente, indica a condição fotossintética da planta, sendo que em condições ótimas, em geral, as plantas apresentam valores de $F_v:F_m$ (razão que reflete o potencial de eficiência do FSII) próximos de 0,83. Portanto, quando a planta está sob efeito de algum estresse, como poluição por ozônio, a fotossíntese tende a diminuir e esse efeito pode ser percebido através de medidas de fluorescência da clorofila *a*, pois o valor dessa razão é reduzido (Clark *et al.* 2000). Loreto *et al.* (2001), Saitanis *et al.* (2001), Buuren *et al.* (2002), Degl’Innocenti *et al.* (2002), Novakoudis *et al.* (2003) e Lütz *et al.* (2005), observaram perturbações a essa razão em plantas da cultivar Bel W3 de *N. tabacum* submetidas ao ozônio, demonstrando também por esta via, sua alta sensibilidade.

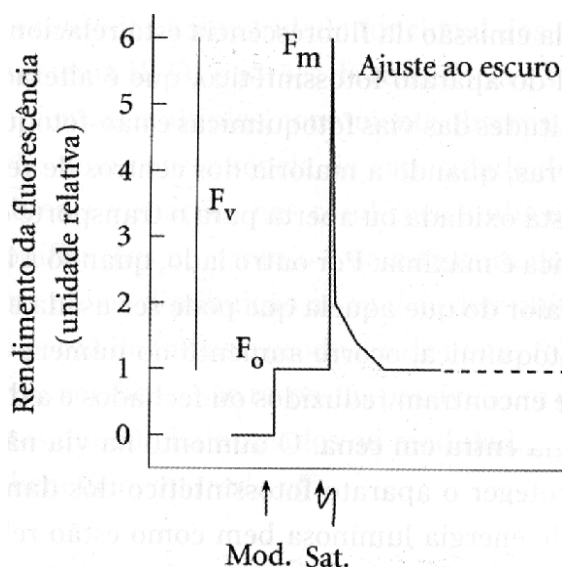


Figura 1.2: Características da emissão da fluorescência da clorofila *a* de folhas adaptadas ao escuro. Mod = luz modulada, Sat = pulso de saturação, F_0 = fluorescência mínima, F_m = fluorescência máxima e F_v = variação da fluorescência (de Mattos 2006).

Entretanto, para finalidade de monitorar os níveis de toxicidade de ozônio com *N. tabacum* ‘Bel W3’, aplica-se predominantemente apenas a análise visual dos danos foliares, devido à vantagem de poder ser realizada no próprio local em que se encontra a planta e de

ser uma medida rápida, não destrutiva e bastante econômica. É um procedimento recomendado pelo *Verein Deutscher Ingenieure* (VDI), órgão alemão responsável pela definição e atualização dos protocolos relacionados ao biomonitoramento com plantas. Essa cultivar, por ser muito sensível, manifesta sintomas foliares visíveis rapidamente e sob baixos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, os quais são muito característicos e facilmente quantificados (Heggestad 1991). Segundo VDI (2003), as necroses tipicamente induzidas por ozônio nas folhas de *N. tabacum* ‘Bel W3’ têm diferentes tamanhos e formatos, ocorrendo sempre entre as nervuras. Inicialmente, ocorre o decréscimo do volume das células injuriadas, formando depressões na superfície foliar superior, com o tempo tornam-se de cor prata a bege e então marrom clara (Figura 1.3).



Figura 1.3: Fotos das necroses provocadas por ozônio em folhas de *N. tabacum* ‘Bel W3’.

Nicotiana tabacum ‘Bel W3’ já foi amplamente utilizada para avaliação dos níveis de contaminação aérea por ozônio em diversas regiões do planeta. Ashmore *et al.* (1978) verificaram que, em ilhas inglesas, quanto maior a intensidade luminosa, maior a

concentração de ozônio e maior a porcentagem de danos foliares. Klumpp *et al.* (1994) e Domingos *et al.* (1998) estudaram a região de Cubatão/São Paulo/Brasil e verificaram que quanto mais distante das fontes de poluição, maiores eram as porcentagens de danos foliares. Kopel e Sild (1995), trabalhando na Estônia, verificaram que o tabaco foi eficiente para distinguir as diferentes regiões de acordo com os níveis de ozônio. Vergé *et al.* (2002), Kostka-Rick (2002) e Fillela *et al.* (2005), que expuseram a planta em diferentes regiões, observaram que o aparecimento de necroses aumentava de acordo com a concentração de O₃ e confirmaram essa cultivar como bioindicadora de O₃. Peñuelas *et al.* (1999) e Ribas e Peñuelas (2002 e 2003) verificaram que a porcentagem de danos foliares em plantas de tabaco expostas na região da Catalonha/Espanha seguiu o padrão de concentração de ozônio. Klumpp *et al.* (2006) expuseram *N. tabacum* em várias cidades europeias e observaram com eficiência o impacto do ozônio em áreas urbanas, suburbanas e rurais.

Justificativa e objetivos

Alguns autores já demonstraram que variações meteorológicas interferem na eficiência bioindicadora de *N. tabacum* 'Bel W3'. Koppel & Sild (1995) consideraram que as condições climáticas são importantes para explicar o efeito do ozônio sobre essa variedade em uma mesma área, em anos diferentes. Antonielli *et al.* (1997) e Finnan *et al.* (1996) afirmaram que a radiação é muito importante para determinar seu grau de sensibilidade. Peñuelas *et al.* (1999), embora tenham mostrado que tabaco foi apropriado para biomonitoramento qualitativo da presença de ozônio na atmosfera na Catalonha/Espanha, verificaram que a fitotoxicidade desse poluente varia fortemente em diferentes estações e períodos, dependendo de fatores como temperatura, umidade e ventos, que atuam na abertura e fechamento dos estômatos. Esses autores observaram, por exemplo, que plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' apresentaram danos intensos com doses acumuladas de O₃ (AOT40 – dose acumulada de

ozônio acima de 40 ppb, quando a intensidade luminosa está acima de 50 W.m^{-2}) nos locais onde havia ventos pouco intensos, enquanto, nos lugares sob ventos mais fortes, as injúrias surgiram somente quando foram alcançados valores de AOT40 mais elevados.

Sendo assim, é plausível supor que, nas condições meteorológicas de São Paulo, as plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' podem, eventualmente, responder com necroses foliares a outros fatores estressantes, além da contaminação atmosférica por ozônio, tendo em vista que essa cultivar bioindicadora, segundo Krupa & Manning (1988), foi padronizada em região com clima muito distinto. Assim, antes que se possa defini-la como bioindicadora em nosso meio urbano, é preciso verificar se ela é capaz de discriminar locais e épocas mais e menos atingidos pelo ozônio, podendo ser usada para biomonitoramento qualitativo e, também, se essa resposta pode ser relacionada linearmente com os níveis de ozônio, revelando bom potencial para biomonitoramento quantitativo.

Além disso, a metrópole de São Paulo é considerada como uma das mais industrializadas e urbanizadas da América Latina, apresentando sérios problemas de poluição atmosférica causados pelas diferentes fontes poluidoras. Entre elas, está a imensa frota veicular, que consome combustíveis variados, como álcool (etanol), gasolina, diesel e gás natural. O etanol é um combustível utilizado particularmente no Brasil e seu uso promove maior concentração de compostos oxigenados na atmosfera, tais como aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos. Na cidade de São Paulo, por exemplo, já foi demonstrado que aldeídos e peróxido de hidrogênio têm sido encontrados em concentrações mais elevadas (1- 50 ppb), se comparadas a outras áreas urbanas (0,9- 15 ppb) (Montero *et al.* 2001, Jairo Pedrotti, comunicação pessoal). Em função desses aspectos, a contaminação atmosférica na cidade de São Paulo pode ser considerada bastante peculiar. Portanto, pode-se levantar a hipótese, também, de que tais compostos, que são potencialmente oxidativos, podem ser fatores de estresse adicionais às plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas em São Paulo, podendo

causar necroses foliares. Efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos de ozônio e de outros oxidantes fotoquímicos também podem ser esperados.

A padronização de *N. tabacum* 'Bel W3' como bioindicadora de ozônio, em especial, para São Paulo, poderia ampliar a área de monitoramento de qualidade do ar, realizado por métodos físicos e químicos, que ainda não abrange toda a extensão territorial da cidade. Essa padronização permitirá, ainda, que os resultados obtidos possam ser comparados aos obtidos em diversas regiões do mundo, podendo contribuir para o mapeamento global de contaminação por ozônio. Essa cultivar também poderia ser usada como parâmetro de comparação para a padronização de espécies nativas como bioindicadoras.

Dessa forma, objetivou-se:

- Determinar a eficiência de *N. tabacum* 'Bel W3' para biomonitoramento qualitativo e quantitativo da presença de ozônio nas condições ambientais de São Paulo;
- Verificar se o peróxido de hidrogênio, assim como a associação deste com ozônio, causam necroses foliares visíveis e se é possível estabelecer curva entre intensidade dos danos visíveis e doses do poluente.

Para isso, o trabalho foi dividido em três etapas. Na primeira etapa, plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' foram expostas em locais da cidade de São Paulo, atingidos por diferentes níveis de contaminação por ozônio e em diferentes épocas do ano, determinando seu potencial para biomonitoramento. Na segunda etapa, plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' foram expostas em câmaras de fumigação a concentrações crescentes de ozônio, simulando as condições de exposição em campo. Nessa fase, procurou verificar, ainda, se outro oxidante como o peróxido de hidrogênio, sozinho ou associado a ozônio, poderia causar necroses foliares similares às induzidas por ozônio somente, o que poderia alterar a relação entre dose deste último poluente e intensidade de respostas foliares visíveis. Na terceira e última etapa, a

partir dos resultados obtidos em campo e em laboratório, foi realizada, uma avaliação crítica do potencial de uso de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ para o biomonitoramento de ozônio na cidade de São Paulo. Cada uma dessas etapas será tratada individualmente nos capítulos que se seguem.

Referências bibliográficas

- Antonielli, M., Pasqualini, S., Ederli, L., Batini, P., Moscatello, S. & Loreto, F.** 1997. Physiological characteristics of tobacco cultivar with contrasting sensitivity to ozone. *Environmental and Experimental Botany* 38: 271-277.
- Arndt, U. & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In *Biological monitoring. Signals from the environment*, Ellenberg *et al.* (eds.). Vieweg, Eschborn, pp. 199-298.
- Ashmore, M.R., Bell, J.N.B. & Reily, C.L.** 1978. A survey of ozone levels in the British Isles using indicator plants. *Nature* 276:813-815.
- Ball, G.R., Benton, J., Palmer-Brown, D., Fuhrer, J., Skärby, L., Gimeno, B.S. & Millis, G.** 1998. Identifying factors which modify the effects of ambient ozone on white clover (*Trifolium repens*) in Europe. *Environmental Pollution* 103: 7-16.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P.** 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 994-1003.
- Bobrov, R.A.** 1995. Use of plants as biological indicators of smog in the air of Los Angeles country. *Science* 121: 510-511.

- Borja-Aburto V.H., Loomis D.P., Bangdiwala S.I., Shy C.M. & Rascon P.R.** 1997. Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico City. *Am. J. Epidemiol.* 145(3): 258-68.
- Bouthillier L., Vincent R., Goegan P., Adamson I.Y., Bjarnason S., Stewart M., Gunette J., Potvin M. & Kumarathasan P.** 1998. Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol* 153: 1873-1884.
- Brasseur, G. & Schimel, D.** 1999. Atmospheric chemistry and the Earth system. In: *Atmospheric chemistry and global change*, G.P. Brasseur, J.J. Orlando & G.S. Tyndall (eds.). pp. 1-20.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B.B. Buchanan, W. Gruissen, R.L. Jones (eds.). American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158-1203.
- Buuren, M.L.; Guidi, L.; Fornali, S.; Ghetti, F.; Franceschetti, M.; Soldatini, G.F. & Bagni, N.** 2002. Ozone-response mechanisms in tobacco: implications of polyamine metabolism. *New Phytologist* 156: 389-398.
- Calatayud, A. & Barreno, E.** 2001. Chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. *Environmental Pollution* 115: 283-289.
- Calatayud, A., Iglesias, D.J., Talón, M. & Barreno, E.** 2004. Response of spinach leaves (*Spinacia oleracea*) to ozone measured by gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Photosynthetica* 42 (1): 23-29.
- CETESB.** 2006. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2005. Série Relatórios / Secretaria do Estado do Meio Ambiente.

- Chang, Y. & Yu. M.R.** 2001. Correlation between ozone resistance and relative chlorophyll fluorescence or relative stomatal conductance of bedding plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42:265-272.
- Clark, A.J., Lantodolt, W., Bucher, J.B. & Strasser, R.J.** 2000. Beech (*Fagus sylvatica*) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll *a* fluorescence performance index. *Environmental Pollution* 109: 501-507.
- Cronquist, A.** 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University press, New York.
- Dässler, H.G. & Börtitz, S.** 1988. Air pollution and its influence on vegetation. Dr W. Jung Publishers, Dordrecht.
- De Temmerman, L., Bell, J.N.B., Garrec, J.P., Klumpp, A., Krause, G.H.M. & Tonneijck, A.E.G.** 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: *Proceedings of Eurobionet 2002 – Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness*, A. Klumpp, W. Ansel & G. Klumpp (eds.) pp. 337-373.
- Degl’Innocenti, E., Guidi, L. & Soldatini, G.F.** 2002. Characterisation of the photosynthetic response of tobacco leaves to ozone: CO₂ assimilation and chlorophyll fluorescence. *J. Plant Physiol.* 159: 845-853.
- Domingos, M., Klumpp A. & Klumpp G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência & Cultura* 50: 230-236.
- Emberson L.D., Ashmore M.R., Murray F., Kuylensstierna J.C.I., Percy K.E., Izuta T., Zheng Y., Shimizu H., Sheu B.H., Liu C.P., Agrawal M., Wahid A., Abdel-Latif N.M., Van Tienhoven M., Bauer L.I. & Domingos M.** 2001. Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. *Water, Air and Soil Pollution* 130 (1/4): 107-118.

- Evans, L.S., Albury, K. & Jennings, N.** 1996. Relationships between anatomical characteristics and ozone sensitivity of leaves of several herbaceous dicotyledonous plant species at great smoky mountains national park. *Environmental and Experimental Botany* 36 (4): 413-420.
- Evans, L.S. & Fitzgerald, G.A.** 1993. Histological effects of ozone on slash pine (*Pinus elliotti* var. *Densa*). *Environmental and Experimental Botany* 33(4): 505-513.
- Ferdinand, J.A., Fredericksen, T.S., Kouterick, K.B. & Skelly, J.M.** 2000. Leaf morphology and ozone sensitivity of two open pollinated genotypes of black cherry (*Prunus serotina*) seedlings. *Environmental Pollution* 108: 297-302.
- Filella, I., Peñuelas, J. & Ribas, A.** 2005. Using plant biomonitors and flux modelling to develop O₃ dose–response relationships in Catalonia. *Environmental Pollution* 134: 145-151.
- Finnan, J.M., Jones, M.B. & Burke, J.I.** 1996. A time-concentration study on the effects of ozone on spring wheat (*Triticum aestivum* L.). 1: Effects on yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 57: 159-167.
- Foyer, C.H., Descourvières, P. & Kunert, K.J.** 1994. Protection against oxygen radical: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17: 507-523.
- Freedman, B.** 1995. *Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses.* 2nd ed., Academic Press Inc., San Diego.
- Fridovich, I.** 1987. The biology of oxygen radicals: general concepts. In: *Oxygen radicals and tissue injury* (Barry Halliwell ed.) - Editora Proceedings of a Book Lodge Symposium. 148p.

- Fumagali, I., Gimeno, B.S., Velissariou, D., Temmerman, L. & Mills, G.** 2001. Evidence of ozone-induced adverse effects on crops in the Mediterranean region. *Atmospheric Environment* 35: 2583-2587.
- Grünhage, L & Jäger, H-J.** 2003. From critical levels to critical loads for O₃: a discussion of a new experimental and modeling approach for establishing flux-response relationships for agricultural crops and native plant species. *Environmental Pollution* 125: 99-110.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C.** 1989. Protection against radical damage: systems with problems. In: *Free radicals in biology and medicine*, B. Halliwell & J.M.C. Gutteridge (eds.). Clarendon Press, Oxford. pp. 277-289.
- Heath, R.L.** 1975. Ozone. In: *Responses of plants to air pollution*, J.B. Mudd & T.T. Kozlowski (eds.). Academic Press, New York, pp. 23-55.
- Heggestad, H.E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264-291.
- Henriques, F.S.** 2003. Gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence kinetics and lipid peroxidation of pecan leaves with varying manganese concentration. *Plant Science* 165: 239-244.
- Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A. & Grill, D.** 2002. Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defense systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 691-696.
- Holland, M.R., Mueller, P.W., Rutter, A.J. & Shaw, P.J.A.** 1995. Growth of coniferous trees exposed to SO₂ and O₃ using an open-air fumigation system. *Plant, Cell and Environment* 18: 227-236.

- Holtzman M.J., Fabbri L.M., O'Byrne P.M., Gold B.D., Aizawa H., Walters E.H., Alpert S.E., Nadel J.A.** 1983. Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:686-90.
- Iqbal, M., Abdin, M.Z., Mahmooduzzafar, Y.A. & 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, pp. 195-204.
- Iriti, M., Belli, L., Nali, C., Lorenzini, G., Gerosa, G. & Faoro, F.** 2006. Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersico pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environmental Pollution* 141: 275-282.
- Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. & Karjalainen, R.** 1994. Plant defense systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* 17: 783-794.
- Kehrl H.R., Vicent L.M., Kowalky R.J., Horstman D.H., O'Neil J.J. & McCartney W.H., Bromberg P.A.** 1987. Ozone exposure increases respiratory epithelial permeability in humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:1124-28.
- Klumpp, A., Klumpp, G. & Domingos, M.** 1994. Plants as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85: 109-116.
- Klumpp, A., Domingos, M. & Pignata, M.L.** 1999. Air pollution and vegetation damage in South America – state of knowledge and perspectives. In: *Environmental pollution and plant responses*, S.B. Agrawal & M. Agrawal (eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. pp. 111-136.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas, À., 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 (38): 7437-7448.

Koppel, A. & Sild, E. 1995. Bioindication of ozone in Estonia by using the tobacco variety Bel W3. *Water, Air, and Soil Pollution* 85: 1515-1519.

Kostka-Rick, R. 2002. Ozone biomonitoring in a local net work around an automotive plant. In: *Proceedings of Eurobionet 2001 - Bioindication and air quality in European cities. Research, application, communication*, A. Klumpp, A. Fomin, G. Klumpp & W. Ansel (eds.) pp. 243-248.

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

Logan, B.A, Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T.N. & Adams III, W.W. 1999. Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics. *Planta* 209: 213-220.

Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F. & Pasqualini, S. 2001. Ozone quenching proprieties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology* 126: 993-1000.

Lütz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H.K. & Kotzabasis, K. 2005. Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. *Biochemica et Biophysica Acta* 1710 (1): 24-33.

Mächler, F., Wasescha, M.R., Krieg, F. & Oertli, J. 1995. Damage by ozone and protection by ascorbic acid in Barley leaves. *Journal of Plant Physiology* 147: 469-473.

Mahalingam, R. & Fedoroff, N. 2003. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum* 199: 56-68.

- Manahan, S.E.** 1999. Environmental chemistry. 7th ed. CRC Press LLC. pp1-898.
- Mancini, A., Buschini, A., Restivo, F.M., Rossi, C. & Poli, P.** 2006. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Science* 170: 845-852.
- Manning W.J. & Feder, W.A.** 1980. Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Publishers Ltd., London.
- Maxwell, K. & Johnson, G.N.** 2000. Chloropyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51 (345): 659-668.
- Meyer, U., Köllner, B., Willenbrink, J & Krause, G.H.M.** 2000. Effects of different ozone exposure regimes on photosynthesis, assimilates and thousand grain weight in spring wheat. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 78: 49-55.
- Miguel, A.H.** 1992. Poluição atmosférica urbana no Brasil: uma visão geral. *Química nova* 15 (2): 138-142.
- Montero, L., Vasconcellos, P.C., Souza, S.R., Pires, M.A.F., Sanchez, O.R.C., Andrade, M.F. & Carvalho, L.R.F.** 2001. Measurements of Atmospheric Carboxylic Acids and Carbonyl Compounds in São Paulo, Brazil. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3071-3081.
- Moraes, R.M., Delitti, W.B.C. & Moraes, J.A.P.V.** 2000. Fotossíntese líquida e crescimento de *Tibouchina pulchra* Cogn. Nas proximidades de indústrias petroquímicas, em Cubatão, SP. *Hoehnea* 27(1): 77-85, 4 tab.
- Munné-Bosch, S. & Alegre, L.** 2002. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* 214: 608-615.
- Mudd, J.B.** 1996. Biochemical basis for the toxicity of ozone. In: Plant response to air pollution, M. Yunus & M. Iqbal (eds.). John Wiley & Sons Ltd. pp. 267-283.

- Muggli, R.** 1993. Free radical tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: Free radical and antioxidants in nutrition, F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi and C. Rice-Evans (eds.). Richelieu Press, London. pp. 189-204.
- Navakoudis, E., Lütz, C., Langebartels, C., Lütz-Meindl, U. & Kotzabasis, K.** 2003. Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochemica et Biophysica Acta* 1621: 160-169.
- Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Torre, G.D. & Ferranti, F.** 2001. Effects of short-term ozone fumigation on tobacco plants: response of the scavenging system and expression of the glutathione reductase. *Plant, Cell and Environment* 24: 245-252.
- Pasqualini, S., Antonielli, M., Ederli, L., Piccioni, C. & Loreto, F.** 2002. Ozone uptake and its effect on photosynthetic parameters of two tobacco cultivars with contrasting ozone sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 599-603.
- Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Torre, G.D. & Ferranti, F.** 2003. Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 133: 1122-1134.
- Pedroso, A.N.V.** 2006. Avaliação estrutural de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' sob diferentes níveis de contaminação atmosférica. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. pp. 1-68p.
- Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B.S. & Filella, I.** 1999. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (N.E. Spain) 56: 221-224.
- Rao, M.V. & Davis, K.R.** 1999. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid. *The Plant Journal* 17: 603-614.

- Raven, P.H., Berg, L.R. & Johnson, G.B.** 1993. Environment. Saunders College Publishing, Forth worth. pp. 1-569.
- Ribas, A. & Peñuelas, J.** 2002. Ozone bioindication in Barcelona and surrounding área of Catalonia. In: Proceedings of Eurobionet 2001 - Bioindication and air quality in European cities. Research, application, communication, A. Klumpp, A. Fomin, G. Klumpp and W. Ansel (eds.). pp. 221-225.
- Ribas, A. & Peñuelas, J.** 2003. Biomonitoring of tropospheric ozone phytotoxicity in rural Catalonia. *Atmospheric Environment* 37: 63–71.
- Rodrigues, G.S., Madkour, S.A. & Weinstein, L.H.** 1996. Genotoxic activity of ozone in *Tradescantia*. *Environmental and Experimental Botany* 36 (1): 45-50.
- Ranieri, A., Schenone, G., Lencioni, L. & Soldatini, G.F.** 1994. Detoxificant enzymes in pumpkin grown in polluted ambient air. *Journal of Environmental Quality* 23(2): 360-364.
- Rosseti, S. & Bonatti, P.M.** 2001. In situ histochemical monitoring of O₃- and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 433-442.
- Saitanis, C.J., Riga-Karandinos, A.N. & Karandinos, M.G.** 2001. Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Chemosphere* 42: 945-953.
- Saldiva, P.H.N, Lichtenfels, A.J.F.C., Paiva, P.S.P/, Barone, I.A., Martins, M.A., Massad, E., Pereira, J.C.R., Xavier, V.P., Singer, J.M. & Bohm, G.M.** 1994. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brasil - a preliminary report. *Environmental Research.* 65: 218-225.

- Saldiva P.H.N., Pope C.A., Schwartz J., Dockery D.W., Lichtenfels J.F.C., Salge J.M., Barone I.A. & Bohm G.M.** 1995. Air pollution and mortality in elderly people: a time series study in São Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Health* 50:159-163.
- Sánchez, M.J.S., Sánchez, G., Calatayud, V., Minaya, M. & Cerveró, J.** 2001. La contaminación atmosférica en los bosques: guía para la identificación de daños visibles causados por ozono (M.J.S. Sánchez, G.S. Peña, V.C. Lorente, M.T.M. Gallego and J.C. Albert eds.). Artegraf, S.A. pp. 1-163.
- Sawyer, F.R., Harley, R.A., Cadle, S.H., Norbeck, J.M. Slott, R. & Bravo, H.A.** 2000. Mobile sources critical review: 1998 NARSTO assessment. *Atmospheric Environment*. 34: 2161-2181.
- Schelegle E.S., Adans W.C., Giri S.N. & Siefkin. D.** 1989. Acute ozone exposure increases plasma prostaglandin F₂ α in ozone-sensitive human subjects. *Am. Rev. Resp. Dis.* 140:211-16.
- Schelegle E.S., Siefkin D., McDonald R.J.** 1991. Time course of ozone-induced neutrophilia in normal humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:1353-58.
- Schmieden, U. & Wild, A.** 1995. The contribution of ozone to forest decline. *Physiologia Plantarum* 94: 371-378.
- Seinfeld, J.H.** 1986. *Atmospheric Chemistry and physics of air pollution*. John Wiley & Sons. pp. 1-738.
- Seinfeld, J.H.** 1989. Urban air pollution: state of the science. *Science* 243: 745-752.
- Sharma, G.K. & Butter, J.** 1975. Environmental Pollution: leaf cuticular patterns in *Trifolium pratense*. *L. Ann. Bot.* 39: 1087-1090.

- Shi, S., Wang, G., Wang, Y., Zhang, L. & Zhang, L.** 2005. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide* 13: 1-9.
- Sigg, A., Staffelbach, T. & Neftel, A.** 1992. Gas phase measurements of hydrogen peroxide in Greenland and their meaning for the interpretation of H₂O₂ records in ice cores. *Journal of Atmospheric Chemistry* 14: 223-232.
- Sillman, S.** 1999. The relation between ozone, NO_x and hydrocarbons in urban and polluted rural environments. *Atmospheric Environment* 33: 1821-1845
- Smirnoff, N.** 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.
- Soda, C., Bussotti, F., Grossoni, P., Barnes, J., Mori, B. & Tani, C.** 2000. Impacts of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. *Environmental and Experimental Botany* 44: 69-82.
- Souza, S.R.** 1998. Ácidos carboxílicos na atmosfera de São Paulo. Um estudo analítico e ambiental. Tese de doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- Tausz, M., Bytnerowicz, A., Weidner, W., Arbaugh, M.J., Padgett, P. & Grill, D.** 1999. Changes in free-radical scavengers describe the susceptibility of *Pinus ponderosa* to ozone in southern California forests. *Water, Air, and Soil Pollution* 116: 249-254.
- Terry, G.M., Stokes, N.J., Lucas, P.W. & Hewitt, C.N.** 1995. Effects of reactive hydrocarbons and hydrogen peroxide on antioxidant activity in Cherry leaves. *Environmental Pollution* 88: 19-26.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure.** 1999. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/1. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

- 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 example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Environmental Pollution 118: 337-349.
- Vingarzan, R.** 2004. A review of surface ozone background levels and trends. Atmospheric Environment 38: 3431-3442.
- Wang, J. & Higgins, V.J.** 2006. Nitric oxide modulates H₂O₂-mediated defenses in the *Colletotrichum coccodes*–tomato interaction. Physiological and Molecular Plant Pathology 67: 131-137.
- Yuska, D.E., Skelly, J.M., Ferdinand, J.A., Stevenson, R.E., Savage, J.E., Mulikd, J.D. & Hinesd, A.** 2003. Use of bioindicators and passive sampling devices to evaluate ambient ozone concentrations in north central Pennsylvania. Environmental Pollution 125: 71-80.

Capítulo 2

Potencial de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ para biomonitoramento do ozônio troposférico na cidade de São Paulo

Resumo

A cidade de São Paulo tem como um dos principais poluentes aéreos o O₃, que é o poluente de maior importância no *smog* fotoquímico por se encontrar em altos níveis, participar ativamente da química atmosférica e, especialmente, ser um dos mais fitotóxicos. *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ está entre as espécies mais utilizadas em biomonitoramento da contaminação atmosférica por esse poluente. Assim, objetivou-se avaliar o potencial dessa cultivar para biomonitoramento do nível de contaminação atmosférica por O₃ na cidade de São Paulo. As plantas foram cultivadas de forma padronizada e expostas, por 14 dias durante 15 meses, em diferentes áreas da cidade com níveis distintos de contaminação por O₃. Foi determinada visualmente a porcentagem de área foliar com necroses e verificada qual sua relação com os poluentes e fatores climáticos. No geral, a variação em danos foliares, observada nos diferentes locais e ao longo do tempo acompanhou a variação na concentração de O₃. *N. tabacum* ‘Bel W3’ mostrou-se, assim, adequada para biomonitoramento qualitativo da presença de ozônio na cidade de São Paulo. Porém, análises de regressão mostraram que apenas uma pequena parte dos danos puderam ser explicadas pela concentração de O₃ e que a relação entre ambas as variáveis não foi linear, como seria adequado para fins de biomonitoramento quantitativo. A análise de componentes principais demonstrou que os danos foliares podem estar relacionados com o processo do *smog* fotoquímico, sugerindo que outros produtos do *smog* fotoquímico poderiam contribuir para o aparecimento das necroses foliares. Essa análise indicou, ainda, que outras variáveis climáticas poderiam estar envolvidas na manifestação das necroses foliares em plantas

de *N. tabacum* ‘Bel W3’. Portanto, o uso dessa cultivar para biomonitoramento quantitativo do ozônio é questionável para a cidade de São Paulo.

Palavras-chave: *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’, biomonitoramento, ozônio.

Introdução

Em áreas antropizadas, sob condições meteorológicas estáveis, óxidos de nitrogênio (NO_x) e compostos orgânicos voláteis (COV), na presença de luz solar, interagem promovendo o processo denominado *smog* fotoquímico, fenômeno predominantemente urbano, que produz uma cadeia complexa de reações capaz de formar e acumular ozônio (O_3), nitrato de peroxiacetila (PAN), aldeídos, cetonas, entre outros compostos denominados poluentes fotoquímicos (Sawyer *et al.*, 2000). Segundo Emberson *et al.* (2001) e Orendovici *et al.* (2003), o ozônio é o poluente de maior importância no *smog* fotoquímico por se encontrar em altos níveis, participar ativamente da química atmosférica e, especialmente, ser um dos mais fitotóxicos, devido ao seu alto poder oxidativo. Essa toxicidade é resultado de sua alta reatividade no interior dos organismos, pois promove a formação de espécies ativas de oxigênio (EAO), que são muito agressivas às moléculas vitais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Krupa & Manning 1988, Bray *et al.* 2000, Grünhage & Jäger 2003).

Segundo Emberson *et al.* (2001), os níveis de ozônio são muito mais elevados no hemisfério Norte do que no Sul. Entretanto, crescentes aumentos na emissão de poluentes têm chamado a atenção para a deterioração da qualidade do ar em alguns países do hemisfério Sul (Klumpp *et al.* 1999). De acordo com Mage *et al.* (1995) e Molina & Molina (2004), a cidade de São Paulo, que está entre as mais populosas do mundo, tem o ozônio como um dos principais poluentes aéreos.

A variação ao longo do tempo da concentração dos poluentes fotoquímicos na troposfera depende especialmente de componentes físicos, como as condições meteorológicas, que acabam por interferir na dispersão de poluentes. A eficiência do processo de dispersão e a distribuição das fontes de emissão dos precursores do *smog* fotoquímico, por sua vez, são fatores determinantes da variação espacial dos níveis troposféricos dos poluentes fotoquímicos (Miguel 1992, Peñuelas *et al.* 1999, CETESB 2006).

Na primavera e verão da cidade de São Paulo, as condições meteorológicas permitem uma circulação atmosférica mais intensa, reduzindo os níveis dos poluentes, porém, nesses períodos, há de se considerar um aumento da concentração dos compostos fotoquímicos devido à maior incidência de radiação solar (CETESB 2006). A circulação do ar, influenciada pela brisa marítima, pelo relevo (vale e montanhas) e pelos efeitos urbanos como rugosidade, barreira provocada pelas construções civis, e ilhas de calor, são fatores que também prejudicam a dispersão desses poluentes (Oliveira *et al.* 2003). Ainda, deve-se ressaltar que a poluição por ozônio em São Paulo é agravada pela distribuição espacial muito heterogênea das fontes de emissão de seus precursores, em especial do tráfego de veículos automotores. Acrescenta-se que esses veículos utilizam combustíveis variados, como etanol, gasolina, óleo diesel e gás natural (CETESB 2006). O Brasil, aliás, é um dos únicos países que utilizam o etanol como combustível, potencializando o problema de contaminação atmosférica por poluentes fotoquímicos. Isto porque a queima do etanol contribui para o aumento da emissão de acetaldeídos (Nguyen *et al.* 2001), que, de acordo com Miguel (1992), Massambani & Andrade (1994) e Sillman (1999), está envolvido no processo do *smog* fotoquímico.

A qualidade do ar pode ser avaliada, em nível local, regional e global, através de estimativas das emissões, do uso de modelos matemáticos e de medidas das concentrações ambientais dos principais poluentes. Contudo, tais metodologias nem sempre são viáveis sob o ponto de vista econômico e de infra-estrutura local. Atualmente, tem se utilizado também o

biomonitoramento para avaliar a qualidade do ar, que consiste em medidas rotineiras de respostas características de organismos vivos a certos poluentes em ambientes antropizados. O biomonitoramento utilizando plantas é uma alternativa possível para análise da qualidade do ar, com a vantagem de dimensioná-la sob o prisma dos seres vivos. Por isso, há tempos já se utilizam diferentes reações vegetais, em nível de células, tecidos/órgãos, organismos ou ecossistemas, para determinar a intensidade de contaminação ambiental causada por poluentes aéreos, o que tem sido denominado por alguns autores como biomonitoramento qualitativo (Arndt & Schweizer 1991, Arndt *et al.* 1996, VDI 1999, Mulgrew & Williams 2000, De Temmerman *et al.* 2004).

Como já mencionado no Capítulo 1, a cultivar Bel W3 de *Nicotiana tabacum*, por possuir alta sensibilidade a níveis tóxicos de O₃ no ar, está entre as espécies mais utilizadas em biomonitoramento qualitativo da ocorrência de contaminação atmosférica por ozônio troposférico em diferentes países do hemisfério Norte (Krupa & Manning 1988, Heggstad 1991, Krupa *et al.* 1993, Vergé *et al.* 2002, Klumpp *et al.* 2006). Porém, Koppel & Sild (1995), Antonielli *et al.* (1997), Finnan *et al.* (1996) e Peñuelas *et al.* (1999) demonstraram que variações meteorológicas interferem na eficiência bioindicadora de *N. tabacum* ‘Bel W3’. Por outro lado, seu uso tem sido bem restrito nas regiões tropicais e sub-tropicais, de maneira que ainda é necessário testar sua eficiência para biomonitoramento nessas regiões, considerando que essa cultivar foi desenvolvida em região com características ambientais muito distintas. Assim, objetivou-se avaliar o potencial dessa cultivar para biomonitoramento do nível de contaminação atmosférica por ozônio na cidade de São Paulo. Para tanto, foi determinada a variação na porcentagem de área foliar ocupada por necroses em plantas de *N. tabacum* expostas em diferentes regiões da cidade com concentrações de poluentes distintas e verificada qual sua relação com ozônio, entre outros poluentes, e com fatores climáticos.

Material e métodos

Plantas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ foram expostas, durante o período de setembro de 2002 a dezembro de 2003, em seis locais da cidade de São Paulo, atingidos por níveis distintos de contaminação atmosférica por ozônio (Figura 2.1).

A escolha do Parque do Ibirapuera, situado no Distrito Administrativo de Moema, e da Escola Pública, no Distrito Administrativo de Campo Belo, ambos na Zona Sul da cidade, para exposição das plantas, foi baseada em série histórica de dados de qualidade do ar obtida pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Geralmente, no Parque do Ibirapuera, são registradas altas concentrações de O₃ e baixas de NO_x e PM₁₀. Já na Escola de Campo Belo, são registradas baixas concentrações de O₃ e alta de NO_x e PM₁₀ (Figura 2.3). Essa característica está relacionada com a localização dessas áreas, pois, enquanto a Escola se situa ao lado de duas importantes vias de tráfegos, e, portanto sofre grande influência da emissão de poluentes primários, o Parque está afastado de grandes vias e, portanto, não sofre o impacto causado diretamente por essa fonte. Porém, está sujeito à ação de poluentes oxidantes que tendem a ser acumulados nessas regiões (CETESB 1997).

Essas duas primeiras áreas, por apresentarem estações de monitoramento, foram consideradas como parâmetros de comparação para a escolha das demais localidades, que possuem características semelhantes a estas. O Viveiro Manequinho Lopes se localiza ao lado do Parque do Ibirapuera e apresenta condições ambientais semelhantes. As próximas duas áreas de estudo apresentam características similares à área da Escola. Tanto o Aeroporto de Congonhas, situado a poucos metros da Escola, como a Marginal Pinheiros (Distrito Administrativo de Pinheiros), estão localizados ao lado de grandes avenidas e, portanto, também estão sujeitos à ação provocada pelo intenso tráfego veicular. O Jardim Botânico localiza-se no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga - PEFI (Distrito Administrativo do Jabaquara), o qual está inserido na região sul da grande malha urbana da cidade de São Paulo. Estudos realizados com plantas

bioindicadoras já demonstraram que esse local tem sido intensamente afetado pelo *smog* fotoquímico e menos afetado por poluentes primários emitidos por veículos (Klumpp *et al.* 1994, Domingos *et al.* 2002). Dessa forma, também se assemelha ao Parque do Ibirapuera. Concomitantemente, adotou-se uma casa de vegetação com ar filtrado como ambiente de referência (Figura 2.1).

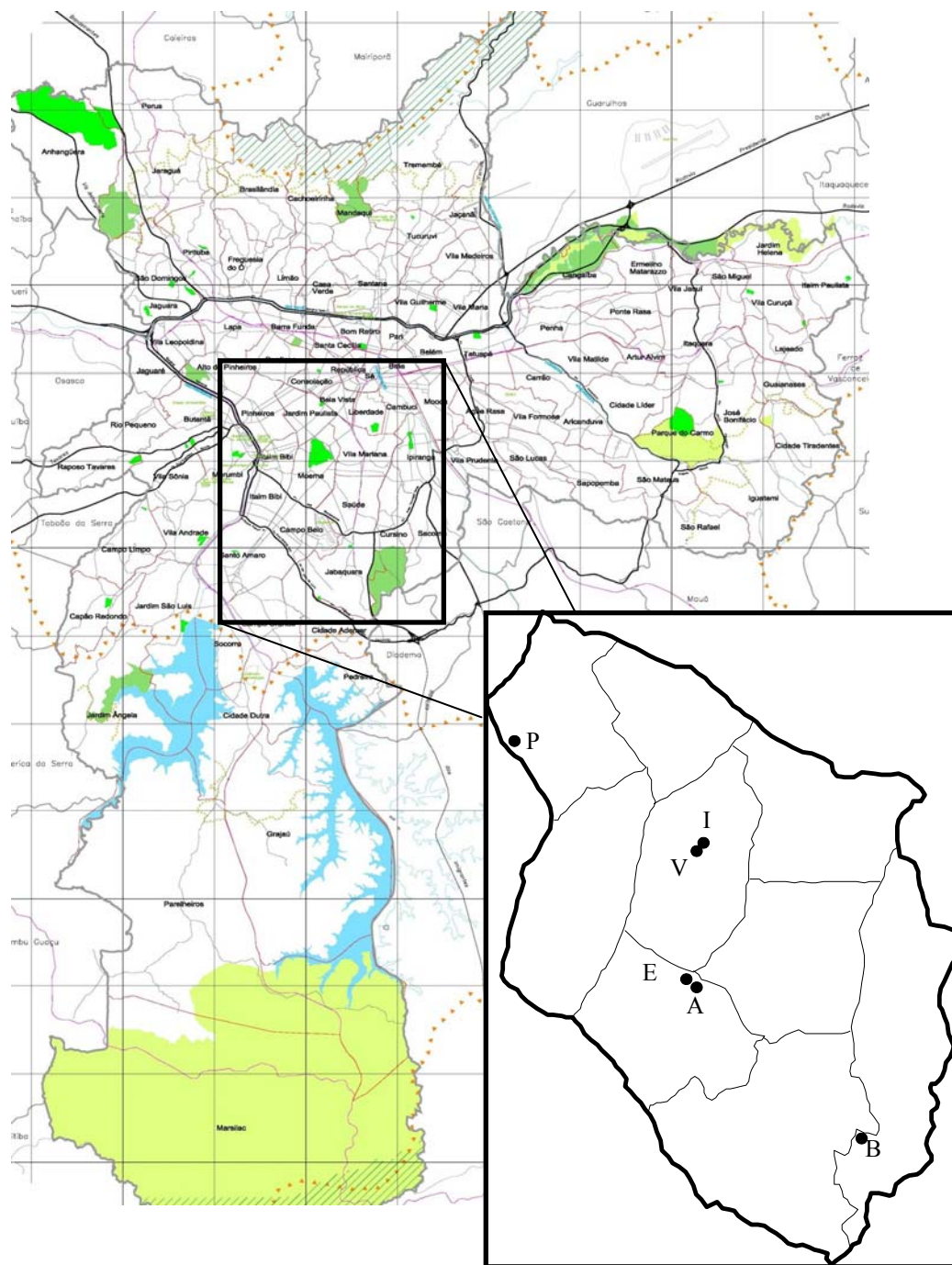


Figura 2.1: Mapa da região de estudo, mostrando os pontos de exposição de plantas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ (adaptado de atlasambiental@prefeitura.sp.gov.br). P: Marginal Pinheiros, I: Parque do Ibirapuera, V: Viveiro Manequinho Lopes, E: Escola Pública, A: Aeroporto de Congonhas e B: Jardim Botânico.

As plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' foram cultivadas, seguindo o protocolo estabelecido pelo VDI (2000), a partir de sementes doadas pela Universidade de Hohenheim/Alemanha, utilizando substrato comercial Plantimax (Eucatex) e vermiculita fina, misturados na proporção de 3:1, respectivamente. A irrigação era mantida por capilaridade e, para nutrição favorável, as plantas receberam solução nutritiva preparada com macronutrientes e micronutrientes, de acordo com Epstein (1975). As mudas permaneceram na casa de vegetação com ar filtrado, durante todo o cultivo até o início de cada exposição (Figura 2.2.A).

Seis vasos com mudas de *N. tabacum* foram expostos ao ar ambiente de cada ponto de exposição, sobre suportes (Figura 2.2.B) construídos com base em modelo proposto por Arndt & Schweizer (1991), ao mesmo tempo em que seis vasos foram mantidos no ambiente de referência. As plantas permaneceram expostas por 14 dias, conforme protocolo estabelecido em VDI (2000), quando foram substituídas por novos lotes de plantas e levadas para o laboratório para análise visual de danos foliares no mesmo dia de retirada. A porcentagem de área das 4^a, 5^a e 6^a folhas das plantas de *N. tabacum* (Figura 2.2.C) com danos típicos induzidos por ozônio foi estimada visualmente, em classes de 5 em 5 %.

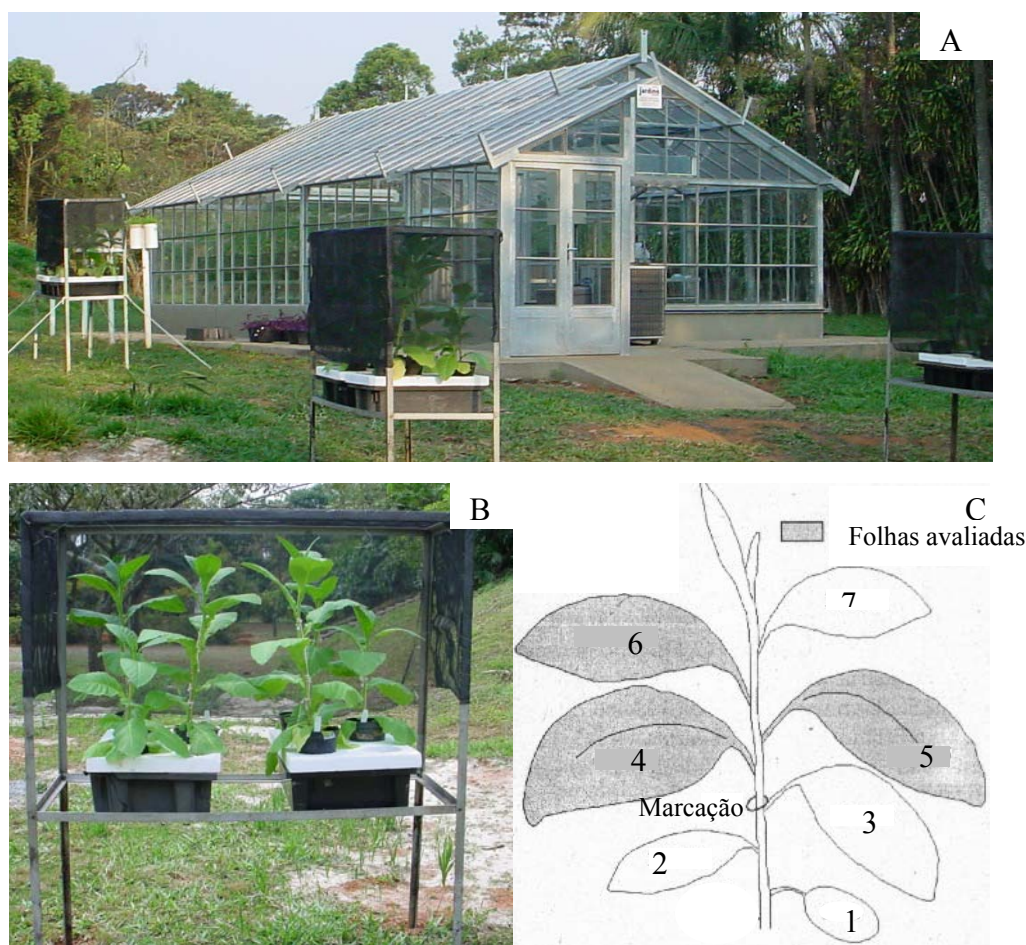


Figura 2.2: (A) Foto da casa de vegetação com ar filtrado, (B) foto do suporte utilizado para exposição das plantas e (C) esquema da planta de *N. tabacum*, com indicação das folhas avaliadas (adaptado de VDI 2003).

Diferenças na porcentagem de área foliar afetada por necroses ao longo das exposições realizadas no período de estudo, em cada local, foram localizadas por meio de análise de variância (One Way ANOVA) e teste de comparação múltipla (Student-Newman-Keuls). Mapas de distribuição da porcentagem de área foliar afetada por necroses foliares, na região da cidade de São Paulo abrangida pelo estudo (destacada na Figura 2.1) e nas diferentes estações do ano, foram desenhados com auxílio do programa *Surfer* versão 8. Análises de regressão foram

aplicadas para estabelecer a relação entre porcentagem de área foliar afetada por necroses e concentrações atmosféricas de ozônio fornecidas pela CETESB. Análise de componentes principais foi realizada para evidenciar quais fatores abióticos foram mais importantes e responsáveis pela variabilidade total dos dados. Estas duas últimas foram realizadas com dados provenientes do Parque do Ibirapuera, onde a CETESB mantém uma estação de monitoramento de poluentes e de variáveis meteorológicas.

Além disso, foram realizados cálculos sugeridos pela rede europeia de biomonitoramento (www.eurobionet.com, Klumpp *et al.* 2002), com os quais é possível classificar as áreas de estudo quanto aos níveis de contaminação por ozônio. Para estabelecimento dessas classes de contaminação atmosférica (Tabela 2.1), utilizaram-se médias de área foliar danificada e respectivos desvios padrões, obtidos durante o experimento.

Tabela 2.1. Níveis de contaminação atmosférica por O₃, estabelecidos com base em classes de porcentagem de área foliar afetada por necroses, em plantas de *N. tabacum* ‘Bel W3’ expostas nos diferentes locais da cidade de São Paulo.

Nível de contaminação atmosférica	Classes	Porcentagem de danos foliares
Baixo	1	dano foliar ≤ 10
Médio	2	$10 < \text{dano foliar} < 25$
Alto	3	$25 < \text{dano foliar} < 40$
Muito alto	4	dano foliar ≥ 40

Resultados

Os perfis da concentração dos poluentes aéreos monitorados no Parque do Ibirapuera e na Escola Pública foram bastante discrepantes (Figura 2.3). O monitoramento mostrou que a estação sediada na Escola, em Campo Belo, foi fortemente impactada por poluentes primários emitidos por fontes antrópicas, como material particulado inalável (PM_{10}), dióxido de nitrogênio (NO_2) e, principalmente, monóxido de nitrogênio (NO), entre os meses de julho e setembro de 2003. Ressalta-se que o ozônio não foi monitorado nesse local pela CETESB devido aos baixos valores registrados em anos anteriores (aproximadamente 5 ppb). Já a estação instalada no Pq. Ibirapuera, em Moema, apresentou baixos níveis desses poluentes primários, porém a concentração de O_3 foi bastante elevada, superando o nível de atenção (80 ppb.h^{-1}) durante todo o período de exposição, exceto em junho de 2003. As maiores concentrações ocorreram, principalmente, nos meses de setembro, outubro e novembro de 2002 e em março e outubro de 2003.

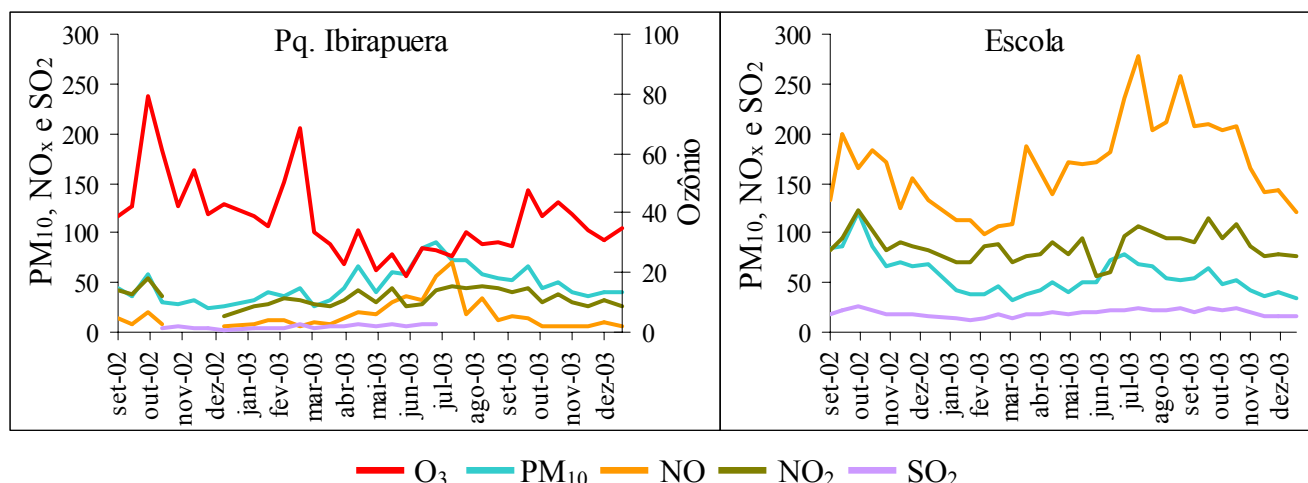


Figura 2.3: Concentrações médias mensais dos poluentes (ppb) monitorados nas estações do Parque do Ibirapuera e da Escola Pública, no período em que foram realizadas as exposições das plantas de *N. tabacum* 'Bel W3'.

As plantas mantidas na situação de referência não apresentaram danos foliares durante todo o período de exposição. Com relação às plantas expostas *in situ*, o aparecimento de danos nas folhas de tabaco ocorreu em todos os sítios, sendo que a maior porcentagem de área afetada por necroses foi freqüentemente observada no Jardim Botânico (B) e, em seguida, no Viveiro Manequinho Lopes (V), Parque do Ibirapuera (I), Aeroporto de Congonhas (A), Marginal Pinheiros (P) e Escola Pública (E) (Figura 2.4). A partir desses resultados, foi possível separar as áreas de estudo em dois blocos, quanto ao nível de contaminação atmosférica por ozônio. Enquanto nos locais B, V e I, áreas mais sujeitas a ação do ozônio, as plantas indicaram, em muitas exposições, níveis de contaminação alto (classe 3) a muito alto (classe 4) (Figura 2.4.A), já nas áreas menos sujeitas ao ozônio (A, E e P), as plantas foram menos danificadas, indicando nível baixo (classe 1) a médio (classe 2) de contaminação por ozônio (Figura 2.4.B). Nesses últimos locais, verificou-se nível médio de contaminação em poucas exposições.

Além disso, é possível verificar que houve grande variação na intensidade de danos foliares ao longo das exposições em cada local, sendo que, em geral, as maiores porcentagens de necroses foliares foram observadas nos meses de fevereiro a abril de 2003 (Figura 2.4). No Parque do Ibirapuera, as maiores porcentagens de injúrias foliares ocorreram nos meses de novembro e dezembro de 2002 e de fevereiro e março de 2003, no Viveiro Manequinho Lopes, as plantas foram mais afetadas nos meses de fevereiro a abril de 2003 e no Jardim Botânico, nos meses de outubro a dezembro de 2002 e em março e abril de 2003. Já nas áreas onde geralmente os níveis de O_3 são baixos, as plantas expostas na Escola e no Aeroporto de Congonhas, apresentaram mais danos foliares entre fevereiro a junho de 2003 e, ainda em outubro de 2003 no segundo local. Em Pinheiros, os maiores valores foram obtidos nos meses de outubro de 2002 e de maio a junho de 2003.

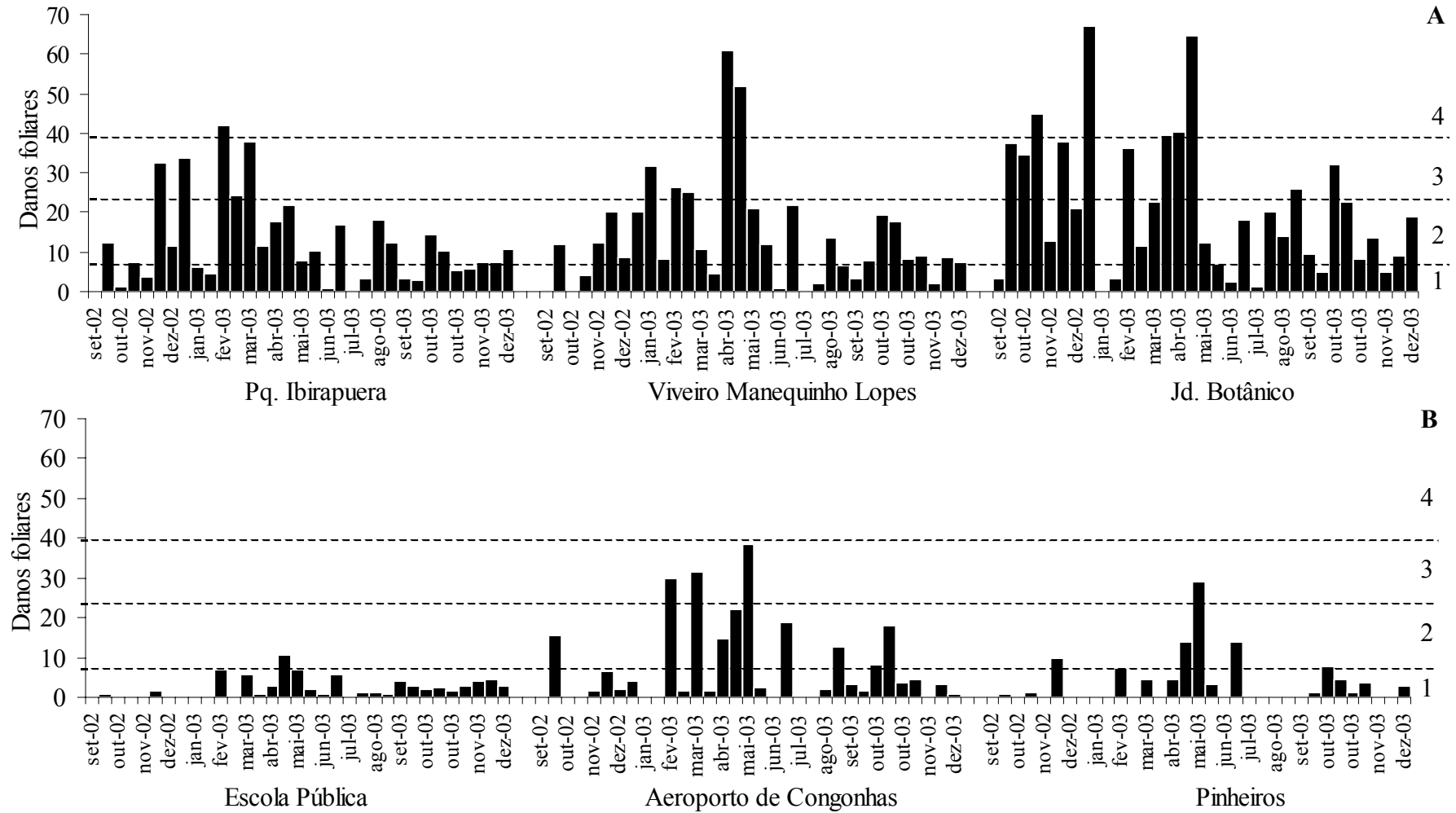


Figura 2.4: Média de área foliar afetada por necroses (%), nas 33 exposições de plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' realizadas no período de setembro/02 a dezembro/03.

Os mapas de distribuição dos valores de porcentagem de danos foliares indicam que nos meses de primavera de 2002 (Figura 2.5.B), e verão e outono de 2003 (Figuras 2.5.C e D), as plantas foram mais danificadas. Em todo o período de exposição, observa-se um gradiente de aumento de danos foliares da região mais central da cidade de São Paulo estudada (Escola Pública-E e Aeroporto de Congonhas-A) para a periferia onde estão situados os locais da região de Moema (V e I) e o Jardim Botânico-B (Figura 2.5). Além disso, comparando a primavera dos dois anos de estudo, observa-se que a porcentagem de danos foliares foi muito mais intensa no primeiro ano.

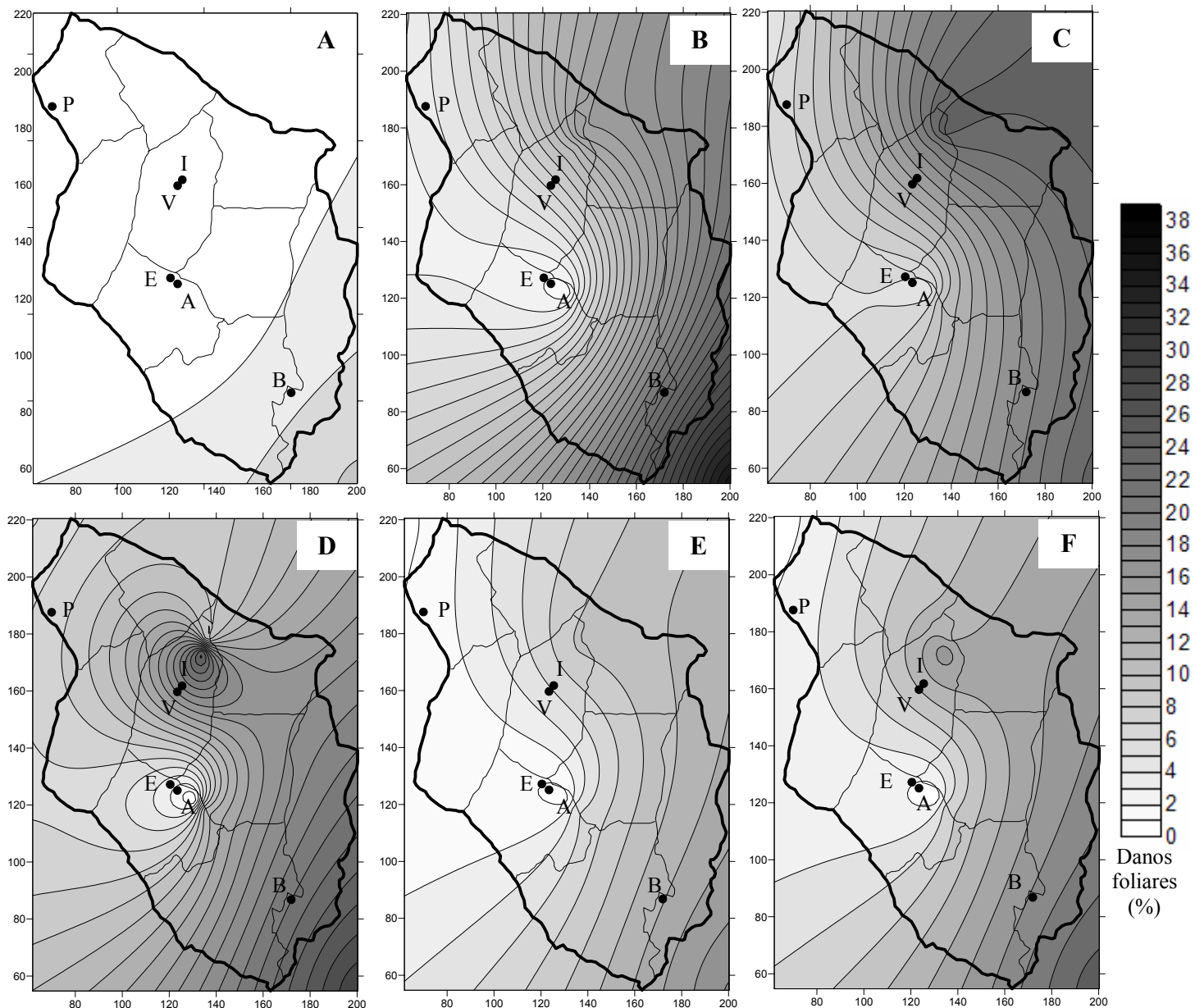


Figura 2.5: Mapas de distribuição da porcentagem de danos foliares apresentadas por plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas nos seis locais de exposição (Parque Ibirapuera-I, Viveiro Manequinho Lopes-V, Jardim Botânico-B, Escola Pública-E, Aeroporto de Congonhas-A e Marginal Pinheiros-P) durante o inverno de 2002 (A), primavera de 2002 (B), verão de 2003 (C), outono de 2003 (D), inverno de 2003 (E) e primavera de 2003 (F).

Ao realizar análise de regressão com dados provenientes do Parque do Ibirapuera, verificou-se que não foi encontrada relação linear significativa. A curva que melhor se ajustou

a esse modelo foi a polinomial de grau 2 (Figura 2.6). Entretanto, apenas quando considerada a concentração de O₃ entre 8 e 20 horas, houve relação significativa, porém, apenas 25 % da variação de danos foliares pôde ser explicada pela variação da concentração de O₃.

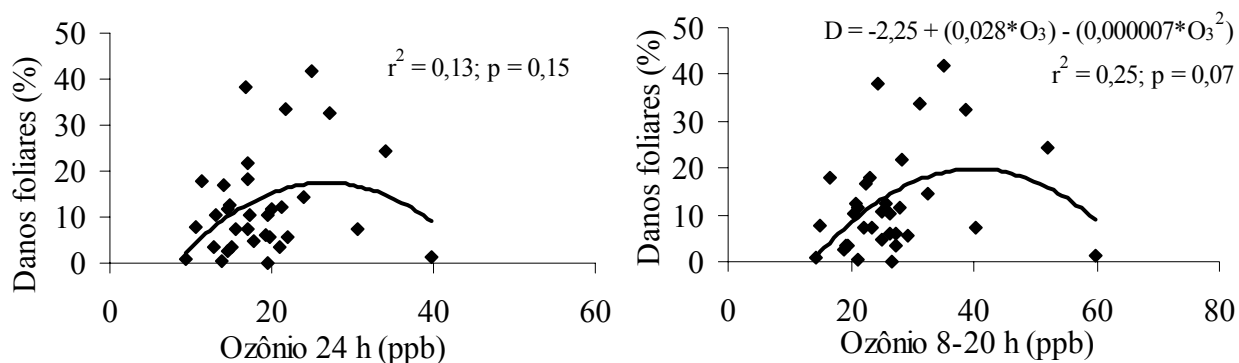


Figura 2.6: Regressão polinomial entre danos foliares em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' e as concentrações médias de ozônio no ar em cada exposição, obtidos no Pq. Ibirapuera, no período de setembro/2002 a dezembro/2003. Concentrações médias de O₃ baseadas nas medições ao longo das 24 h.dia⁻¹ (A) e para o período diário das 8-20 h (B).

A análise de componentes principais explicou 83,6 % da variação total dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (Figura 2.7 e Tabela 2.2). As principais variáveis que contribuíram para a construção do gráfico foram os valores de NO, danos (D), e radiação (R). Verifica-se que os danos foliares não estão estritamente relacionados com concentração de O₃, mas também apresenta relação com variáveis climáticas, como temperatura e radiação. Além disso, o eixo 1 está indicando um gradiente da intensidade temporal de danos foliares, sendo que, de modo geral, as unidades amostrais da primavera e verão estão associadas ao lado positivo do eixo enquanto que as unidades amostrais do outono e, principalmente, inverno, estão relacionadas com o lado negativo deste eixo.

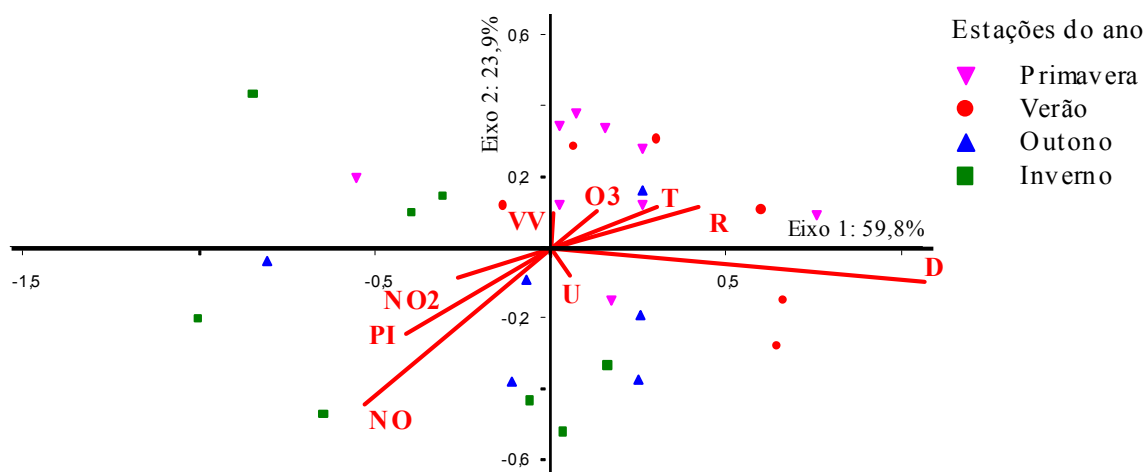


Figura 2.7: Análise de componentes principais entre as variáveis abióticas e bióticas medidas no Parque do Ibirapuera, no período de setembro/2002 a dezembro/2003: velocidade do vento (VV), radiação (R), temperatura (T), umidade relativa (U), ozônio (O_3), partículas inaláveis (PI), monóxido de nitrogênio (NO), dióxido de nitrogênio (NO_2) e porcentagem de danos foliares (D).

Tabela 2.2: Correlação das variáveis abióticas (climáticas e poluição) e biótica (danos foliares) com os componentes principais, e variabilidade explicada (%) ($n = 29$).

Eixo	VV	R	T	U	O_3	PI	NO	NO_2	D	%
1	0,08	0,59	0,50	0,21	0,33	-0,59	-0,66	-0,47	0,94	59,8
2	0,35	0,38	0,38	-0,32	0,37	-0,55	-0,74	-0,33	-0,35	23,9

Discussão

Geralmente, nos meses de primavera e verão, a concentração de O_3 é mais elevada do que no outono e inverno (CETESB 2006), fato que ocorreu no Parque do Ibirapuera, durante o período de experimentação deste estudo (Figura 2.3). Porém, observou-se que as concentrações de O_3 na primavera (outubro a dezembro) de 2002 foram claramente mais altas do que nos mesmos meses em 2003. Esse fato pode ser atribuído à provável maior

pluviosidade registrada nesse período em relação ao anterior (CETESB 2006). Segundo Corson (1996), quanto maior a precipitação pluviométrica, menor a concentração de O₃ na atmosfera, em função de sua remoção e de seus precursores pela deposição úmida. Essa diferença entre os anos de estudo podem ter sido causadas, também, por outras alterações meteorológicas que controlam a formação do O₃, como a intensidade luminosa e a umidade relativa e pela dispersão do mesmo, regida principalmente pelas condições de vento. Além disso, nos meses de dezembro e janeiro, pode ocorrer uma redução da concentração de O₃, pois, mesmo sendo os meses mais quentes, há redução na intensidade luminosa devido ao aumento da nebulosidade (CETESB 2006). Dados fornecidos pela CETESB indicam que esses fatores meteorológicos foram bastante distintos em São Paulo entre os dois anos em questão, explicando as diferenças nos níveis de ozônio em 2002 e 2003.

No geral, a variação da concentração de O₃, no espaço e no tempo, foi acompanhada pela variação na intensidade de danos foliares, indicando que *N. tabacum* 'Bel W3' foi capaz de discriminar áreas e períodos com diferentes níveis de ozônio, conforme foi mostrado nas Figuras 2.4 e 2.5.

Destaca-se que, na primavera de 2002, a porcentagem de danos foliares nas plantas do Pq. Ibirapuera foi mais intensa do que na de 2003, acompanhando a mencionada variação na concentração de ozônio (média de 50 ppb em 2002 e de 39 ppb em 2003) devido às diferenças nas condições meteorológicas. Tal variação na intensidade de necroses de um ano para outro também foi observada nos demais locais monitorados, podendo-se presumir, assim, menor contaminação por O₃ nesses locais em 2003. Koppel & Sild (1995) e Yuska *et al.* (2003) igualmente verificaram diferença na porcentagem de danos foliares quando compararam as respostas de plantas expostas em dois anos consecutivos, a qual foi atribuída a variações climáticas entre os períodos de estudo.

Diante dessa paridade qualitativa entre danos e níveis de O₃, é possível explorar de modo mais abrangente a classificação da contaminação atmosférica proposta pela rede européia de biomonitoramento e aplicada no presente estudo, estimando-se qualitativamente a faixa de concentração de O₃ na atmosfera, tendo como ponto de comparação os resultados obtidos no Pq. Ibirapuera, onde houve monitoramento do O₃. Pode-se supor que até o nível médio de contaminação por O₃ (classe 2), que aconteceu em muitas amostragens realizadas nos locais de alta emissão veicular (Escola, Aeroporto e Pinheiros), as concentrações médias de O₃ em cada exposição não tenham sido superiores a 40 ppb. No Aeroporto de Congonhas, em alguns momentos, no Viveiro Manequinho Lopes e no Jd. Botânico, com maior frequência, atingiu-se o nível alto de contaminação (classe 3), indicando que a atmosfera continha, em média por exposição, entre 40 e 50 ppb de O₃. O nível muito alto (classe 4) foi atingido em poucas exposições realizadas no Jd. Botânico e no Viveiro Manequinho Lopes, quando as concentrações médias de O₃ devem ter sido superiores a 50 ppb.

Observa-se, portanto, que *N. tabacum* ‘Bel W3’ mostrou-se adequada para biomonitoramento qualitativo de ozônio em São Paulo, tornando possível ampliar a área de monitoramento da qualidade do ar em toda a cidade, tendo como principais vantagens, o baixo custo e a possibilidade de estudar o efeito da poluição sobre os organismos vivos. Da mesma forma, Klumpp *et al.* (2006) que colocaram em prática o programa de biomonitoramento EuroBionet (www.eurobionet.com), no qual utilizaram, entre outras plantas bioindicadoras a mesma cultivar de tabaco, mostraram resultado similar para o continente europeu. Naquele estudo, demonstrou-se haver um crescente impacto de O₃, das regiões ao norte da Europa para as regiões centrais e sul do continente, acompanhando um gradiente de contaminação atmosférica por O₃, marcado em larga escala geográfica especialmente por fatores meteorológicos, como disponibilidade de radiação solar e temperatura do ar. Em cidades como Sheffield, Edinburgh e Copenhagen, situadas ao norte,

foi freqüente a ocorrência de graus leves a moderados de injúria foliar. Em Barcelona e Lyon, com maior disponibilidade de luz solar e estabilidade atmosférica, tais observações foram raras, predominando, nessas cidades, efeitos fortes a muito fortes. A grosso modo, poder-se-ia dizer que o grau de contaminação atmosférica por O₃, nos locais situados nos bairros de Moema e Jabaquara, em São Paulo, seria equivalente ao observado em Barcelona e Lyon e o observado nos bairros de Campo Belo e Pinheiros, ao verificado nas cidades ao norte da Europa.

Enquanto no estudo de Klumpp *et al.* (2006), *N. tabacum* 'Bel W3' pareceu ser boa marcadora da contaminação atmosférica por ozônio em larga escala, condicionada por fatores meteorológicos ao longo do gradiente latitudinal analisado, no presente estudo, essa planta bioindicadora foi especialmente eficiente como marcadora do processo fotoquímico em escala local, destacando a influência das fontes de emissão de seus precursores na formação/degradação do ozônio. Os dados de danos foliares demonstram que as plantas mantidas nas áreas próximas às fontes de emissão apresentaram os menores valores de porcentagens, enquanto que as plantas mantidas em áreas mais afastadas apresentaram os maiores valores (Figuras 2.4 e 2.5). Essa característica seguiu o padrão apresentado pela dinâmica de formação e consumo do ozônio em áreas com alto tráfego veicular, onde há grande aumento da concentração de NO, e nesse caso o ozônio e outros oxidantes fotoquímicos reagem rapidamente com esse poluente, sendo consumido (Krupa & Manning 1988, Souza 1998, Sillman 1999). Já em áreas afastadas das fontes, pode haver o aumento dos níveis de precursores do O₃, como os hidrocarbonetos, que promovem inúmeras reações radicalares, levando a redução do NO, deslocando o sentido das reações para a formação de ozônio (Jenkin & Clemitshaw 2000). Nos locais de exposição em Moema e, principalmente, no Jabaquara, há áreas verdes, que são fontes de hidrocarbonetos muitas vezes mais reativos que os emitidos por fontes antrópicas, o que contribui fortemente para o acúmulo do ozônio

na atmosfera dessas regiões. Esse fato pode explicar a ocorrência de necroses foliares mais expressivas nas plantas lá expostas.

Essa distribuição espacial dos danos foliares está de acordo com os obtidos por Klumpp *et al.* (1994) e Domingos *et al.* (1998), que aplicaram *N. tabacum* 'Bel W3' para biomonitoramento do ozônio na região do complexo industrial de Cubatão, São Paulo. Esses autores também observaram que quanto mais distante das fontes de emissão, maior era a porcentagem de danos foliares.

Entretanto, no presente estudo, ocorreram picos de danos foliares, especialmente nas plantas mantidas no Pq. Ibirapuera nos meses de primavera e outono (Figura 2.4.A), quando as concentrações de O₃ não estavam altas e vice-versa, o que pode ser uma das causas da baixa explicabilidade do modelo encontrado entre danos foliares e concentrações de ozônio (Figura 2.6). O uso de *N. tabacum* 'Bel W3' para biomonitoramento quantitativo de ozônio, ou seja, para dimensionar as concentrações desse poluente na atmosfera com base na intensidade de danos foliares, é questionável para a cidade de São Paulo.

Isto parece não ser possível para outras localidades também. No programa de biomonitoramento EuroBionet (www.eurobionet.com, Klumpp *et al.* 2006), nenhuma relação linear significativa foi encontrada entre intensidade de danos foliares e doses acumuladas de ozônio acima de 20 ppb (AOT20), quando todo o conjunto de dados, gerados nas diferentes cidades, foi considerado. Porém, se os dados gerados em cada cidade forem tratados individualmente, surgem amplas diferenças locais. In Düsseldorf, por exemplo, AOT20 e danos foliares associaram-se fortemente de modo linear, mas nenhuma relação significativa foi encontrada entre dados de ambas as variáveis provenientes de Lyon. Além disso, esses autores afirmam que a cultivar Bel W3 do tabaco, por ser altamente sensível ao O₃, possui uso restrito nas áreas com alto nível desse poluente. Ball *et al.* (1998), Peñuelas *et al.* (1999) e

Ribas e Peñuelas (2003) igualmente verificaram que apenas uma pequena parte dos danos foliares puderam ser explicados pela concentração de O₃ troposférico.

Na verdade, conforme comentam Yuska *et al.* (2003), o efeito do ozônio na planta depende de muitos fatores e não somente da concentração deste no ambiente. No caso do presente estudo, a análise de componentes principais (Figura 2.7, Tabela 2.2) indicou que não somente houve fraca relação entre concentração de ozônio e resposta bioindicadora, como também, que os danos foliares estiveram relacionados com variáveis ambientais envolvidas no processo do *smog* fotoquímico (positivamente com radiação e temperatura e negativamente com NO₂). Isto sugere que outros produtos do *smog* fotoquímico, além do ozônio, e/ou alguns fatores climáticos poderiam estar contribuindo para o aparecimento das necroses nas folhas de tabaco, e, devido a isso, a porcentagem de danos foliares não foi estritamente relacionada com as concentrações de ozônio. Segundo Ball *et al.* (1998), Krupa *et al.* (1993), Muné-Bosh & Alegre (2002), Davison *et al.* (2003), Grünhage & Jäger (2003) e Klumpp *et al.* (2006) fatores climáticos podem interferir na resposta da planta bioindicadora, pois são fatores que alteram a condutância estomática e, como consequência, modificam a entrada do poluente na planta.

Conclui-se, portanto, que a aplicação de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ na cidade de São Paulo é eficiente para o biomonitoramento qualitativo, fazendo dessa cultivar uma importante ferramenta para estudos de qualidade do ar, porém não apresenta potencial para quantificar os níveis de ozônio.

Referências bibliográficas

- Antonielli, M., Pasqualini, S., Ederli, L., Batini, P., Moscatello, S. & Loreto, F. 1997. Physiological characteristics of tobacco cultivar with contrasting sensitivity to ozone. *Environmental and Experimental Botany* 38: 271-277.

- Arndt, U. & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In Biological monitoring. Signals from the environment, Ellenberg et al. (eds.). Vieweg, Eschborn. pp. 199-298.
- Arndt, U., Fomin, A. & Lorenz, S.** 1996. Bio-indikation. Neue entwicklungen Nomenclatur synökologische aspekte. Beiträge und Diskussion. Hohenheimer Workshop zur Bioindikation, Verlag Günter Heimbach, Ostfildern.
- Ball, G.R., Benton, J., Palmer-Brown, D., Fuhrer, J., Skärby, L., Gimeno, B.S. & Millis, G.** 1998. Identifying factors which modify the effects of ambient ozone on white clover (*Trifolium repens*) in Europe. Environmental Pollution 103: 7-16.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants, B.B. Buchanan, W. Gruissen, R.L. Jones (eds.). American Society of Plant Physiologists (USA), New York. pp. 1158-1203.
- CETESB.** 1997. Estudo comparativo de ozônio das estações Ibirapuera e Congonhas.
- CETESB.** 2006. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2005. Série Relatórios / Secretaria do Estado do Meio Ambiente.
- Corson, W.H.** 1996. Ar, atmosfera e clima. In: Manual global de ecologia: o que você pode fazer a respeito da crise do meio ambiente. Editora Augustus. São Paulo. pp. 219-242.
- Davison, A.W., Neufeldb, H.S., Chappelkac, A.H., Wolffa, K. & Finkelsteind, P.L.** 2003. Interpreting spatial variation in ozone symptoms shown by cutleaf cone flower, *Rudbeckia laciniata* L. Environmental Pollution 125: 61-70.
- De Temmerman, L., Bell, J.N.B., Garrec, J.P., Klumpp, A., Krause, G.H.M. & Tonneijck, A.E.G.** 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: Proceedings of Eurobionet 2002 – Urban Air Pollution, Bioindication

- and Environmental Awareness, A. Klumpp, W. Ansel & G. Klumpp (eds.). pp. 337-373.
- Domingos, M., Klumpp A. & Klumpp G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência & Cultura* 50: 230-236.
- Domingos, M., Bourotte, C., Klumpp, A., Klumpp, G. & Forti, M.C.** 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo*, D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (eds.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo. pp. 1-351.
- Embersson, L.D., Ashmore, M.R., Murray, F., Kuylensstierna, J.C.I., Percy, K.E., Izuta, T., Zheng, Y., Shimizu, H., Sheu, B.H., Liu, C.P., Agrawal, M., Wahid, A., Abdel-Latif, N.M., van Tienhoven, M., de Bauer, L.I. & Domingos, M.** 2001. Impacts of air pollution on vegetation in developing countries. *Water, Air, and Soil Pollution* 130: 107-118.
- 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, pp. 1-341.
- Finnan, J.M., Jones, M.B. & Burke, J.I.** 1996. A time-concentration study on the effects of ozone on spring wheat (*Triticum aestivum* L.). 1: Effects on yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 57: 159-167.
- Grünhage, L & Jäger, H-J.** 2003. From critical levels to critical loads for O₃: a discussion of a new experimental and modeling approach for establishing flux-response relationships for agricultural crops and native plant species. *Environmental Pollution* 125: 99-110.
- Heggstad, 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.

- Jenkin, M.E. & Clemitshaw, K.C.** 2000. Ozone and other secondary photochemical pollutants: chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer. *Atmospheric Environment* 34: 2499-2527.
- Klumpp, A., Klumpp, G. & Domingos, M.** 1994. Plants as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85: 109-116.
- Klumpp, A., Domingos, M. & Pignata, M.L.** 1999. Air pollution and vegetation damage in South America: state of knowledge and perspectives. In: *Environmental pollution and plants responses*, S.B. Agrawal & M. Agrawal (eds.). Lewis Publishers, Boca Raton. pp. 111-136.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Belluzzo, N., Calatayud, V., Chaplin, N., Garrec, J.P., Gutsche, H.J., Hayes, M., Hentze, H.W., Kambezidi, H., Laurent, O., Peñuelas, J., Rasmussen, S., Ribas, A., Ro-Poulsen, H., Rossi, S., Sanz, M. J., Shang, H., Sifakis, N. & Vergne, P.** 2002. EuroBionet: A Pan-European Biomonitoring Network for Urban Air Quality Assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 9: 199-203.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas, À., 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 (38): 7437-7448.
- Koppel, A. & Sild, E.** 1995. Bioindication of ozone in Estonia by using the tobacco variety Bel W3. *Water, Air, and Soil Pollution* 85: 1515-1519.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.

- Krupa, S. V., Manning, W. J. & Nosal, M.** 1993. Use of tobacco cultivars as biological indicators of ambient ozone pollution: an analysis of exposure-response relationships. *Environmental Pollution* 81: 137-148.
- Mage, D., Ozolins, G., Peterson, P., Webster, A., Orthofer, R., Vandeweerd, V. & Gwynne, M.** 1995. Urban air pollution in megacities of the world. *Pergamon* 30 (5): 681-686.
- Massambani, O. & Andrade, F.** 1994. Seasonal behavior of tropospheric ozone in the São Paulo (Brazil) metropolitan area. *Atmospheric Environment* 28 (19): 3165-3169.
- Miguel, A.H.** 1992. Poluição atmosférica urbana no Brasil: uma visão geral. *Química nova* 15 (2): 138-142.
- Molina, M.J. & Molina, L.T.** 2004. Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association* 54: 644-680.
- Mulgrew, A. & Williams, P.** 2000. Biomonitoring of air quality using plants. WHO Collaborating Centre for Air Quality Management and Air Pollution Control/Federal Environmental Agency-Germany, Report 10, Berlin.
- Munné-Bosch, S. & Alegre, L.** 2002. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* 214: 608-615.
- Nguyen, H.T-H., Takenaka, N., Bandow, H., Maeda, Y., Oliva, S.T.de, Botelho, M.M.F. & Tavares, T.M.** 2001. Atmospheric alcohols and aldehydes concentrations measured in Osaka, Japan and in São Paulo, Brazil. *Atmospheric Environment* 35: 3075-3083.
- Oliveira, A.P., Bornstein, R.D. & Soares, J.** 2003. Annual and diurnal wind patterns in the city of São Paulo. *Water, Air and Soil Pollution* 3: 3-15.

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

2003. Response of native plants of Northeastern United States and Southern Spain to ozone exposures; determining exposure/response relationships. *Environmental Pollution* 125: 31-40.

Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B.S. & Filella, I. 1999. Dependence of ozone

biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (N.E. Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* 56: 221-224.

Ribas, A. & Peñuelas, J. 2003. Biomonitoring of tropospheric ozone phytotoxicity in rural Catalonia. *Atmospheric Environment* 37: 63-71.

Sawyer, F.R., Harley, R.A., Cadle, S.H., Norbeck, J.M. Slott, R. & Bravo, H.A. 2000.

Mobile sources critical review: 1998 NARSTO assessment. *Atmospheric Environment* 34: 2161-2181.

Sillman, S. 1999. The relation between ozone, NO_x and hydrocarbons in urban and polluted rural environments. *Atmospheric Environment* 33: 1821-1845.

Souza, S.R. 1998. Ácidos carboxílicos na atmosfera de São Paulo. Um estudo analítico e ambiental. Tese de doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 1999. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/1. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1^a, Beuth, Berlin.

VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 2000. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Determination of the phytotoxic effects of ozone and other fotooxidants. Standardised exposure of tobacco, VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1^a, Beuth-Verl., Berlin.

- 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. 1^a, Beuth, Berlin.
- Vergé, X., Chapuis, A. & Delpoux, M.** 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). Environmental Pollution 85: 337-349.
- Yuska, D.E., Skelly, J.M., Ferdinand, J.A., Stevenson, R.E., Savage, J.E., Mulikd, J.D. & Hinesd, A.** 2003. Use of bioindicators and passive sampling devices to evaluate ambient ozone concentrations in north central Pennsylvania. Environmental Pollution 125: 71-80.

Capítulo 3

Exposição de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' a doses controladas de O₃ e H₂O₂ em câmaras de fumigação: avaliação de danos foliares e fluorescência da clorofila *a*

Resumo

O ozônio (O₃) é uma das substâncias química mais estudadas na troposfera por ser um poluente aéreo com alto grau de toxicidade e, principalmente, por apresentar-se em elevadas concentrações. Entretanto, durante o processo de sua formação (*smog* fotoquímico) são gerados diversos outros oxidantes. Entre eles está o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é uma das espécies ativas de oxigênio com grande importância fisiológica, porém, também apresenta potencial para danificar moléculas vitais. No presente estudo objetivou-se analisar experimentalmente se O₃ e H₂O₂, em diferentes níveis, podem promover alterações fisiológicas e necroses foliares em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3', assim como estabelecer o modelo que melhor ajusta a relação entre as respostas biológicas estudadas e a concentração desses poluentes. As plantas foram cultivadas de forma padronizada e expostas ao O₃, H₂O₂ e a mistura destes, em câmaras de fumigação, por 2 e 4 dias (3 h.dia⁻¹). Ao final dos experimentos, foram analisadas a porcentagem de necroses foliares e a razão F_v:F_m, considerada como indicadora de alteração no processo fotossintético. As necroses foliares observadas nos três tratamentos apresentaram as mesmas características, porém com maior intensidade quando foi aplicado o O₃ individualmente, seguido pela mistura de ambos os fotooxidantes e pelo H₂O₂. Porcentagem máxima de necroses foliares foi obtida em plantas submetidas a 40 ppb de O₃ por 4 dias. Concentrações superiores a esta não promoveram aumento de área foliar afetada pelas necroses. A razão F_v:F_m foi significativamente reduzida nos três experimentos, especialmente quando o O₃ esteve envolvido, indicando distúrbios no

processo fotossintético. Além disso, foi verificado que a mistura de O₃ com H₂O₂ provoca efeito antagônico sobre a planta, diminuindo os efeitos maléficos do O₃.

Palavras-chave: Ozônio, peróxido de hidrogênio, fumigação, dano visual, fluorescência da clorofila *a*.

Introdução

Os efeitos do ozônio (O₃) sobre organismos vivos têm sido uma preocupação mundial na atualidade, devido o aumento crescente de suas concentrações na atmosfera, em consequência do aumento das emissões de seus precursores por atividades antrópicas (Emberson *et al.* 2001, Vingarzan 2004). Esses efeitos geralmente são pronunciados, uma vez que o O₃ é altamente tóxico (Krupa & Manning 1988, Evans *et al.* 1996, Rao & Davis 1999, Saitanis *et al.* 2001, Grünhage & Jäger 2003), causando grande prejuízo econômico devido à perda de produtividade de culturas agrícolas (Fumagalli *et al.* 2001), danos à vegetação nativa (Emberson *et al.* 2001, Domingos *et al.* 2002) e doenças nos seres humanos (Holtzman *et al.* 1983, Kehrl *et al.* 1987, Schelegle *et al.* 1989, Schelegle *et al.* 1991, Muggli 1993, Saldiva *et al.* 1994, Saldiva *et al.* 1995, Borja-Aburto *et al.* 1997, Bouthillier *et al.* 1998).

Entretanto, durante o processo de formação do O₃, denominado *smog* fotoquímico, são formados diversos outros oxidantes, como peróxido de hidrogênio, nitrato de peroxiacetila (PAN), aldeídos e cetonas, potencialmente tão tóxicos quanto o O₃ (Krupa & Manning 1988, Seinfeld 1989, Miguel 1992, Souza 1998, Sillman 1999, Sawyer *et al.* 2000, Manaham 1999). Mas, a ação desses poluentes sobre os organismos, atuando individualmente ou em conjunto com outros oxidantes, embora possível, é pouco conhecida.

Com relação ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sabe-se que é uma das espécies ativas de oxigênio (EAO) mais abundante nos organismos aeróbios e que tem grande importância fisiológica, por ser uma molécula sinalizadora envolvida em uma grande variedade de processos metabólicos (Bienert *et al.* 2006, Wang & Higgins 2006). Entretanto, por ser uma EAO, também apresenta potencial para danificar moléculas vitais, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, danificando o funcionamento celular (Foyer *et al.* 1994, Mudd 1996, Rao & Davis 1999, Bray *et al.* 2000). O H_2O_2 pode, por exemplo, promover danos ao material genético através de diferentes mecanismos (Mancini *et al.* 2006) e aumentar o nível de proteínas solúveis, resultando em aumento da proteção celular (Terry *et al.* 1995). Além disso, é uma das primeiras espécies ativas de oxigênio formada quando o ozônio é absorvido pelas plantas, desencadeando uma cadeia de eventos oxidativos (Fridovich 1987, Halliwell & Gutteridge 1989, Muggli 1993).

Nicotiana tabacum 'Bel W3', por ser muito sensível ao ozônio, mostra perturbações estruturais, fisiológicas e metabólicas, quando já submetida a baixos níveis de contaminação atmosférica por esse poluente. Restrições ao processo da fotossíntese, indicadas por medidas da fluorescência da clorofila *a*, estão entre as evidentes perturbações fisiológicas em plantas dessa cultivar expostas ao O_3 (Loreto *et al.* 2001, Saitanis *et al.* 2001, Buuren *et al.* 2002, Degl'Innocenti *et al.* 2002, Novakoudis *et al.* 2003, Lütz *et al.* 2005). A redução das trocas gasosas devido à diminuição da condutância estomática, com consequente diminuição da entrada de ozônio nas folhas, é igualmente uma perturbação fisiológica comumente observada em plantas expostas ao O_3 (Peñuelas *et al.* 1999, Pasqualini *et al.* 2002, Vergé *et al.* 2002, Manning 2003, Calatayud *et al.* 2004).

É amplamente conhecido, também, que as perturbações às plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas ao ozônio acabam por culminar em morte celular pronunciada e em ocorrência de necroses foliares visíveis a olho nu, as quais vêm sendo amplamente utilizadas em

biomonitoramento qualitativo de riscos aos seres vivos associados ao O₃ (Heggestad 1991, VDI 2003). Conforme foi demonstrado no capítulo anterior, essa cultivar é adequada para tal finalidade também para São Paulo.

Porém, o estabelecimento de programas padronizados de biomonitoramento para indicar quantitativamente o nível de contaminação atmosférica por O₃ somente poderá acontecer se for possível estabelecer uma curva dose x resposta, preferencialmente linear, entre a resposta bioindicadora e concentração de ozônio. Ressalta-se que tais curvas devem ser propostas em escala regional, uma vez que variáveis meteorológicas locais regulam a condutância estomática e, assim, também a absorção de ozônio pela planta. Para proposição destas, devem ser conhecidos, ainda, os efeitos de outros compostos fotoquímicos oxidantes, como o H₂O₂, presentes na atmosfera juntamente com O₃, que podem proporcionar um aumento da área foliar afetada por necroses ou mesmo potencializar ou conter os efeitos do O₃.

Diante dessas considerações, levantou-se a hipótese de que perturbações crescentes e dose-dependentes ao processo fotossintético em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' expostas ao O₃, indicadas por alterações na fluorescência da clorofila *a*, restringem o fluxo deste para o interior da planta, podendo enfraquecer a relação linear esperada entre necroses foliares e concentrações de O₃, como ocorreu na região metropolitana de São Paulo (RMSP), conforme mostrado no capítulo anterior. O efeito de outros compostos oxidantes presentes na atmosfera da RMSP pode, também, interferir nessa relação. No presente estudo, objetivou-se, portanto, analisar experimentalmente se O₃ e H₂O₂, em concentrações crescentes, porém similares às observadas na RMSP, atuando separadamente e combinados entre si, podem promover alterações na fluorescência da clorofila *a*, e danos foliares em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3', assim como estabelecer o modelo que melhor ajusta a relação entre as respostas biológicas estudadas e a concentração desses poluentes.

Material e métodos

As plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' foram cultivadas, seguindo o protocolo estabelecido pelo VDI (2000), a partir de sementes doadas pela Universidade de Hohenheim/Alemanha, utilizando substrato comercial Plantimax (Eucatex) e vermiculita fina, misturados na proporção de 3:1, respectivamente. A irrigação era mantida por capilaridade e, para nutrição favorável, as plantas receberam solução nutritiva preparada com macronutrientes e micronutrientes, de acordo com Epstein (1975). As mudas permaneceram em casa de vegetação com ar filtrado, durante todo o cultivo até o início de cada exposição. Os experimentos eram iniciados quando as plantas apresentavam seis folhas expandidas e, um dia antes de cada experimento, a 3ª folha mais velha era marcada.

O sistema de fumigação (Figura 3.1) é composto por aparato para purificar o ar, misturador dos gases, tubulação, válvulas, ozonizador, controlador de fluxo, câmaras de fumigação e instrumentação para monitoramento de ozônio, temperatura, umidade relativa do ar e radiação.

Os experimentos foram conduzidos em duas câmaras fechadas de 1 m³ cada, revestidas de Teflon e com estrutura de aço inox (Figura 3.1.C). Estas permaneceram no interior de um laboratório, sob iluminação artificial (em média 149 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por 8 horas), utilizando lâmpadas de vapor metálico 400W e de fluorescência 30 W TL05 (Figura 3.1.D), que fornecem intensidade luminosa na faixa de 400-700 nm. Durante a realização dos experimentos, as plantas foram mantidas sob condições climáticas equivalentes ao do ambiente onde o laboratório foi construído, não havendo controle sobre essas variáveis. As médias de temperatura variaram, assim, entre 24 e 29 °C e de umidade relativa entre 63 e 91 % (médias de 27 °C e 77 % respectivamente).



Figura 3.1: Fotos do sistema de fumigação: equipamentos (A e B), câmaras (C) e lâmpadas (D).

Foram realizados 4 experimentos de fumigação com O₃, em concentrações crescentes (20, 40, 60 e 80 ppb por 3 h.dia⁻¹, durante 2 e 4 dias) e 4 com H₂O₂ (1,2; 2,4; 3,6 e 4,8 10⁻³ μmol.L⁻¹, a cada 2 horas, 5 vezes ao dia, durante 2 e 4 dias). Em ambos os casos, apenas ar filtrado foi inserido na câmara controle. Nos experimentos de fumigação com a mistura de O₃ e H₂O₂, os poluentes foram aplicados seguindo a descrição acima, a três proporções distintas:

20 ppb de O_3 e $4,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ de H_2O_2 ; 60 ppb de O_3 e $2,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ de H_2O_2 e 80 ppb de O_3 e $1,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ de H_2O_2 . Essas combinações de concentrações foram escolhidas de acordo com a dinâmica desses poluentes na atmosfera, sendo que quando a concentração de O_3 está alta, a concentração de H_2O_2 tende a ser menor e vice-versa (Seinfeld, 1986). Neste caso, o tratamento controle foi estabelecido apenas com ozônio na mesma concentração utilizada na respectiva mistura. A concentração de O_3 no interior das câmaras foi sempre medida através de um monitor contínuo (Monitor Lab, Ecothec).

O O_3 foi produzido por um equipamento (ozonizador), sendo que, na 1ª câmara de mistura, o ar limpo foi dividido e uma pequena parte deste passava pelo equipamento e o O_3 produzido era homogeneizado como o ar limpo na 2ª câmara de mistura e levado para a câmara de fumigação (Figura 3.2.A). O H_2O_2 foi inserido na câmara por uma tubulação em “T” localizada na entrada da mesma, sendo que, por uma das extremidades, foi introduzido o ar limpo que carregou o H_2O_2 , injetado por uma seringa, à outra extremidade, difundindo lentamente no interior câmara o ar enriquecido com H_2O_2 (Figura 3.2.B).

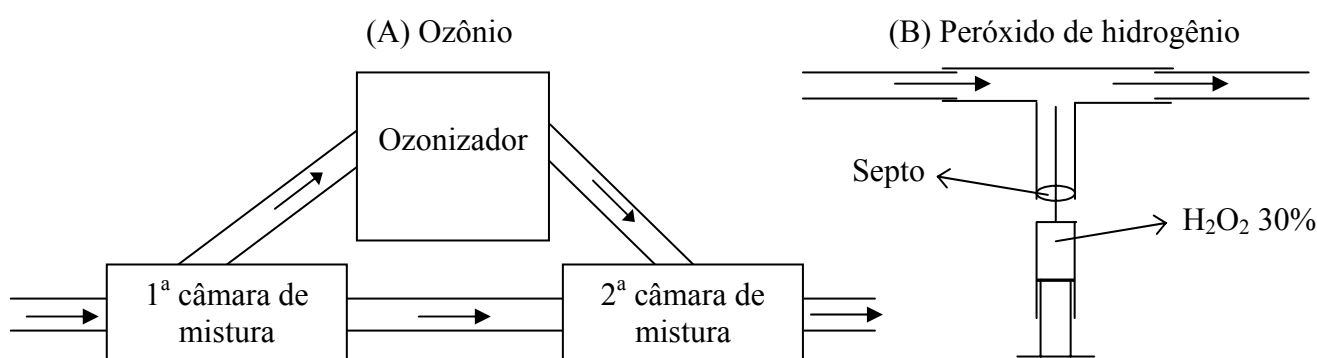


Figura 3.2: Esquemas dos sistemas de introdução de (A) O_3 e (B) H_2O_2 na câmara de fumigação.

Para cada experimento, foram utilizadas seis plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' por câmara, sendo que três plantas eram mantidas por dois dias e três, por quatro dias. Ao final de

cada experimento eram avaliadas, nas folhas 4, 5 e 6 (ver Figura 2.2.C do capítulo anterior), a porcentagem de danos visíveis típicos causados por ozônio em classes de 5 % (VDI, 2000) e a fluorescência da clorofila *a* ($F_v:F_m$) utilizando o fluorômetro PAM 2000. Para essa última medida, porções das folhas eram adaptadas ao escuro por 20 minutos antes de cada medida e a razão $F_v:F_m$ foi aplicada para indicar a condição do aparato fotossintético dessas folhas, onde $F_v = F_m - F_0$, F_m é a fluorescência máxima e F_0 é a fluorescência mínima.

Foram aplicadas análises de variância com dois fatores, considerando tratamento de fumigação e tempo de exposição (Two Way ANOVA), seguidas de testes de comparações múltiplas, para os experimentos realizados com os poluentes separadamente e One Way ANOVA para identificar possíveis diferenças nos experimentos com a mistura dos poluentes. Análises de regressão foram utilizadas para definir o modelo que melhor ajusta a relação entre as respostas biológicas medidas e a concentração dos poluentes utilizados.

Resultados

Nos experimentos de fumigação com O_3 somente, foram observadas necroses foliares características e muito semelhantes às observadas em campo, ou seja, necroses foliares de coloração branca a marrom, com formas irregulares, iniciadas na superfície adaxial e que ocorrem entre as nervuras (Figura 3.3.A e B). As plantas mantidas na câmara com ar filtrado não apresentaram danos foliares.

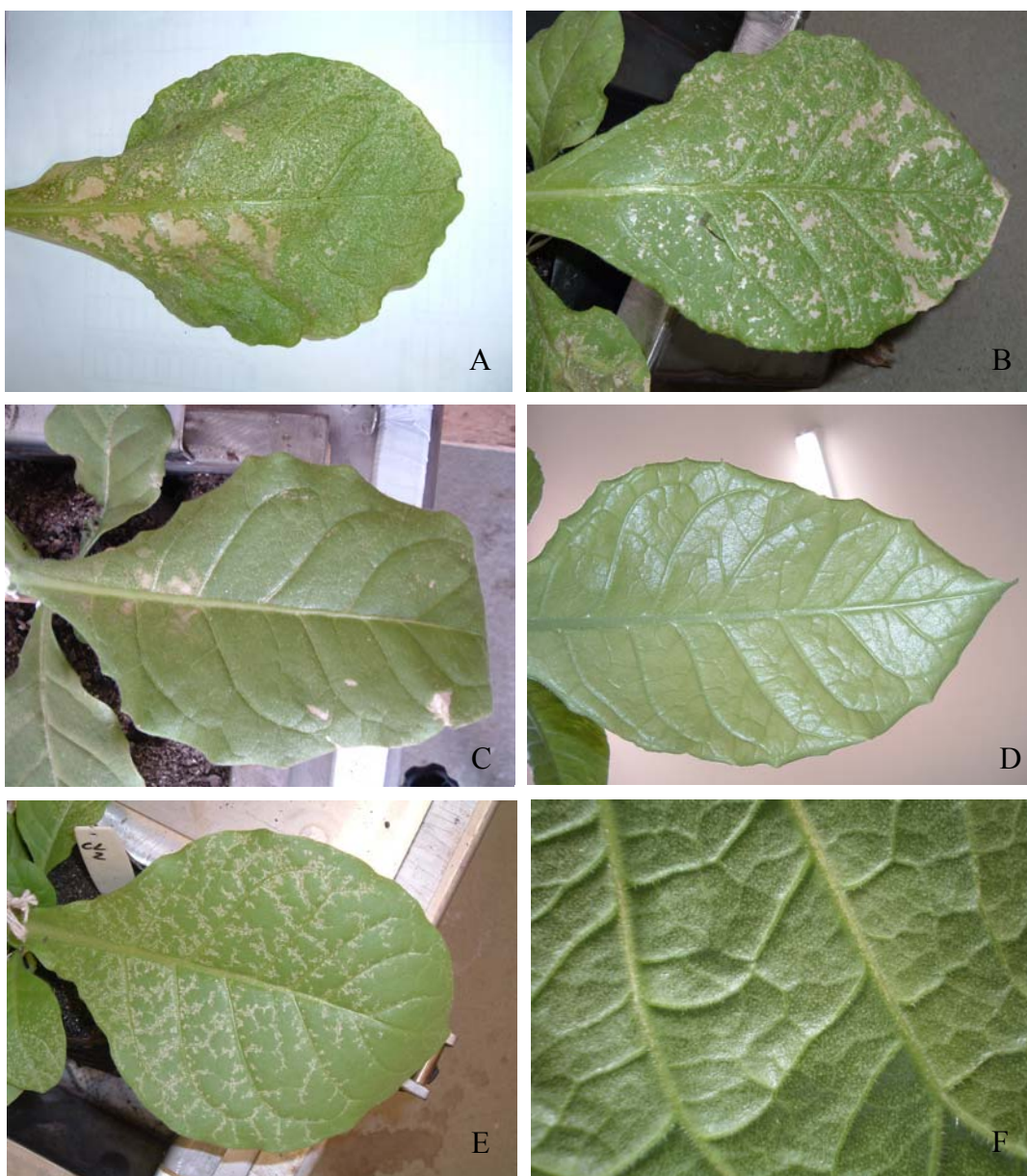


Figura 3.3: Fotos de necroses em folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' provocadas por O₃ (A e B), por H₂O₂ (C-superfície adaxial e D-superfície abaxial) e pela mistura desses poluentes (E-superfície adaxial e F-superfície abaxial).

Nesses experimentos, as porcentagens de danos foliares aumentaram significativamente a partir da dose de 40 ppb de O₃, tanto para as plantas expostas por 2 dias como por 4 dias, em relação aos resultados encontrados nas plantas mantidas no ar filtrado ou sob 20 ppb de O₃. Porém, concentrações acima de 40 ppb não promoveram o aparecimento de mais danos foliares (Figura 3.4.A e B). Em baixas concentrações de O₃ (≤ 20 ppb), o tempo de exposição não pareceu interferir no efeito do poluente sobre a planta, já em concentrações mais elevadas, o tempo de exposição foi um fator determinante da intensidade de necroses. Para as plantas expostas a 60 ppb por 2 dias, a porcentagem de danos foliares foi significativamente menor do que a estimada em plantas fumigadas com a mesma dose por 4 dias.

As análises de regressão mostraram não haver relação linear significativa entre intensidade de necroses e doses de ozônio. O modelo que melhor explicou essa relação, tanto para plantas submetidas ao ozônio por 2 dias quanto por 4 dias, foi o polinomial de segunda ordem. Contudo, a inclinação das curvas foi distinta, mostrando uma tendência à estabilização dos danos nas plantas mantidas sob concentrações acima de 40 ppb por 4 dias e ao aumento crescente da área foliar afetada por necroses naquelas fumigadas com doses superiores a essa por 2 dias. Dessa forma, como as linhas de tendências sugerem, se aumentarmos a concentração de O₃ acima de 80 ppb, poderemos obter um aumento de danos foliares para as plantas expostas por 2 dias, mas não quando são mantidas por 4 dias.

A razão $F_v:F_m$ foi reduzida em função do aumento da concentração de O₃ à qual as plantas foram expostas, sendo que a partir de 40 ppb, independentemente do tempo de exposição, ocorreu uma queda significativa da fluorescência (Figura 3.4.C e D). Entretanto, ao contrário do que foi observado com os resultados de danos foliares, o tempo de exposição não foi um fator que afetou significativamente a fluorescência da clorofila *a*. As análises de regressão mostraram haver uma relação linear negativa e significativa entre a razão $F_v:F_m$ e doses crescentes de exposição ao ozônio para as plantas expostas por 2 e 4 dias.

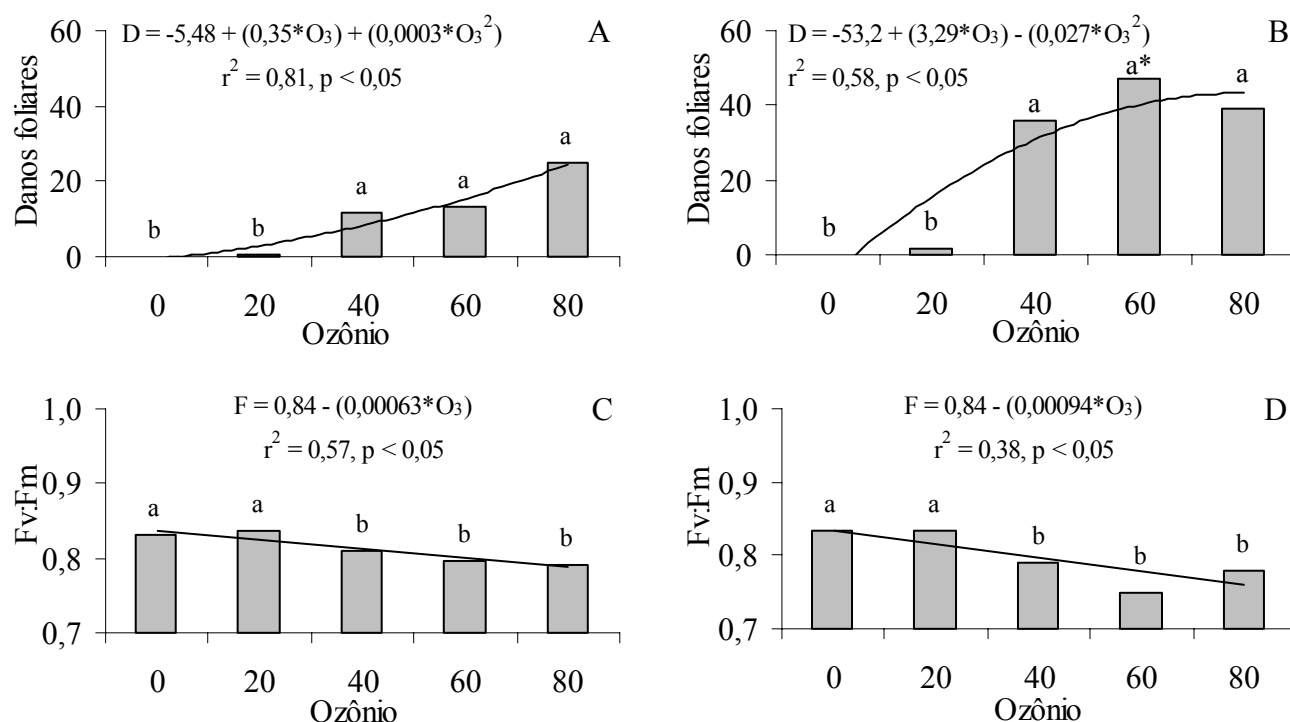


Figura 3.4: Valores médios de danos foliares (%) e fluorescência da clorofila *a* ($F_v:F_m$) das plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' fumigadas com O_3 (ppb), por 2 (A e C) e 4 (B e D) dias ($n=3$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, após o mesmo tempo de fumigação. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os resultados de 2 e 4 dias, na mesma concentração.

Com relação aos experimentos de fumigação com H_2O_2 , foi observado que as plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' apresentaram o mesmo tipo de necroses foliares do que os provocados por O_3 e também foi observada uma coloração prata, principalmente, na superfície abaxial de todas as folhas (Figura 3.3.C e D). Na Figura 3.5.A e B, é possível verificar que, mesmo em uma escala bem menor do que observada nos experimentos com O_3 , a porcentagem de danos também aumentou de acordo com a concentração do poluente, porém apenas nas plantas expostas por 4 dias. Nestas, a porcentagem de área afetada por necroses foi significativamente maior em plantas submetidas a $2,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ ou mais. A intensidade de

danos visíveis nas plantas fumigadas por 2 dias não foi significativamente explicada pela variação na concentração de H_2O_2 , porém quando foram mantidas por 4 dias, verificou-se relação linear positiva e significativa entre ambas as variáveis.

A fluorescência da clorofila *a* foi significativamente reduzida somente nas plantas expostas à maior concentração utilizada (Figura 3.5.C e D), independentemente do tempo de exposição. Desse modo, o modelo que melhor ajustou a relação entre H_2O_2 e fluorescência em plantas expostas por 2 e 4 dias foi o polinomial (segunda ordem). Além disso, maior tempo de fumigação com H_2O_2 também não causou diminuição mais expressiva da fluorescência.

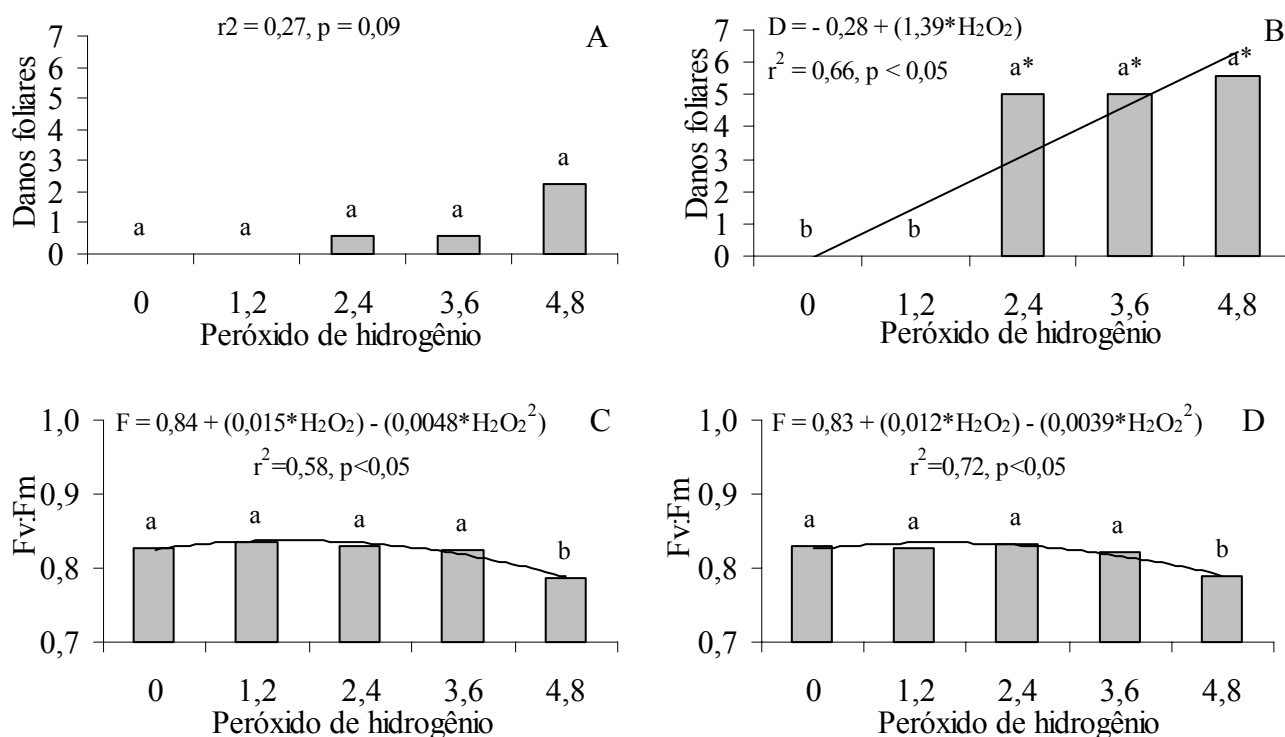


Figura 3.5: Valores médios de danos foliares (%) e fluorescência da clorofila *a* ($F_v:F_m$) das plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' fumigadas com H_2O_2 ($10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$), por 2 (A e C) e 4 (B e D) dias ($n=3$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, após o mesmo tempo de fumigação. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os resultados de 2 e 4 dias.

A mistura de H_2O_2 ao O_3 promoveu o mesmo tipo característico de danos foliares causados pelo O_3 e, assim como nos experimentos utilizando apenas o H_2O_2 , também provocou um efeito prata, principalmente na superfície abaxial (Figura 3.3.E e F). Porém, no geral, a ação conjunta desses poluentes diminuiu significativamente a intensidade de necroses nas folhas de *N. tabacum* 'Bel W3' (Figura 3.6.A e B). Apenas quando as plantas foram submetidas a 80 ppb de O_3 + $1,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ de H_2O_2 , por 4 dias, a porcentagem de danos foi a mesma do que quando submetidas ao O_3 isolado, não havendo nenhum efeito perceptível do H_2O_2 .

A mesma tendência foi observada quando a fluorescência da clorofila *a* foi analisada (Figura 3.6.C e D). A mistura dos poluentes promoveu a diminuição da razão $F_v:F_m$, porém essa queda foi significativamente maior quando as plantas foram fumigadas com O_3 separadamente, tanto para o período de exposição de 2 dias como para 4 dias.

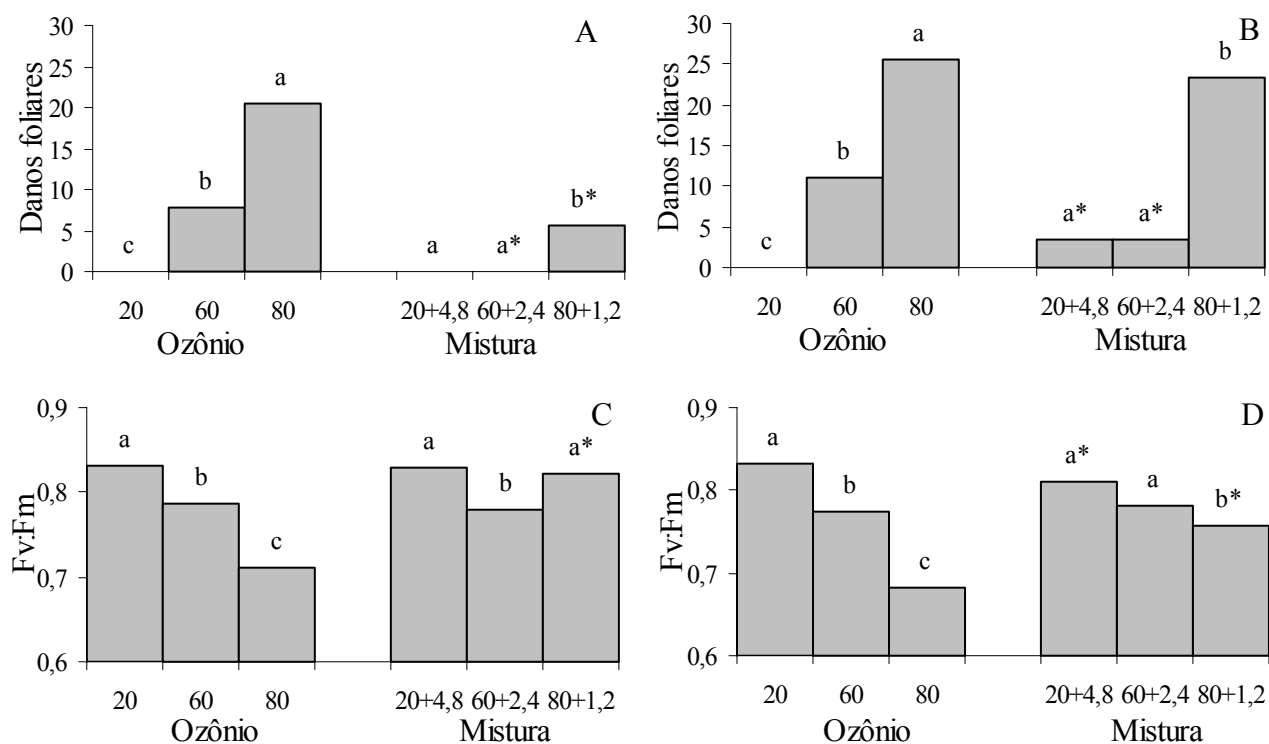


Figura 3.6: Valores médios de danos foliares (%) e fluorescência da clorofila *a* ($F_v:F_m$) das plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' fumigadas apenas com O_3 e com a mistura (O_3 – ppb + H_2O_2 - $10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$), por 2 (A e C) e 4 (B e D) dias ($n=3$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, após o mesmo tempo de fumigação. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os experimentos de mesmo tempo de exposição e concentração de O_3 , com e sem H_2O_2 .

Discussão

O fato de O_3 e H_2O_2 , assim como a mistura destes, provocarem os mesmos tipos de necroses foliares (Figura 3.3), é de extrema importância, pois demonstra que o tabaco não

responde apenas ao O_3 , como é usualmente sugerido para programas de biomonitoramento por vários autores, entre os quais Vergé *et al.* (2002), Kostka-Rick (2002), Fillela *et al.* (2005) e Klumpp *et al.* (2006). Dessa forma, em ambientes onde haja contaminação atmosférica por H_2O_2 , este pode interferir na avaliação do efeito do O_3 sobre o tabaco, tanto por causar danos semelhantes ao O_3 como por minimizar seu efeito sobre a planta. Por outro lado, a coloração prata, principalmente na superfície abaxial, observada quando as plantas foram colocadas sob a ação do H_2O_2 , pode ser facilmente reconhecida em campo e não deve ser um fator de confusão em programas de biomonitoramento. Embora tal efeito geralmente não seja notado em estudos de campo, há muito tempo já havia sido sugerido por Heggstad & Middleton (1959), que descreveram os danos de oxidantes do *smog* fotoquímico sobre essa cultivar, os quais surgem inicialmente, de acordo com os autores, na superfície abaxial. Posteriormente, Glater *et al.* (1962), observaram danos nas 3^{as}, 4^{as} e 5^{as} folhas de *Nicotiana glutinosa*, que foram expostas, por duas horas, em ambiente aberto durante episódios naturais de *smog* fotoquímico. Os autores atribuíram os danos não somente ao O_3 , mas também a uma mistura de poluentes fotooxidantes.

Além disso, o potencial de funcionamento do fotossistema II foi prejudicado quando *N. tabacum* foi exposto ao ozônio e ao peróxido de hidrogênio, demonstrando a sensibilidade dessa cultivar a esses oxidantes. Contudo, os danos fisiológicos e visíveis foram claramente mais intensos nas plantas fumigadas com O_3 do que com H_2O_2 . Nesse caso, a capacidade oxidativa e os níveis de exposição a ambos os poluentes devem ser considerados. Ozônio está, sem dúvida, entre os poluentes de maior poder oxidativo (Rao & Davis 1999, Saitanis *et al.* 2001, Grünhage & Jäger 2003), de modo que maiores doses de H_2O_2 serão, em teoria, necessárias para causar a mesma intensidade de danos provocados por ozônio.

Mesmo assim, a variação na razão $F_v:F_m$ foi fortemente relacionada com a concentração de H_2O_2 aplicada no presente estudo, principalmente nas plantas que foram fumigadas por

mais tempo. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Terry *et al.* (1995), que realizaram experimentos de fumigação em *Prunus avium* utilizando H_2O_2 e H_2O_2 combinado com propeno, e, verificaram que, em ambos os tratamentos, o H_2O_2 foi capaz de provocar danos fisiológicos e bioquímicos nas folhas analisadas.

A relação entre dano foliar e concentração de O_3 foi alta nas condições experimentais do presente estudo, assim como já observado por Navakoudis *et al.* (2003) e Iriti *et al.* (2006) em estudo de fumigação realizado com plantas de tabaco e por Clark *et al.* (2000) e Wei *et al.* (2004), com outras espécies. Entretanto, a função que melhor ajustou a relação entre essas duas variáveis não foi a linear, como seria esperado, especialmente em experimento realizado em laboratório (Figura 3.4.A e B). Essa linearidade não foi comprovada porque a porcentagem máxima de dano foliar ocorreu em plantas expostas a 40 ppb por 4 dias, não tendo sido observada intensificação dos danos nas plantas fumigadas com 60 e 80 ppb. Entre os fatores que podem ter provocado a estabilização da porcentagem de danos foliares está a alteração da eficiência da fotossíntese, que tem como consequência, uma possível diminuição da condutância estomática, que é um dos fatores mais importantes para o controle da entrada do poluente (Tingey & Hogsett 1985, Davison *et al.* 2003, Grünhage & Jäger 2003). Em ambos os casos, o resultado seria a diminuição da absorção de O_3 pelas plantas expostas a concentrações acima de 40 ppb e, em consequência, a área foliar afetada por necroses não seria ampliada. Ressalta-se que o efeito do O_3 sobre a eficiência fotossintética das plantas de *N. tabacum* foi deduzido a partir da razão $F_v:F_m$, tomando com base as informações relacionadas por Maxwell & Johnson (2000) de que, em condições controladas, essa razão pode ser usada como indicadora de mudanças na condutância estomática. Esses mesmos efeitos, do O_3 sobre a fluorescência, são frequentemente relatados por diferentes autores, entre os quais Loreto *et al.* (2001), Saintins *et al.* (2001), Buuren *et al.* (2002) e Navakoudis

et al. (2003) em plantas de tabaco e por Clark *et al.* (2000), Meyer *et al.* (2000), Nussbaum *et al.* (2001) e Calatayud *et al.* (2004) em outras espécies fumigadas com O₃.

Verifica-se que os resultados obtidos durante os experimentos com O₃ (Figura 3.4) comparados aos obtidos na situação controle dos experimentos com a mistura (Figura 3.6), apresentaram valores de porcentagens de danos foliares maiores, principalmente quando comparados os dados das exposições de 4 dias. Segundo Klumpp *et al.* (2006), diferentes intensidades de danos foliares em *N. tabacum* 'Bel W3' podem ser verificadas em plantas expostas à mesma dose de O₃. Os autores atribuem essas diferenças às variações nas condições climáticas entre as exposições, que podem impor mudanças no fluxo de ozônio através dos estômatos. No presente estudo, temperatura média mais alta (29 °C) e menor intensidade luminosa (134 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foram observadas no primeiro experimento, em relação ao segundo (26°C e 143 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Nessas condições, o fluxo de ozônio para o interior da planta poderia ter sido maior no segundo experimento, visto que a temperatura possivelmente era mais adequada, sob ponto de vista fisiológico, a uma espécie de clima temperado e a disponibilidade de luz para a fotossíntese era ligeiramente maior. Baseado nisso, seria esperado que as necroses foliares também tivessem sido mais intensas no segundo experimento, o que não aconteceu. As doses efetivas de exposição, determinadas pelas medições das concentrações do O₃, e a umidade relativa ficaram bem próximas entre os dois experimentos, e, portanto, não devem ter sido fatores responsáveis pela variação observada.

Ainda que as condições climáticas não tivessem sido suficientemente diferentes para impor fluxos distintos de O₃ através dos estômatos ao longo dos 2 experimentos, observou-se que o processo fotossintético foi claramente mais afetado no segundo experimento, efeito indicado pela queda mais acentuada na razão $F_v:F_m$. Além disso, enquanto no primeiro experimento, a exposição a 80 ppb de O₃ não impôs uma redução adicional dessa razão, em relação ao observado nas plantas tratadas com 60 ppb, no segundo experimento isto

aconteceu. Assim, é possível que danos fisiológicos latentes tenham sido mais severos no segundo experimento, afetando as trocas gasosas e restringindo a absorção de O_3 pela planta. O resultado disso poderia ser morte celular menos pronunciada de tecidos foliares, como foi observado. Espera-se que a repetição dos experimentos, a ser realizada brevemente, possa elucidar esses aspectos.

Adicionalmente, como já mencionado, foi demonstrado que o H_2O_2 , quando combinado com o O_3 , altera o efeito deste sobre *N. tabacum* 'Bel W3' (Figura 3.6). No geral, a mistura de H_2O_2 ao O_3 provocou um efeito antagônico e parece ter protegido, de alguma forma, a planta contra a ação do O_3 , minimizando tanto as alterações provocadas no fotossistema II quanto a intensidade de danos foliares. Tanaka *et al.* (1985) sugeriram que o H_2O_2 , no interior da célula, é uma molécula relacionada ao sistema de detoxificação do O_3 . Bienert *et al.* (2006) e Wang & Higgins (2006) demonstraram que o H_2O_2 é uma molécula sinalizadora envolvida em uma grande variedade de processos metabólicos, como, por exemplo, ativando genes relacionados ao sistema de defesas antioxidativas da planta, o que pode ter acontecido no presente estudo. Não se pode descartar a possibilidade de que o H_2O_2 e o O_3 tenham reagido entre si na superfície da folha, formando água e oxigênio, conforme proposto por Quagliano & Vallarino (1980), e dessa forma, a disponibilidade de O_3 para entrar na planta tenha sido reduzida.

De forma geral, os resultados apresentados sugerem que o ozônio promoveu a perda de eficiência fotossintética e, portanto, a relação O_3 no ambiente e O_3 dentro da planta parece ter sido alterada, diminuindo o fluxo para o interior da planta via estômatos, com isso, o aparecimento de danos visíveis pode ter sido modificado. Além disso, foi possível verificar que o peróxido de hidrogênio promoveu danos foliares similares aos provocados por ozônio, podendo confundir a resposta da planta quando exposta em campo e, ainda, minimizou os efeitos fisiológicos latentes e a intensidade de necroses foliares. Contudo, repetições desses

experimentos e a proposição de novos, utilizando outras combinações dos poluentes fotooxidantes, são necessárias para a comprovação desses resultados.

Referências bibliográficas

- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P.** 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochemica et Biophysica Acta* 1758: 994-1003.
- Borja-Aburto, V.H., Loomis, D.P., Bangdiwala, S.I., Shy, C.M., Rascon, P.R.** 1997. Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico City. *Am. J. Epidemiol.* 145(3): 258-68.
- Bouthillier, L., Vincent, R., Goegan, P., Adamson, I.Y., Bjarnason, S., Stewart, M., Gunette, J., Potvin, M. & Kumarathasan, P.** 1998. Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol.* 153: 1873-1884.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B.B. Buchanan, W. Gruissen, R.L. Jones (eds.). American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158-1203.
- Buuren, M.L., Guidi, L., Fornali, S., Ghetti, F., Franceschetti, M., Soldatini, G.F. & Bagni, N.** 2002. Ozone-response mechanisms in tobacco: implications of polyamine metabolism. *New Phytologist* 156: 389-398.
- Calatayud, A., Iglesias, D.J., Talón, M. & Barreno, E.** 2004. Response of spinach leaves (*Spinacia oleracea*) to ozone measured by gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Photosynthetica* 42 (1): 23-29.

- Clark, A.J., Lantodolt, W., Bucher, J.B. & Strasser, R.J.** 2000. Beech (*Fagus sylvatica*) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll *a* fluorescence performance index. *Environmental Pollution* 109: 501-507.
- Davison, A.W., Neufeldb, H.S., Chappelkac, A.H., Wolffa, K. & Finkelsteind, P.L.** 2003. Interpreting spatial variation in ozone symptoms shown by cutleaf cone flower, *Rudbeckia laciniata* L. *Environmental Pollution* 125: 61-70.
- Degl'Innocenti, E., Guidi, L. & Soldatini, G.F.** 2002. Characterisation of the photosynthetic response of tobacco leaves to ozone: CO₂ assimilation and chlorophyll fluorescence. *J. Plant Physiol.* 159: 845-853.
- Domingos, M., Bourotte, C., Klumpp, A., Klumpp, G. & Forti, M.C.** 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo, D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (eds.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. pp. 221-249.
- Embersson, L.D., Ashmore, M.R., Murray, F., Kuylensstierna, J.C.I., Percy, K.E., Izuta, T., Zheng, Y., Shimizu, H., Sheu, B.H., Liu, C.P., Agrawal, M., Wahid, A., Abdel-Latif, N.M., Van, Tienhoven M., Bauer, L.I. & Domingos, M.** 2001. Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. *Water, Air and Soil Pollution* 130 (1/4): 107-118.
- Evans, L.S., Albury, K. & Jennings, N.** 1996. Relationships between anatomical characteristics and ozone sensitivity of leaves of several herbaceous dicotyledonous plant species at great smoky mountains national park. *Environmental and Experimental Botany* 36 (4): 413-420.

- 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, pp. 1-341.
- Filella, I., Peñuelas, J. & Ribas, A.** 2005. Using plant biomonitors and flux modelling to develop O₃ dose–response relationships in Catalonia. *Environmental Pollution* 134: 145-151.
- Foyer, C.H., Descourvières, P. & Kunert, K.J.** 1994. Protection against oxygen radical: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17: 507-523.
- Fridovich, I.** 1987. The biology of oxygen radicals: general concepts. In: *Oxygen radicals and tissue injury* (Barry Halliwell ed.) - Editora Proceedings of a Book Lodge Symposium. 148p.
- Fumagali, I., Gimeno, B.S., Velissariou, D., Temmerman, L. & Mills, G.** 2001. Evidence of ozone-induced adverse effects on crops in the Mediterranean region. *Atmospheric Environment* 35: 2583-2587.
- Glaser, R.B., Solberg, R.A & Scott, F.M.** 1962. A developmental study of the leaves of *Nicotiana glutinosa* as related to their smog-sensitivity. *American Journal of Botany* 49: 954-970.
- Grünhage, L & Jäger, H-J.** 2003. From critical levels to critical loads for O₃: a discussion of a new experimental and modeling approach for establishing flux-response relationships for agricultural crops and native plant species. *Environmental Pollution* 125: 99-110.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C.** 1989. Protection against radical damage: systems with problems. In: *Free radicals in biology and medicine*, B. Halliwell & J.M.C. Gutteridge (eds.). Clarendon Press, Oxford. pp. 277-289.

- 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.
- Heggestad, H.E. & Middleton, J.T.** 1959. Ozone in high concentrations as cause of tobacco leaf injury. *Science* 129: 208-209.
- Holtzman, M.J., Fabbri, L.M., O'Byrne, P.M., Gold, B.D., Aizawa, H., Walters, E.H., Alpert, S.E. & Nadel, J.A.** 1983. Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:686-90.
- Iriti, M., Belli, L., Nali, C., Lorenzini, G., Gerosa, G. & Faoro, F.** 2006. Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersico pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environmental Pollution* 141: 275-282.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas, À., 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 (38): 7437-7448.
- Kehrl, H.R., Vicent, L.M., Kowalky, R.J., Horstman, D.H., O'Neil, J.J., McCartney, W.H. & Bromberg P.A.** 1987. Ozone exposure increases respiratory epithelial permeability in humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:1124-28.
- Kostka-Rick, R.** 2002. Ozone biomonitoring in a local net work around an automotive plant. In: *Proceedings of Eurobionet 2001 - Bioindication and air quality in European cities. Research, application, communication*, A. Klumpp, A. Fomin, G. Klumpp & W. Ansel (eds.) pp. 243-248.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.

- Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F. & Pasqualini, S.** 2001. Ozone quenching proprieties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology* 126: 993-1000.
- Lütz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H.K. & Kotzabasis, K.** 2005. Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. *Biochemica et Biophysica Acta* 1710 (1): 24-33.
- Manahan, S.E.** 1999. *Environmental chemistry*. 7th ed. CRC Press LLC. 898p.
- Mancini, A.; Buschini, A.; Restivo, F.M.; Rossi, C. & Poli, P.** 2006. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Science*. 170: 845-852.
- Manning, W.J.** 2003. Detecting plant effects is necessary to give biological significance to ambient ozone monitoring data and predictive ozone standards. *Environmental Pollution* 126: 375-379.
- Maxwell, K. & Johnson, G.N.** 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51 (345): 659-668.
- Meyer, U., Köllner, B., Willenbrink, J & Krause, G.H.M.** 2000. Effects of different ozone exposure regimes on photosynthesis, assimilates and thousand grain weight in spring wheat. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 78: 49-55.
- Miguel, A.H.** 1992. Poluição atmosférica urbana no Brasil: uma visão geral. *Química nova* 15 (2): 138-142.
- Muggli, R.** 1993. Free radical tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: *Free radical and antioxidants in nutrition*, F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi & C. Rice-Evans (eds.). Richelieu Press, London. pp. 189-204.

- Mudd, J.B.** 1996. Biochemical basis for the toxicity of ozone. In: Plant response to air pollution, M. Yunus & M. Iqbal (eds.). John Wiley & Sons Ltd. pp. 267-283.
- Navakoudis, E., Lütz, C., Langebartels, C., Lütz-Meindl, U. & Kotzabasis, K.** 2003. Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochemica et Biophysica Acta* 1621: 160-169.
- Nussbaum, S., Geissmann, M., Eggenberg, P., Strasser, R. & Fuhrer, J.** 2001. Ozone sensitivity in herbaceous species as assessed by direct and modulated chlorophyll fluorescence techniques. *Journal of Plant Physiology* 158: 757-766.
- Pasqualini, S., Antonielli, M., Ederli, L., Piccioni, C. & Loreto, F.** 2002. Ozone uptake and its effect on photosynthetic parameters of two tobacco cultivars with contrasting ozone sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 599-603.
- Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B.S. & Filella, I.** 1999. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (N.E. Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* 56: 221-224.
- Qulagliano, J.V. & Vallarino, L.M.** 1980. Química. 3^a ed. Guanabara Dois, RJ.
- Rao, M.V. & Davis, K.R.** 1999. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid. *The Plant Journal* 17: 603-614.
- Saitanis, C.J., Riga-Karandinos, A.N. & Karandinos, M.G.** 2001. Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Chemosphere* 42: 945-953.
- Saldiva, P.H.N., Lichtenfels, A.J.F.C., Paiva, P.S.P/, Barone, I.A., Martins, M.A., Massad, E., Pereira, J.C.R., Xavier, V.P., Singer, J.M. & Bohm, G.M.** 1994. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brasil - a preliminary report. *Environmental Research* 65: 218-225.

- Saldiva P.H.N., Pope C.A., Schwartz J., Dockery D.W., Lichtenfels J.F.C., Salge J.M., Barone I.A. & Bohm G.M.** 1995. Air pollution and mortality in elderly people: a time series study in São Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Health*; 50:159-163.
- Sawyer, F.R., Harley, R.A., Cadle, S.H., Norbeck, J.M. Slott, R. & Bravo, H.A.** 2000. Mobile sources critical review: 1998 NARSTO assessment. *Atmospheric Environment* 34: 2161-2181.
- Schelegle E.S., Adans W.C., Giri S.N., Siefkin. D.** 1989. Acute ozone exposure increases plasma prostaglandin F_{2α} in ozone-sensitive human subjects. *Am. Rev. Resp. Dis.* 140:211-16.
- Schelegle E.S., Siefkin D. & McDonald R.J.** 1991. Time course of ozone-induced neutrophilia in normal humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:1353-58.
- Seinfeld, J.H.** 1986. *Atmospheric Chemistry and physics of air pollution*. John Wiley & Sons. pp. 1-738.
- Seinfeld, J.H.** 1989. Urban air pollution: state of the science. *Science* 243: 745-752.
- Sillman, S.** 1999. The relation between ozone, NO_x and hydrocarbons in urban and polluted rural environments. *Atmospheric Environment* 33: 1821-1845
- Souza, S.R.** 1998. Ácidos carboxílicos na atmosfera de São Paulo. Um estudo analítico e ambiental. Tese de doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- Tanaka. K., Suda, Y., Kondo, N. & Sugahara, K.** 1985. O₃ tolerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 26 (7): 1425-1431.

- Terry, G.M., Stokes, N.J., Lucas, P.W. & Hewitt, C.N.** 1995. Effects of reactive hydrocarbons and hydrogen peroxide on antioxidant activity in Cherry leaves. *Environmental Pollution* 88: 19-26.
- Tingey, D.T. & Hogsett, W.E.** 1985. Water stress reduces ozone injury via a stomatal mechanism. *Plant Physiology* 77: 944-947.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure.** 2000. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Determination of the phytotoxic effects of ozone and other fotooxidants. Standardised exposure of tobacco, VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1^a, Beuth-Verl., Berlin.
- 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 example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Envirnmental Pollution* 118: 337-349.
- Vingarzan, R.** 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment* 38: 3431-3442.
- Wang, J. & Higgins, V.J.** 2006. Nitric oxide modulates H₂O₂-mediated defenses in the *Colletotrichum coccodes*–tomato interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 131-137.
- Wei, C., Skelly, J.M., Pennypacker, S.P., Ferdinand, J.A., Savage, J.E., Stevenson, R.E. & Davis, D.D.** 2004. Influence of light fleck and low light on foliar injury and

physiological responses of two hybrid poplar clones to ozone. Environmental Pollution
130: 215-227.

Capítulo 4

Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ como bioindicadora de ozônio na cidade de São Paulo, SP: uma avaliação crítica

A partir dos resultados mostrados no Capítulo 2, foi possível verificar que *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ é eficiente para a realização do biomonitoramento qualitativo do ozônio (O_3) na cidade de São Paulo, pois foi capaz de distinguir as diferentes áreas e épocas do ano mais e menos contaminadas por esse poluente (Figura 2.4). Entretanto, as necroses foliares não foram provocadas estritamente pelos níveis de O_3 na troposfera. Apenas uma pequena parte dos danos observados nas plantas expostas no Parque do Ibirapuera puderam ser explicadas pela concentração de O_3 . Adicionalmente, a relação entre ambas variáveis não foi linear e sim polinomial de segunda ordem, o que não é interessante para fins de biomonitoramento quantitativo.

Procurando confirmar se o modelo polinomial é o que melhor ajusta a relação entre danos foliares e concentração de ozônio, com dados de campo, o biomonitoramento tratado no Capítulo 2 foi ampliado durante os meses de setembro a dezembro de 2003. Acrescentaram-se três novas áreas, além das indicadas na Figura 2.1, onde o O_3 é também monitorado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) e onde, geralmente, ocorrem altas concentrações desse poluente. Essas áreas localizam-se, respectivamente, no Bairro da Mooca, zona leste da cidade de São Paulo, no Bairro de Santana, zona norte e em São Caetano do Sul, cidade situada na região metropolitana de São Paulo. As plantas de *N. tabacum* ‘Bel W3’ foram expostas nesses locais exatamente da mesma maneira como já vinha acontecendo nos demais locais. Os dados obtidos foram acrescentados ao conjunto anterior e foi realizada nova análise de regressão entre

porcentagem de área foliar afetada por necroses e concentrações médias de ozônio (entre 8 e 20 h de cada dia) por exposição (Figura 4.1).

Assim como já havia sido observado para a área do Pq. Ibirapuera (Figura 2.6), não há relação linear significativa entre danos foliares e O_3 . Além disso, a curva polinomial de grau 2 continuou sendo a que melhor ajustou a relação entre ambas as variáveis, quando introduzimos os 3 novos locais (Figura 4.1). Entretanto, apenas 17 % da variação de danos foliares pôde ser explicada pela variação da concentração de O_3 .

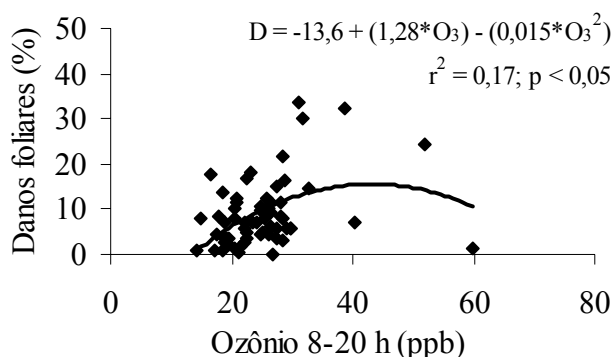


Figura 4.1: Regressão polinomial entre danos foliares em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' e as concentrações médias de ozônio, durante o período diário das 8-20 h, em cada exposição realizada no Pq. Ibirapuera, no período de setembro/2002 a dezembro/2003, e em Santana, Mooca e São Caetano do Sul, durante o período de setembro a dezembro de 2003.

Observa-se que, quando consideramos apenas a região do Pq. Ibirapuera, a variação da porcentagem de danos foliares foi melhor relacionada com a variação da concentração de O_3 ($r^2 = 0,25$). Esse comportamento também foi observado por Klumpp *et al.* (2006), em biomonitoramento realizado em diversas cidades européias. Esses autores verificaram forte relação entre danos e O_3 apenas em algumas cidades, quando avaliadas isoladamente, e atribuíram esse comportamento às diferentes condições climáticas entre as áreas. No presente

estudo, como comentado no Capítulo 2, o período de setembro a dezembro de 2003, quando foram acrescentadas as novas áreas, foi atípico em relação à contaminação por ozônio, devido à influência de variáveis meteorológicas, tendo sido registradas menores concentrações, em comparação com as medidas no mesmo período do ano anterior, com reflexos sobre a intensidade de necroses foliares (Figura 2.3). Devido à condição atípica verificada nessa segunda fase de exposições, não foi obtida amplitude de concentrações e de porcentagens de danos foliares similar à que foi utilizada na primeira análise de regressão realizada, quando somente os dados do Pq. Ibirapuera foram considerados. Sendo assim, apesar de previsto, não se encontrou maior explicabilidade nessa segunda análise de regressão polinomial. Entretanto, é importante verificar que o perfil da análise polinomial se manteve o mesmo, confirmando que outros fatores, além do O_3 , estão interferindo na formação das necroses foliares.

Nos estudos experimentais realizados em câmaras de fumigação, foi possível verificar que o O_3 promoveu perturbações fisiológicas às plantas, indicadas pela diminuição da eficiência do fotossistema II (Figura 3.3), com possível fechamento estomático, o que deve ter prejudicado a entrada deste na planta. Observou-se que a máxima intensidade de necroses foliares foi observada em plantas fumigadas com 40 ppb de O_3 por 4 dias (3 h.dia^{-1}). A exposição a 60 ou 80 ppb, pelo mesmo período, não resultou em aumento da área foliar afetada por necroses. Sendo assim, levantou-se a hipótese de que a razão para a não linearidade entre danos foliares e concentrações de O_3 , em condições de campo, poderia ser a perda da eficiência bioindicadora da cultivar ‘Bel W3’ de *N. tabacum* quando exposta a concentrações médias acima de 40 ppb de ozônio, em função das mencionadas perturbações.

Então, para verificar a veracidade dessa suposição, realizou-se nova análise de regressão com os dados observados durante o estudo de campo, considerando as áreas do Parque do Ibirapuera, Santana, Mooca e São Caetano do Sul. A análise foi feita com dados

das exposições em que a concentração média de O₃ não ultrapassou 40 ppb (Figura 4.2). Nesse caso, encontrou-se relação linear significativa entre danos e O₃, revelando que o biomonitoramento quantitativo com *N. tabacum* 'Bel W3' seria mais bem sucedido em locais submetidos a níveis crônicos de ozônio e a variações meteorológicas similares às observadas em São Paulo, no período de amostragem em campo. Porém, ressalta-se que a explicabilidade do modelo (27 %) ainda permaneceu baixa, indicando que a variação na porcentagem de danos foliares continua não sendo influenciada apenas pela variação da concentração de O₃.

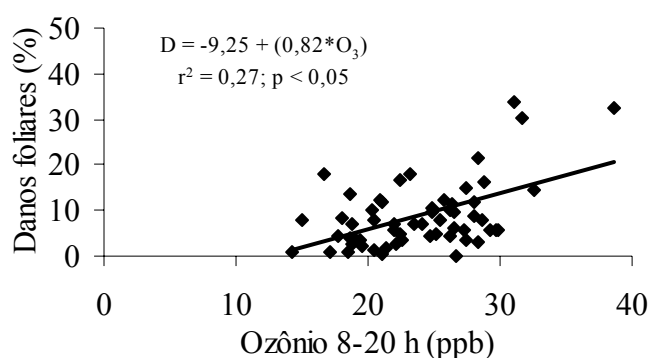


Figura 4.2: Regressão linear entre as porcentagens de danos foliares em plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' e as concentrações médias de ozônio, para o período diário das 8-20 h, em cada exposição realizada no Pq. Ibirapuera, no período de setembro/2002 a dezembro/2003, e em Santana, Mooca e São Caetano do Sul, durante o período de setembro a dezembro de 2003.

Na verdade, conforme apontado pela análise de componentes principais, os danos foliares foram relacionados positivamente com o sentido de reação que predomina a formação do O₃ (Figura 2.7), levando a entender que outros poluentes formados pelo *smog* fotoquímico poderiam estar entre os fatores que contribuem para o aparecimento de necroses nas plantas de tabaco. Assim, na seqüência do presente estudo, essa hipótese foi testada experimentalmente.

Realizaram-se novos experimentos a fim de avaliar se peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que também é um produto do *smog* fotoquímico, provocaria danos em *N. tabacum*, quando aplicados individualmente ou em associação com O_3 (resultados incluídos no Capítulo 3). Nessa etapa, foi visto que esse poluente causa basicamente dois tipos de danos visíveis em folhas de tabaco, necroses similares às causada por O_3 e coloração prata generalizada, principalmente, na superfície abaxial. No entanto, as necroses surgiram nas folhas em menor intensidade (Figura 3.5). Quando misturado ao O_3 , o H_2O_2 atuou de forma antagônica, diminuindo os efeitos maléficos do O_3 , o que resultou na redução da porcentagem de área foliar com necroses (Figura 3.6).

Esses resultados demonstram que o metabolismo de plantas de *N. tabacum* ‘Bel W3’ não é apenas alterado na presença de O_3 , mas também sofre a influência de outros poluentes do *smog* fotoquímico, que atuam em sinergismo ou antagonismo de acordo com a proporção entre eles. Esses efeitos, ao provocarem alteração na intensidade de danos visíveis, podem ter interferido no desempenho dessa cultivar como bioindicadora de O_3 quando foi exposta em campo.

Além disso, a análise de componentes principais (Figura 2.7) indicou, também, que as variações meteorológicas observadas ao longo do estudo de campo parecem ter sido fatores adicionais de estresse às plantas de *N. tabacum* ‘Bel W3’, interferindo na manifestação dos sintomas bioindicadores. Isto é provável, uma vez que a cultivar é proveniente de país de clima temperado e é adaptada, a condições climáticas muito distintas das observadas em São Paulo. Portanto, a variação climática também deve ser levada em conta para avaliar o desempenho de *N. tabacum* para o bioimonitoramento de O_3 . Cabe lembrar que Krupa *et al.* (1993), Peñuelas *et al.* (1999), Muné-Bosh & Alegre (2002), Davison *et al.* (2003) e Klumpp *et al.* (2006) já demonstraram que as condições meteorológicas são muito importantes e que baixa umidade, alta temperatura e ventos fortes promovem a diminuição da condutância

estomática e restringem o fluxo dos oxidantes para o interior das folhas, e, dessa forma, precisam ser caracterizadas e consideradas para avaliar a dose efetiva dos mesmos que é absorvida pela planta.

Um fator bastante importante a ser considerado, é que o próprio O₃ provoca o fechamento estomático e, portanto, diminui a absorção do poluente (Pasqualini *et al.* 2002). Isso ajuda a entender porque os danos foliares em tabaco estão mais fortemente relacionados com as concentrações de O₃ até 40 ppb. No programa de biomonitoramento realizado pela rede européia (EuroBionet – www.eurobionet.com, Klumpp *et al.* 2006), o tabaco foi uma ferramenta bastante indicada para biomonitorar o O₃, porém, também foi verificado que o seu uso é restrito, quando este está em altas concentrações.

Em suma, o presente estudo demonstrou que *N. tabacum* ‘Bel W3’ é tão eficiente para indicar qualitativamente os níveis de contaminação por ozônio na cidade de São Paulo, quanto o é em cidades européias, já se configurando em uma importante ferramenta para ampliar a área de monitoramento de qualidade do ar, realizado por métodos físicos e químicos. Se o protocolo proposto por VDI (2000, 2003) for estritamente seguido, como aconteceu neste estudo, os resultados obtidos poderão até ser comparados, de forma também qualitativa aos obtidos em diversas regiões do mundo, permitindo o mapeamento global de contaminação por O₃. Poderão servir, ainda, como ponto de comparação, em estudos que visam padronizar plantas nativas como bioindicadoras.

Entretanto, as pesquisas realizadas até o momento mostram que o emprego dessa cultivar para biomonitoramento quantitativo de O₃ não pode ser recomendado ainda para São Paulo, uma vez que não foi possível, até o momento, propor um modelo regional ideal para tal finalidade, baseado em medidas da porcentagem de área foliar afetada por necroses. Sabe-se, por enquanto, que o H₂O₂ e variáveis meteorológicas podem afetar a manifestação de

sintomas visíveis nas folhas dessa cultivar de tabaco. Portanto, sua ação, após ser bem delimitada, deveria ser considerada para proposição desse modelo em escala regional.

Para tanto, sugere-se a realização de novos experimentos a fim de: conhecer os efeitos de outros oxidantes sobre essa cultivar de tabaco, individualmente e em associação com O₃; verificar se efeitos precoces latentes ou visíveis acontecem ao longo do processo de formação do O₃ e de outros oxidantes e, finalmente, verificar se mudanças fisiológicas, estruturais e metabólicas ao longo do período de exposição das plantas, em resposta a fatores do ambiente em monitoramento, podem afetar a reação bioindicadora propriamente dita.

Referências bibliográficas

Davison, A.W., Neufeld, H.S., Chappelka, A.H., Wolff, K., Finkelstein, P.L. 2003.

Interpreting spatial variation in ozone symptoms shown by cutleaf cone flower, *Rudbeckia laciniata* L. *Environmental Pollution* 125: 61–70.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S.,

Ro-Poulsen, H., Ribas, À., 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 (38): 7437-7448.

Krupa, S.V., Manning, W.J., Nosal, M. 1993. Use of tobacco cultivars as biological

indicators of ambient ozone pollution: an analysis of exposure-response relationships. *Environmental Pollution* 81: 137-148.

Munné-Bosch, S., Alegre, L. 2002. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts.

Planta 214: 608-615.

- Pasqualini, S., Antonielli, M., Ederli, L., Piccioni, C. & Loreto, F.** 2002. Ozone uptake and its effect on photosynthetic parameters of two tobacco cultivars with contrasting ozone sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 599-603.
- Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B.S., Filella, I.** 1999. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions in different sites in Catalonia (NE Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* 56: 221-224.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure.** 2000. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Determination of the phytotoxic effects of ozone and other fotooxidants. Standardised exposure of tobacco, VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1^a, Beuth-Verl., Berlin.
- 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. 1^a, Beuth, Berlin.

Conclusões finais

As pesquisas realizadas permitem concluir que:

Nicotiana tabacum ‘Bel W3’ é uma cultivar adequada para biomonitoramento qualitativo de ozônio (O_3) para a cidade de São Paulo, sendo capaz de discriminar áreas e épocas mais e menos contaminadas por esse poluente. Dessa forma, *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ é uma importante ferramenta para ampliar a área de monitoramento de qualidade do ar, para contribuir para o mapeamento global de contaminação por O_3 e para auxiliar em estudos que visam padronizar plantas nativas como bioindicadoras.

Porém, tem seu uso limitado para biomonitoramento quantitativo em ambiente contaminado por O_3 , quando em concentrações médias acima de 40 ppb. Outros poluentes formados pelo *smog* fotoquímico, assim como variações meteorológicas, estão entre os fatores que podem interferir no aparecimento de necroses foliares. Peróxido de hidrogênio, especificamente, diminui os efeitos danosos do O_3 .

Anexo

Sant'Anna, S.M.R., Esposito, M.P., Domingos, M. & Souza, S.R. 2007. Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Environmental Pollution*, no prelo.

Suitability of *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil

Silvia M.R. Sant’Anna, Marisia P. Esposito, Marisa Domingos, Silvia R. Souza*

Instituto de Botânica, Seção de Ecologia, Caixa Postal 3005, 01061-970 São Paulo, SP,
Brazil

* Corresponding author: souzasrd@terra.com.br; phone: ++ 55 11 5073 6300; fax: ++ 55 11 5073 3678

Capsule: *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ is suitable for indicating low ozone levels in Brazil

ABSTRACT

Nicotiana tabacum ‘Bel W3’ is a widely used sensitive bioindicator for ambient ozone, but it is rarely used in tropical countries. Our goal was to determine the suitability of this plant for biomonitoring ozone in the city of São Paulo by evaluating the relationships between leaf necroses and ozone under field conditions and measurements of chlorophyll *a* fluorescence and antioxidants in plants exposed to different concentrations of ozone in closed chambers. While a weak linear relationship between leaf injury and ozone concentrations ($R^2 = 0.10$) was determined in the field, a strong linear relationship was observed in the chamber experiments. Maximum leaf injury was observed in plants submitted to 40 ppb, which coincided with a significant decrease in fluorescence and total ascorbic acid. The relationship between leaf damage observed in the field and ozone was improved when the concentrations were limited to 40 ppb ($R^2 = 0.28$).

Key words: Ozone biomonitoring, *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’, Brazil

1. Introduction

Many environmental problems have been caused by tropospheric pollution in the metropolitan area of São Paulo. The 17 million inhabitants are constantly exposed to primary pollution emissions from industries and vehicles. The vehicles are the main air pollution source of air pollution in São Paulo due to their large number, the almost nonexistent control of emissions and the use of different kinds of fuel (Domingos et al., 2002). As many as 62% of the vehicles are run on gasohol (a mixture of gasoline and ethanol), 30% on pure ethanol and 8% on diesel (Campos et al., 1999). Burned fuel introduces oxygen compounds into the troposphere, such as nitric oxide, aldehydes, ketones and organic acids, which are responsible for many atmospheric reactions producing organic radicals, hydrogen peroxide, peroxyacetyl nitrate and ozone (Montero et al., 2001). Due to this, the atmospheric contamination in São Paulo is very particular and increases the oxidative potential of the atmosphere (Souza et al., 1999).

The photochemical compounds, such as ozone, are very toxic to organisms due to the oxidative stress induced by the increasing production of reactive oxygen species (ROS) in the cells (Muggli, 1993). At the same time, non-enzymatic and enzymatic antioxidants, such as ascorbic acid and superoxide dismutase, respectively, may control the toxic effects of ROS (Iqbal et al., 1996). However, the oxidant-antioxidant equilibrium is rapidly disrupted in sensitive plants, such that ROS can affect vital molecules like proteins, lipids and nucleic acids (Muggli, 1993). As a result of rapid changes in air pollution concentrations, metabolic, physiological, morphological and structural reactions in these plants are expected. Plants that show conservative, unquestionable and easily measured reactions are excellent bioindicators of air pollution (VDI, 1999; De Temmerman et al., 2004).

Nicotiana tabacum 'Bel W3' has been used for biomonitoring ozone in Europe and North America (Heggestad, 1991; Krupa and Manning, 1988; VDI, 2000). As it is very sensitive and

shows characteristic and easily quantified ozone-induced necroses on the leaves (Horsman, 1981; Peñuelas et al., 1999; Vergé et al., 2002). Klumpp et al. (2006) by means of a recent, successful biomonitoring program conducted in many European cities, showed that tobacco ‘Bel W3’ was adequate for indicating sites and periods of the year more and less contaminated by ozone. However, strong linear relations between ozone concentrations and percentage of leaf tissue covered by necroses, an ideal condition for quantitative biomonitoring according to Arndt and Schweizer (1991), were only found in a few numbers of cities. These authors and others, such as Koppel & Sild (1995), Antonielli et al. (1997), Finnan et al. (1996), Peñuelas et al. (1999) and Vergé et al. (2002), concluded that meteorological variations may interfere with the uptake of ozone via stomata and thus affect the linear relations. Therefore, the bioindicator efficiency of *N. tabacum* ‘Bel W3’ is strongly dependent on the environmental conditions as a whole.

In the state of São Paulo, SE-Brazil, *N. tabacum* ‘Bel W3’ was successfully used to qualitatively biomonitor ozone around the industrial complex of Cubatão (Klumpp et al., 1994) and preliminarily in an urban site in the city of São Paulo (Domingos et al., 2002). However, these authors could not show if the leaf injuries were predominantly caused by tropospheric ozone, another essential condition for biomonitoring programs employing this sensitive plant (VDI, 2000), due to the lack of air quality data.

In the present study, we raised the general hypothesis that *N. tabacum* ‘Bel W3’ is as efficient for quantitative biomonitoring under the tropical weather conditions observed in São Paulo as in European cities, as indicated by a significant linear relation between leaf necroses and ozone concentrations. In addition to the possible interferences of meteorological factors on the uptake of ozone already noted by other authors, our working hypothesis was that physiological disturbances and the action of antioxidants restraining the toxic effects of ROS during plant exposure are other possible causes of interference with the linear relation between

leaf necroses and ozone. Therefore, our goal was to determine (1) the relationship between ozone and the percentage of leaf area of *N. tabacum* 'Bel W3' affected by necroses under field conditions and (2) the physiological responses, indicated by the measurement of chlorophyll *a* fluorescence and the levels of total ascorbic acid and activity of superoxide dismutase, in plants exposed to different concentrations of ozone for two and four days. Finally, comparing results from both field and experimental designs, we determined the suitability of *N. tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in the city of São Paulo.

2. Material and methods

Nicotiana tabacum 'Bel W3' plants were cultivated following the methods proposed by VDI (2000) for both field and fumigation experiments. The plants grew in two-liter, black pots with standard soil, in a greenhouse with filtered air until the beginning of each exposure; suitable irrigation was maintained by capillarity. The plants were exposed when they had six leaves. One day before the experiment started, the third leaf was marked.

In the field experiment, six plants were exposed for 14 days in four sites of São Paulo highly contaminated by ozone and were successively substituted by a new lot of six plants during a period of 15 months (September 2002 to December 2003), following methods proposed by VDI (2000). In parallel, other lots of six plants were maintained in the greenhouse. The air pollution and climatic conditions at these sites were monitored by the Environmental Protection Agency of São Paulo state. Leaf-to-air vapor pressure deficit (VPD) was estimated according to the formula proposed by Streck (2003) using daily values of temperature and relative humidity.

Four ozone fumigation experiments were carried out in closed chambers maintained inside a laboratory under artificial illumination supplied by metallic vapor (400 W) and fluorescent (30 W TL05) lamps. The experiments consisted of exposing three tobacco plants

to filtered air (FA treatment) and another three to filtered air plus ozone (FA+O₃ treatment) for two days and two other similar lots of plants to the same treatments for four days (three hours per day in all cases). One replicate of each treatment was performed. The ozone concentrations simulated in the FA+O₃ treatment were 20, 40, 60 and 80 ppb, which were defined in function of the daily atmospheric concentrations observed during the field experiment. Ozone was generated under electrical discharge by dissociation of oxygen contained in filtered air. The ozone levels were certified by continuous measurements performed with a Ecotech™ 9810B photometric monitor.

During the fumigation experiments, the mean values of temperature, relative humidity and photon flux density were 28 ± 4 °C, $88 \pm 6\%$ and $156 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively.

In both field and fumigation experiments, the percentages of leaf area affected by typical ozone-induced necroses of the fourth, fifth and sixth oldest leaves were estimated by a single operator, following the recommendations proposed by VDI (2000). Intervals of 5% were adopted to estimate the leaf area covered by necroses, and the results were expressed as average of the percentages of the three leaves per plant.

After two and four days of fumigation and following a 20 minutes adaptation to the dark, the chlorophyll *a* fluorescence in the same three was determined by means of a PAM 2100 fluorometer (Walz, Germany). Values of maximum fluorescence (F_m) and minimum fluorescence (F_0) were used to calculate $F_v:F_m$ ratio. The concentration of total ascorbic acid (ascorbic and dehydro-ascorbic acids) and the activity of superoxide dismutase, indicators of the antioxidative defense system, were photometrically analyzed according to Keller and Schwager (1977) and Oswald et al. (1992), respectively.

Differences among treatments of the fumigation experiments were determined by one way analysis of variance (F Test) followed by pairwise comparison test of Student Newman Keuls.

Mean values of biotic parameters obtained in plants exposed to the same fumigation treatment for two and four days were compared by t test. When necessary, data were transformed ($\log_{10}$ or squared) to reach normality and equal variances. Linear regression analysis showed the relationship between (1) leaf necroses and (a) mean ozone concentrations (from 8:00 am to 8:00 pm), (b) AOT20 and (c) AOT40 per exposure in the field experiment and between (2) all biotic parameters measured and (a) mean and (b) total accumulated doses of ozone in the fumigation experiment. SigmaStat 2.0 Software was used for all tests.

3. Results

The highest average ozone levels measured in the four exposure sites in São Paulo were registered during September to December 2002 (AOT40: 12 730 ppb h) and January to March 2003 (AOT40: 9 460 ppb h), in the spring and summer, respectively. The lowest average ozone concentrations were observed from April to August 2003, corresponding to autumn (AOT40: 2 100 ppb h) and winter (AOT40: 2 500 ppb h). Atypical low concentrations of ozone were observed in spring 2003 (AOT40: 4 430 ppb h). The highest daily concentrations occurred in January 2003 (Fig. 1). The mean values of temperature, relative humidity and photon flux density during the exposure period were 20 ± 4 °C, $83 \pm 11\%$ and 1308 ± 219 W m⁻², respectively. Higher values of VPD were estimated in December 2002 and from August to October 2003, compared to those calculated for the other months of plant exposure. Under these conditions, higher percentages of leaf area occupied by necroses in plants of *N. tabacum* 'Bel W3' exposed in São Paulo were verified during spring 2002 (November-December) and summer 2003 (February-March) (Fig. 1). Plants maintained inside the greenhouse under filtered air never showed leaf necrosis.

In the fumigation chambers, leaf injury was significantly more intense in the plants exposed for four days than the ones exposed for two days (Fig. 2) and was comparable to the

Sant'Anna, S.M.R.

values observed in the plants exposed in the field (Fig. 1). However, while increasing levels of ozone were followed by increasing percentages of leaf injury in plants after two days of exposure, the most intense leaf necroses were reached in plants maintained under 40 ppb of ozone for four days. In such case, exposure to 60 ppb or to 80 ppb did not significantly enhance the leaf area affected by necroses (Fig. 2). As expected, the plants exposed to filtered air showed no visual injuries.

The highest content of total ascorbic acid was determined in plants fumigated for two days with 40 ppb of ozone. On the other hand, the plants that remained exposed for four days to 20 and 40 ppb showed the lowest leaf concentrations. Total ascorbic acid concentration was significantly lower in plants exposed to 40 ppb for four days than in plants fumigated with the same level of ozone for two days (Fig. 2). SOD activity was significantly more and less intense in plants fumigated with 20 ppb and 60 ppb, respectively, for two days. Similar activities of this enzyme were verified in plants exposed to all levels of ozone for four days and did not differ from the values obtained for plants exposed to filtered air (Fig. 2). Higher activity of SOD was verified in plants fumigated with 60 ppb for four days compared to plants exposed for two days.

Lower values of F_0 and F_m were observed in plants submitted to 40 ppb for two days. In plants exposed for four days, F_0 was not affected by any level of ozone, and F_m was significantly lower only in the plants exposed to 40 and 60 ppb. The $F_v:F_m$ ratio strongly decreased in the plants exposed to 40 ppb and upwards, for both two and four days. The values of F_0 , F_m and $F_v:F_m$ ratio were lower, especially in the plants exposed to 60 ppb for four days, than in plants fumigated for two days (Table 1).

In the field, the determination coefficients between injuries and ozone levels were very low, independent of the ozone pollution descriptor used. The highest coefficient was obtained with the mean values of ozone (Table 2), in the chamber experiments in contrast the leaf injuries were highly explained by ozone levels. Also, in the same experiments, the linear

relationship between physiological parameters and ozone levels were high, mainly $F_v:F_m$ ratios and total ascorbic acid in plants exposed for two and four days, respectively. The best determination coefficient as estimated between fluorescence and ozone was obtained for two days.

4. Discussion

Although the field biomonitoring indicated that *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' was able to show differences in ozone contamination among the seasons in the city of São Paulo, it is not suitable for quantifying the ozone levels, considering the weak relationship between leaf necroses and ozone pollution. Similar results were obtained by Klumpp et al. (2006) in European cities. They commented that efforts to determine the relationship between ambient ozone concentrations and leaf symptoms in tobacco and other bioindicator plants have been attempted with variable success. In fact, as pointed by Klumpp et al. (2006) and others (Koppel and Sild, 1995; Antonielli et al., 1997; Finnan et al., 1996; Peñuelas et al., 1999; Vergé et al. 2002), meteorological variations may interfere with the uptake of ozone via stomata and then on the relationship between leaf necroses and ozone.

According to Krupa et al. (1993), Muné-Bosh and Alegre (2002), Davison et al. (2003), the ozone biomonitoring using tobacco Bel W3 can be affected by photoperiod, temperature, solar radiation, relative humidity, wind, VPD and carbon dioxide concentrations which are parameters that can decrease the ozone uptake because they promote the closing of the stomata.

VPD, in particular, is an important environmental factor that can affect stomatal conductance in higher plants since it can cause water stress. Stomata regulate their opening to avoid dehydration as VPD increases (Streck, 2003). The stomata conductance is probably the

most important control of pollutant uptake (Krupa et al., 1993; Davison et al., 2003; Grünhage and Jäger, 2003). This being the case, high concentrations of ozone, mainly taken by plants through stomata, would impose lower flux of ozone into the leaves and consequently less the damage in plants growing under high VPD than in plants growing under low VPD. Ball et al. (1998) confirmed this hypothesis by proving that this index was among the most important factors to modify the effects of ambient ozone on white clover. In the present study, higher values of VPD (0.02 - 2.22 KPa) appeared to be obtained during the exposure period of tobacco plants in Sao Paulo, when compared to those (0.27-1.60 KPa) found by Ball et al. (1998). Therefore, restrictions to the occurrence of leaf symptoms would be expected in response to high VPD during the exposure period. However, the fact that no significant relation between leaf damage and VPD ($R^2 = 0.03$; $p > 0.05$) was found indicates that this phenomenon was not generalized. Decreases in ozone uptake might have occurred only sporadically, such as at the beginning of January 2003, when the highest daily levels of ozone and the most severe VPD were registered. In addition, Streck (2003) mentioned that stomata do not always respond to VPD. If this is the case, measurements of ozone flux into the leaf and consequent cumulative ozone uptake would be more precise to delimit ozone-induced effects on plants (Klumpp et al., 2006).

Although the data from the fumigation experiments showed a stronger linear relationship between ozone and leaf damage than that obtained in the field, they clearly revealed that maximum physiological disturbances and maximum percentage of leaf area affected by necroses occurred in plants fumigated with 40 ppb for four days. Additionally, the intensification of the effects on the plants seemed to be time-dependent, mainly those related to chlorophyll *a* fluorescence and leaf necroses.

Chlorophyll *a* fluorescence, an indicator of photosynthetic efficiency (Maxwell and Johnson, 2000), clearly showed that plants exposed for two days were less affected by ozone

than those exposed for four days. The reduction of photochemical efficiency of PSII, shown by significantly lower $F_v:F_m$ ratios, can mainly be attributed to the decrease of maximum fluorescence (F_m), an effect that was evident in plants exposed to 40 and 60 ppb of ozone. Under 40 ppb for two and four days, the reduction of $F_v:F_m$ could also be a consequence of the decrease of F_0 , as frequently described by other authors, such as Maxwell and Johnson (2000), Guide et al. (2005), Francini et al. (2007), among others. This parameter also showed that from 40 ppb of ozone and upwards the gaseous exchanges could be affected in such a way that the pollution uptake would be restrained in longer exposures. This might explain why ozone levels over 40 ppb did not add any additional damage to the leaves.

However, we suggest that the antioxidative defenses could be one more factor that interferes with the visual response in plants, preventing oxidative cell damage. In fact, it was mainly the ascorbic acid that changed significantly after two and four days of exposure to 40 ppb of ozone or more. This suggests that antioxidants may also have contributed to counter the progression of leaf necroses in plants submitted to 40 ppb or more of ozone for four days.

Taking in account the results from the fumigation experiments, it is possible to expect increasing physiological disturbances during the 14 days of exposure of *N. tabacum* 'Bel W3' in the field, which could restrict ozone uptake and be one possible explanation for the weak relationship between leaf damage and ozone concentrations. The action of antioxidants should not be ignored. It is also possible to suppose that these disturbances would be worse when tobacco plants are exposed to mean ozone concentrations higher than 40 ppb. To test these suppositions, a new regression analysis between leaf damage and mean ozone concentrations (from 8:00 am to 8:00 pm) up to 40 ppb was performed ($R^2 = 0.28$; $p < 0.05$). Compared to the results presented in Table 1, this linear relationship improved (from 10% to 28%). However, it is still not strong enough to guarantee the suitability of *N. tabacum* 'Bel W3' for quantitative ozone biomonitoring under the environmental conditions commonly observed in

the city of São Paulo, except possibly in regions where the ozone concentrations are less than 40 ppb.

5. Conclusions

The results showed that *N. tabacum* 'Bel W3' has potential to adequately categorize the ozone levels in São Paulo. *N. tabacum* 'Bel W3' may be suitable for indicating low ozone concentrations, when the protocol proposed by VDI (2000) is applied. The results point to the necessity of further studies to establish an ideal period of exposure for biomonitoring in the city.

Acknowledgements

This study is part of the PhD thesis and the MSc dissertation of the first and second authors respectively. We thank Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), for the financial support (processes 02/04751-6), Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), for furnishing data of air quality and climatic conditions, and Dr. Marcos Pereira Aidar and João Godoy, for making available the equipment for measuring the chlorophyll *a* fluorescence.

References

Antonielli M., Pasqualini S., Ederli L., Batini P., Moscatello S., Loreto, F., 1997.

Physiological characteristics of tobacco cultivars with contrasting sensitivity to ozone. *Environmental and Experimental Botany* 38, 271-277.

- Arndt, U., Schweizer, B., 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Ellenberg et al. (Eds.), *Biological Monitoring. Signals from the Environment* Vieweg, Eschborn, pp. 199-298.
- Ball, G.R., Benton, J., Palmer-Brown, D., Fuhrer, J., Skårby, L., Gimeno, B.S., Mills, G., 1998. Identifying factors with modify the effects on ambient ozone on white clover (*Trifolium repens*) in Europe. *Environmental Pollution* 103, 7-16.
- Campos, I.C., Pimental, A.S., Corrêa, S.M., Arbilla, G., 1999. Simulation of air pollution from mobile source emissions in the city of Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Chemical Society* 3, 203-208.
- Davison, A.W., Neufeld, H.S., Chappelka, A.H., Wolff, K., Finkelstein, P.L., 2003. Interpreting spatial variation in ozone symptoms shown by cutleaf cone flower, *Rudbeckia laciniata* L. *Environmental Pollution* 125, 61–70.
- De Temmerman, L., Bell, J.N.B., Garrec, J.P., Klumpp, A., Krause, G.H.M., Tonneijck, A.E.G., 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: *Proceedings of Eurobionet 2002 – Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness*, A. Klumpp, W. Ansel & G. Klumpp (Eds.) pp. 337-373.
- Domingos, M., Bourotte, C., Klumpp, A., Klumpp, G., Forti, MC., 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: Bicudo, D.C., Forti, M.C., Bicudo, C.E.M. (Eds), *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Secretaria do Meio Ambiente*, São Paulo. pp. 221-249.
- Finnan, J.M., Jones, M.B., Burke, J.I., 1996. A time-concentration study of the effects of ozone on spring wheat (*Triticum aestivum* L.). 1. Effects on yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 57, 159-167.

- Francini A., Nali C., Picchi V., Lorenzini G., 2007. Metabolic changes in white clover clones exposed to ozone. *Environmental and Experimental Botany* 60, 11-19.
- Grünhage, L., Jäger, H., 2003. From critical levels to critical loads for ozone: a discussion of a new experimental and modeling approach for establishing flux-response relationships for agricultural crops and native plant species. *Environmental Pollution* 125, 99-110.
- Guidi, L., Degl'Innocenti, E., Genovesi, S., Soldatini, G.F., 2005. Photosynthetic process and activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in resistant and sensitive genotypes of *Lycopersicon esculentum* L. exposed to ozone. *Plant Science* 168, 153-160.
- 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.
- Horsman, D.C., 1981. A survey of ozone in malbourne using tobacco as an indicator plant. *Environmental Pollution* 2 (series B), 69-77.
- Iqbal, M., Abdin, M.Z., Mahmooduzzafar, Y.A., 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, pp. 195-204.
- Keller, T., Schwager, H., 1977. Air pollution and ascorbate. *European Journal of Forest Pathology* 7, 338-350.
- Klumpp, A., Klumpp, G., Domingos, M., 1994. Plants as bioindicadors of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Enviromental Pollution* 85, 109-116.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas, À., 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 (38), 7437-7448.

Koppel, A., Sild, E., 1995. Bioindication of ozone in Estonia by using the tobacco variety Bel W3. Water, Air, and Soil Pollution 85, 1515-1519.

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

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

Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. Journal of Experimental Botany 51 (345), 659-668.

Montero, L., Vasconcellos, P.C., Souza, S.R., Pires, M.F.A., Sanches, O.R., Andrade, M.F., Carvalho, L.R., 2001. Measurements of atmospheric carboxylic acids and carbonyl compounds in São Paulo City, Brazil. Environmental Science & Technology 35, 3071-3081.

Muggli, R., 1993. Free radical tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: Free radical and antioxidants in nutrition, F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi and C. Rice-Evans (Eds.). Richelieu Press, London. pp. 189-204.

Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2002. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. Planta 214, 608-615.

Oswald, W.F., Kraus, R., Hippeli, S., Benz, B., Volpert, R., Elstner, E.F., 1992. Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). Plant Physiology 139, 742-748.

- Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B.S., Filella, I., 1999. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions in different sites in Catalonia (NE Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* 56, 221-224.
- Souza, S.R., Vasconcellos, P.C., Carvalho, L.R.F., 1999. Low molecular weight carboxylic acids in an urban atmosphere: winter measurements in São Paulo City, Brazil. *Atmospheric Environment* 33, 2563-2574.
- Streck, N.A., 2003. Stomatal response to water vapor pressure deficit: an unsolved issue. *Revista Brasileira de Agrociência* 9 (4), 317-322.
- Vergé, X., Chapuis, A., Delpoux, M., 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental Pollution* 85, 337-349.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure., 1999. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/1. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure., 2000, Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Determination of the phytotoxic effects of ozone and other fotooxidants. Standardised exposure of tobacco, VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth-Verl., Berlin.

Legend to figures

Fig.1: Mean values of daily ozone concentrations, daily vapor pressure deficit (VPD) and percentage of leaf injury in plants of *N. tabacum* 'Bel W3' successively exposed for fourteen days during the field study. Mean values were calculated based on the results obtained at all four exposure sites.

Fig.2: Mean values of percentage of leaf injury, the amount of total ascorbic acid (AA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in plants of *N. tabacum* 'Bel W3' fumigated with different ozone concentrations for two (□) and four (■) days. Lowercase and capital letters indicate significant differences among mean values obtained for plants exposed to different levels of ozone for two days and for four days, respectively ($p < 0.05$). * Indicates significant differences between mean values obtained after two and four days of exposure to the same ozone concentration ($n = 9$).

Table 1: Mean values of minimum (F_0) and maximum fluorescence (F_m) of chlorophyll *a* and $F_v:F_m$ ratios in plants of *N. tabacum* ‘Bel W3’ exposed to ozone ($n = 9$). Different letters show significant differences among mean values obtained for plants exposed to different levels of ozone for two days or for four days ($p < 0.05$). * Indicates significant differences between mean values obtained after two and four days of exposure to the same ozone concentration.

O_3 (ppb)	2 days			4 days		
	F_0	F_m	$F_v:F_m$	F_0	F_m	$F_v:F_m$
0	382.5 ^a	2 271.8 ^b	0.832 ^b	380.9 ^a	2 272.0 ^a	0.832 ^a
20	395.7 ^a	2 430.7 ^a	0.837 ^a	362.7 ^a	2 177.3 ^a	0.834 ^a
40	264.3 ^b	1 420.7 ^c	0.809 ^c	324.3 ^{a*}	1 666.6 ^b	0.790 ^b
60	431.2 ^a	2 107.6 ^c	0.795 ^d	357.8 ^{a*}	1 476.7 ^{c*}	0.749 ^{c*}
80	381.8 ^a	1 855.6 ^d	0.791 ^d	347.1 ^a	1 801.3 ^{ab}	0.780 ^b

Table 2: Determination coefficient between ozone pollution descriptors and biotic parameters analyzed in plants of *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ exposed in the field (n = 198) and in fumigation chambers (n = 45).

Experiment	Exposure period	O ₃ descriptor	Leaf injury	F _v :F _m ratio	AA	SOD
Field	14 days ¹	Mean	0.10*	-	-	-
		AOT20	0.06*	-	-	-
		AOT40	0.03*	-	-	-
FA + O ₃	2 days	Mean	0.96*	-0.90*	0.48*	0.46*
	4 days	Mean	0.89*	-0.85*	0.74*	0.33*

¹ Average concentration from 8:00 am to 8:00 pm

* p < 0.05

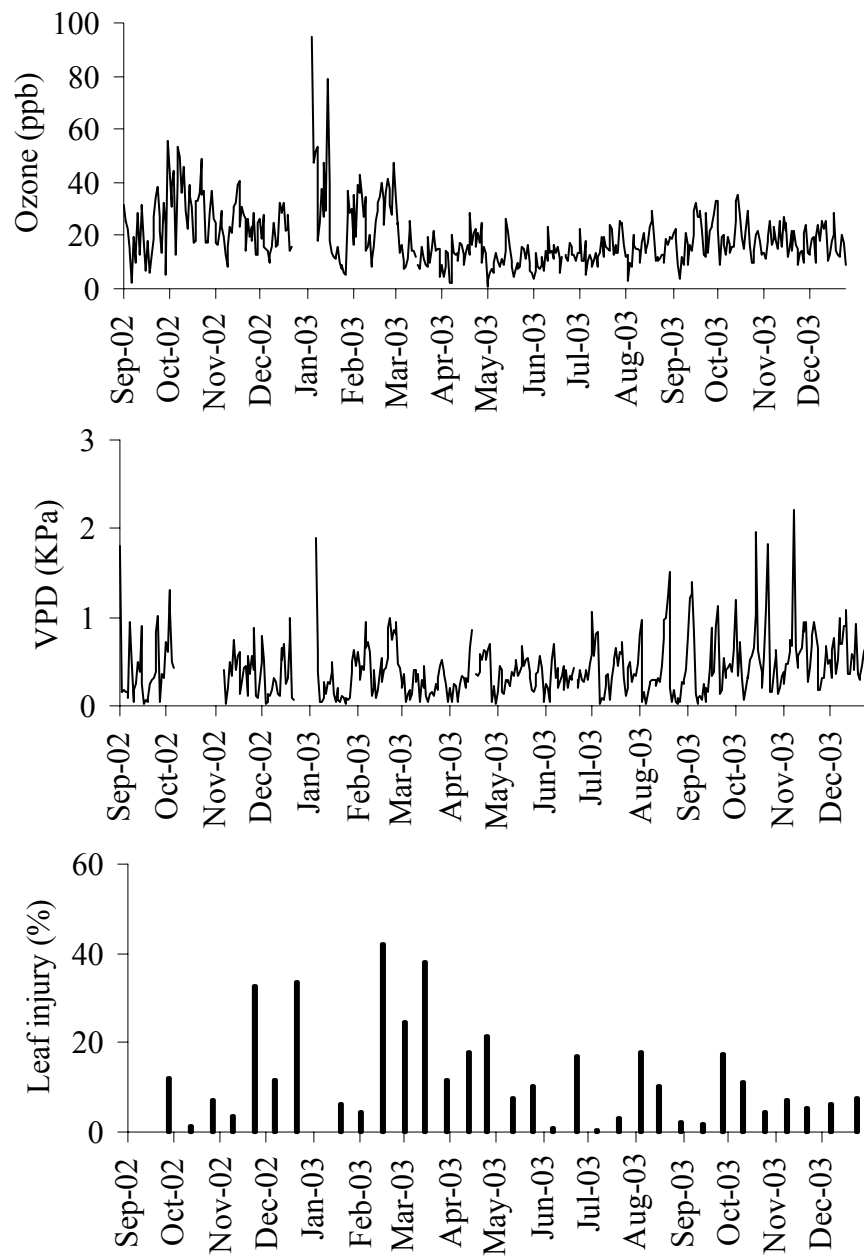


Figure 1

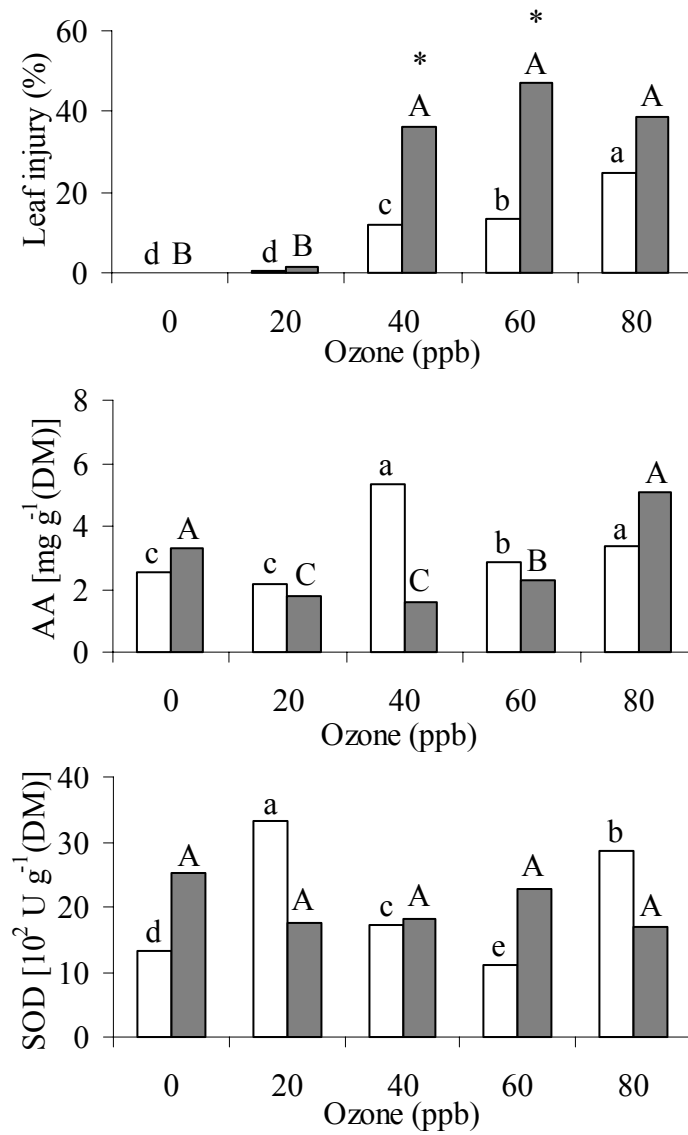


Figure 2