

MARISIA PANNIA ESPOSITO

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE NECROSES
FOLIARES INDICADORAS DE OZÔNIO
ATMOSFÉRICO E DEFESAS
ANTIOXIDATIVAS EM FOLHAS DE
Nicotiana tabacum “Bel W3”**

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

SÃO PAULO

2008

MARISIA PANNIA ESPOSITO

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE NECROSES
FOLIARES INDICADORAS DE OZÔNIO
ATMOSFÉRICO E DEFESAS
ANTIOXIDATIVAS EM FOLHAS DE
Nicotiana tabacum “Bel W3”**

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

ORIENTADORA: DRA. MARISA DOMINGOS

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Esposito, Marisia Pannia

E77e Estudo da relação entre necroses foliares indicadoras de ozônio atmosférico e defesas antioxidativas em folhas de *Nicotiana tabacum* "Bel W3" / Marisia Pannia Esposito -- São Paulo, 2008.
102 p.il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2008
Bibliografia.

1. Solanaceae. 2. Tabaco. 3. Fumigação. I. Título

CDU : 582.951.4

Dedico esse trabalho à Maria de Lourdes, Anielo,

Breno, Marco e Sheila.

“The same thing that makes you live can kill you in the end”.

Neil Young

Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pela oportunidade e condições de desenvolvimento de meu projeto.

Ao pessoal da Meteorologia do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo, pela cessão dos dados climáticos para execução de parte deste projeto.

A todo pessoal da seção de Ecologia do Instituto de Botânica: alunos, estagiários, pesquisadores e funcionários.

À Amariles, Dora, Marli e Valdenice, pela imensa ajuda dispensada aos meus experimentos, trabalhando sempre com bom humor contagiante.

Às minhas grandes amigas, poderosas biólogas, com as quais posso contar dentro e fora do trabalho: Jéssica Nobre, Silvinha Sant'Anna, Juliana Moreno, Andrea Nunes, Lilian Carminitti e Luciane Fontana. Não poderia esquecer o grande amigo Maurício Lamano, que sempre me ajudou com “forças totais” em todos experimentos.

À minha orientadora, Dra. Marisa Domingos, pela dedicação em todos momentos, pelos ensinamentos e pelo excelente modelo profissional.

À Dra. Silvia Ribeiro de Souza, por tudo que me ensinou, pela oportunidade do estágio, por toda paciência, por acreditar no meu desempenho científico, pelas risadas, conselhos, palpites, pelo ótimo exemplo de profissional, enfim, há inúmeras razões para agradecê-la!!!

À Patrícia Bulbovas, por tudo que me ensinou quando entrei na seção de Ecologia e me ensina até hoje, sempre com extrema paciência e dedicação.

À Mirian Rinaldi, por sempre me auxiliar no laboratório, fazendo com eu não o achasse um “bicho de sete cabeças”, principalmente no início de meu projeto.

À minha família (mãe, pai e irmãos), que são os pilares da minha vida e às minhas irmãs-postiças Sheila e Erica, pelos tantos e tantos anos de amizade. À mais nova e linda integrante da família: Jéssica Cristina.

Às amigas de infância Evelin Coelho e Vanessa Malverde, com as quais posso contar sempre, para minha sorte!

À Kelson Leandro Mendes, pois sei que onde quer que esteja, está muito orgulhoso por mim.

Aos amigos e professores da faculdade, que tenho tantas saudades!

À Márcia Thebas, pelo incrível alto astral e baladas tão necessárias para relaxar e esquecer do trabalho! E por sempre me enviar as fotos das baladas com rapidez!

Ao meu amor, Alexandre Varisano, por me fazer tão bem e feliz, desde o momento que nos conhecemos até hoje!

Agradeço, enfim, a todos que direta ou indiretamente fizeram este trabalho tornar-se realidade e me fizeram uma pessoa melhor.

janeiro/2008

Índice

Resumo	01
Abstract	03
Capítulo I – Introdução Geral	
Introdução	05
Referências bibliográficas	24
Capítulo II – Relações entre respostas antioxidativas e injúrias foliares em plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> “Bel W3” em ambiente poluído por ozônio, na cidade de São Paulo, Brasil	
Resumo	33
Abstract	34
Introdução	35
Material e Métodos	37
Resultados	45
Discussão	55
Referências bibliográficas	58
Capítulo III – Respostas antioxidativas em plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> “Bel W3” ao ozônio e suas relações com danos foliares	
Resumo	69
Abstract	70
Introdução	71
Material e Métodos	73
Resultados	79
Discussão	85
Referências bibliográficas	88

Capítulo IV – Discussão Geral

Discussão geral 94

Referências bibliográficas 98

Capítulo V – Conclusões Finais

Conclusões 100

Anexos 102

Resumo

O efeito tóxico do ozônio sobre os seres vivos é bastante conhecido e depende de sua concentração atmosférica, tempo de exposição e da sensibilidade do receptor. As plantas geralmente são muito sensíveis a esse gás, o qual é absorvido predominantemente via estômatos, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e criando uma situação de estresse oxidativo. As EROs são extremamente nocivas a moléculas biológicas vitais, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. A cultivar Bel W3 de *Nicotiana tabacum* é a planta bioindicadora sensível mais padronizada e mais amplamente utilizada para qualificação de níveis tóxicos de ozônio em regiões de clima temperado. Diferentes estudos vêm avaliando, sob vários aspectos, seu potencial bioindicador para a cidade de São Paulo. No presente, levantou-se a hipótese de que as variações diárias na concentração de ozônio atmosférico e/ou nas condições meteorológicas encontradas na cidade de São Paulo podem alterar as respostas antioxidativas diárias e, por conseguinte, a manifestação de necroses em folhas de *N. tabacum* Bel W3. Portanto, os objetivos traçados foram: *a)* determinar, em experimentos de campo, as relações entre as necroses foliares e respostas antioxidativas diárias (concentração de ácido ascórbico total - AA e atividade das enzimas superóxido dismutase - SOD e peroxidases - POD) em plantas de tabaco em um local da cidade de São Paulo contaminado por altos níveis de ozônio atmosférico e entre essas medidas biológicas e variações em fatores ambientais ao longo dos períodos experimentais; *b)* confirmar, em câmaras de fumigação, a existência das relações entre os mesmos indicadores de defesas antioxidativas e necroses foliares em plantas de tabaco expostas a concentrações conhecidas de ozônio atmosférico, simulando a poluição atmosférica de São Paulo. No estudo realizado em campo, a análise de regressão múltipla mostrou que 63% da variação na porcentagem de injúrias foliares ao longo de todo período experimental foi explicada por menores níveis de antioxidantes (AA e SOD) e por maiores valores de concentração atmosférica de ozônio e temperatura do ar. Já no estudo realizado

em fumigação, a redução do conteúdo de ácido ascórbico nas plantas de *N. tabacum* Bel W3 expostas a concentrações crescentes de ozônio, acompanhando o aumento da área foliar afetada por necroses, indicou claramente a sensibilidade da cultivar ao ozônio. As respostas antioxidativas dependeram do tempo de exposição e do nível de ozônio ao qual as plantas foram expostas, sendo mais intensas após dois dias de fumigação com 20 e 40 ppb de O₃, para SOD e AA total, respectivamente, apesar de não terem sido suficientes para conter danos celulares e a ocorrência de necroses foliares. Com tais resultados, fica evidente que *N. tabacum* Bel W3 pode caracterizar os níveis de ozônio em São Paulo, porém sob baixas concentrações de ozônio e por um período de exposição ideal que ainda precisa ser determinado.

Abstract

The toxic effects of ozone on living organisms are well known and depend on ozone concentration, time of exposure and sensitivity of the receiver. Usually the plants are very sensitive to this gas, which is absorbed predominantly via stomata, promoting the formation of reactive oxygen species (EROs), as anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$), and hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) and creating a situation of oxidative stress. The EROs are extremely harmful to biological molecules, as lipids, proteins and nucleic acids. The sensitive cultivar Bel W3 of *Nicotiana tabacum* is the most standardized and widely used for qualifying toxic levels of ozone in regions of temperate climate. Its bioindicator potential for biomonitoring ozone in the city of São Paulo has been evaluated in several studies. In the present, we raised the hypothesis that variations in the concentration of atmospheric ozone and/or weather conditions in São Paulo can promote daily antioxidative responses and, consequently, can alter the occurrence of leaf necroses in *N. tabacum* Bel W3. Therefore, the goals were: *a*) to determine, under field conditions, the relationship between the extent of leaf area covered by necroses and daily antioxidative responses (concentration of ascorbic acid - AA and activity of the enzymes superoxide dismutase - SOD and peroxidases - POD) in plants of tobacco exposed in one site of the city of São Paulo affected by high levels of ozone and between these biological measurements and variations in environmental factors during the experimental periods; *b*) to confirm, in fumigation chambers, the existence of relations between the same indicators of antioxidative defenses and leaf necroses in tobacco plants exposed to known concentrations of atmospheric ozone, simulating atmospheric pollution in São Paulo. In the field study, multiple regression analysis showed that 63% of the variation in the percentage of leaf injury in the whole experimental period were explained by lower levels of antioxidants (AA and SOD) and higher values of atmospheric concentration of ozone and of air temperature. In the fumigation study, the reduction in the content of ascorbic acid in plants of *N. tabacum* Bel W3 exposed to increasing concentrations of ozone was followed by the increase in leaf area

affected by necroses, being a clear indication of the sensitivity of the plant to ozone. The antioxidative responses depended on the interval of exposure time and on the level of ozone to which the plants were exposed. More intense responses were observed after two days of exposure to 20 and 40 ppb O₃, for SOD and AA, respectively, although they were not sufficient to avoid cell injury and the occurrence of leaf necroses. We concluded that *Nicotiana tabacum* Bel W3 can characterize the levels of ozone in Sao Paulo, under low concentrations of ozone and for an interval of exposure time that still remains undetermined.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

A atmosfera é constituída por cinco camadas distintas, definidas com base na variação da temperatura ao longo de sua extensão vertical desde a superfície terrestre, denominadas, da mais externa para a mais interna, como exosfera, termosfera, mesosfera, estratosfera e troposfera, as quais são mostradas na Figura 1 (Brasseur *et al.* 1999, Domingos *et al.* 2002, Mackenzie 2003).

A estratosfera, em particular, que se estende por 12 a 48 km de altitude, apresenta extrema importância para a manutenção da vida na troposfera. Nessa camada, a radiação ultravioleta oriunda do sol, responsável por causar danos nos seres vivos, é absorvida pela camada de ozônio (O₃), situada nos dois terços superiores da estratosfera, aproximadamente entre 24 e 49 km acima da superfície terrestre. Essa camada, além de proteger a vida do planeta contra a radiação UV, também limita a intensidade luminosa na troposfera (Krupa & Manning 1988, Mackenzie 2003).

A troposfera, a camada onde vivemos, por ser a mais baixa de todas (até aproximadamente 12 km acima da superfície terrestre), é a mais quente e a mais densa, e contém 90% de todo o ar da atmosfera. Logo acima há uma camada limítrofe entre a estratosfera e a troposfera, denominada tropopausa. A distância da tropopausa em relação ao solo varia conforme as condições climáticas da troposfera, da temperatura do ar e da latitude, entre outros fatores. Se existe na troposfera uma agitação climática com muitas correntes de convecção, a tropopausa tende a subir. Isto ocorre devido ao aumento do volume de ar na troposfera, que provocará conseqüentemente o aumento da tropopausa, empurrando-a para cima. Ao subir a tropopausa esfria, pois o ar acima dela é mais frio.

Na troposfera, os processos químicos atmosféricos são intensificados, assim como há um acúmulo de poluentes emitidos por diversas atividades antrópicas.

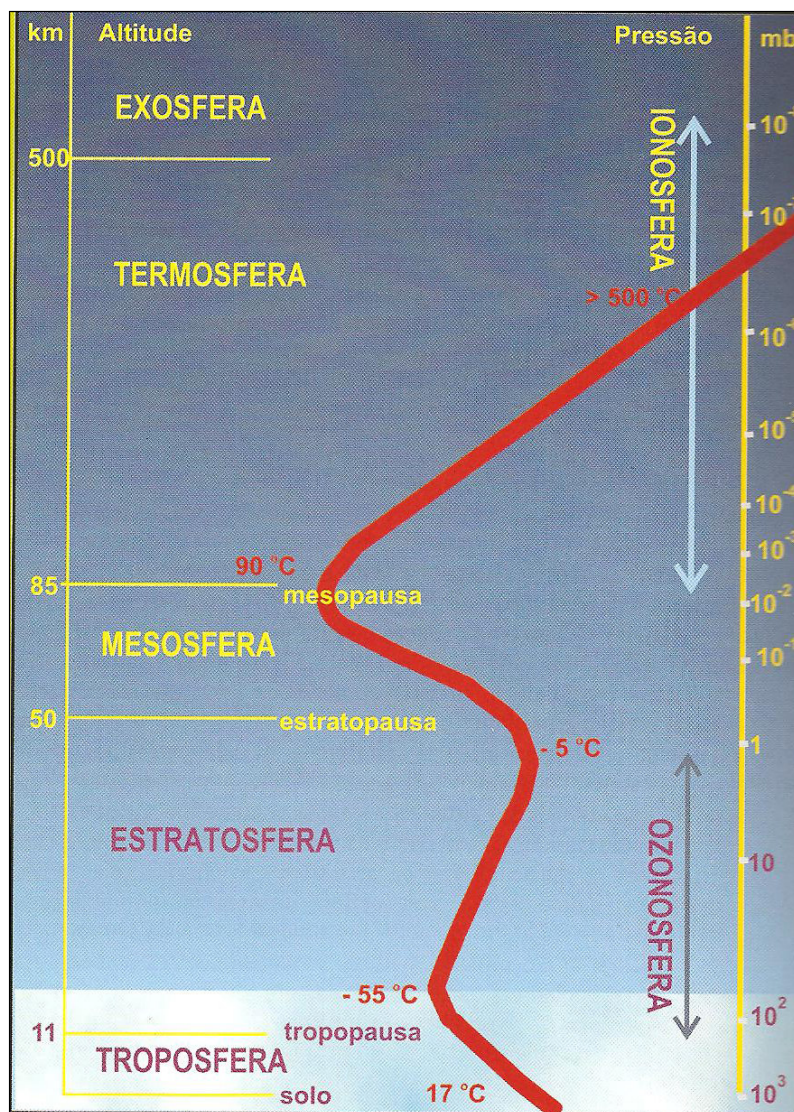


Figura 1. Diagrama mostrando os sistemas de classificação da estrutura da atmosfera em função da pressão. (Domingos *et al.* 2002).

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

Compostos diretamente emitidos pelas fontes poluidoras, como óxidos de enxofre, nitrogênio e carbono, material particulado, entre inúmeros outros, são referidos como poluentes primários e aqueles formados na troposfera, a partir de reações entre poluentes primários e constituintes naturais da atmosfera, como o ozônio e o ácido nítrico (HNO_3), são denominados poluentes secundários (Mayer 1999, Baird 2002, Domingos *et al.* 2002, Raven *et al.* 2007).

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

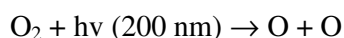
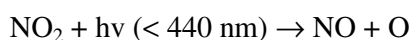
O *smog* [uma combinação de *smoke* (fumaça) e de *fog* (neblina)] fotoquímico é um processo de formação de poluentes secundários na troposfera na presença de luz solar. Seus precursores são principalmente provenientes das emissões de automóveis. A manifestação mais evidente desse *smog* é uma neblina de tonalidade amarela-amarronzada, que se deve à presença no ar de pequenas gotas de água contendo produtos derivados das reações fotoquímicas. Ele apresenta com frequência um odor desagradável devido a alguns de seus componentes. Os produtos intermediários e finais das reações que ocorrem no *smog* fotoquímico afetam a saúde humana e podem causar danos às plantas, aos animais e a alguns materiais (Baird 2002).

Os precursores mais importantes do *smog* fotoquímico são os óxidos de nitrogênio e os hidrocarbonetos, que são provenientes da queima incompleta dos combustíveis nos motores de veículos e em outras fontes (Nebel & Wright 2000, Baird 2002), dando origem a compostos como o ácido nítrico (HNO_3), nitrato de peroxiacetila (PAN) e o ozônio (O_3). Este último tem sido, certamente, um dos poluentes mais estudados, devido a sua alta toxicidade (Farrell 2005).

O ozônio é um gás irritante, triatômico e fracamente solúvel em água. Possui um cheiro característico picante, e seu nome é derivado do grego *Ozein*, que significa “cheirar”.

Apresenta duplo papel. Na estratosfera, conforme já mencionado anteriormente, é de suma importância para a manutenção da vida, pois absorve os raios UV. Já na troposfera, ele é altamente tóxico para os seres vivos em geral.

O ozônio pode ser formado a partir da junção do oxigênio molecular com o oxigênio atômico na presença de um corpo receptor de energia (Kruppa & Manning 1988). Esse oxigênio atômico pode ser oriundo da dissociação do dióxido de nitrogênio sob um comprimento de onda de 440 nm ou da dissociação do oxigênio molecular num comprimento de onda de 200 nm, conforme a equação abaixo:

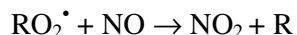
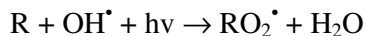


onde M pode ser considerado uma partícula ou gotícula de água.

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



Entretanto, numa condição atmosférica poluída, o monóxido de nitrogênio (NO) pode ser consumido por radicais orgânicos provenientes de reações químicas atmosféricas ou mesmo por hidrocarbonetos emitidos da vegetação local, de modo que o ozônio não é consumido e conseqüentemente é acumulado na troposfera, como demonstrado nas equações abaixo (Seinfeld 1989, Miguel 1992, Souza *et al.* 1997, Sillman 1999, Sawyer *et al.* 2000, Manahan 2005):



Além da complexidade do sistema de reações químicas, fatores meteorológicos e topográficos fazem com que os gases precursores emitidos sejam transportados a vários

locais, às vezes distantes das fontes, resultando em acúmulo de ozônio em locais distintos das áreas onde ocorreram as emissões (Seinfeld 1986, Peñuelas *et al.* 1999, CETESB 2006).

A alta toxicidade do ozônio é decorrente de seu caráter oxidativo, que promove a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos tecidos. Estas descaracterizam moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando, entre outras conseqüências a peroxidação lipídica, oxidação dos grupos sulfidril (-SH) e a outros processos oxidativos de destruição (Nebel & Wright 2000, Manahan 2005, Halliwell & Gutteridge 2007).

Com relação aos efeitos do ozônio na saúde humana, as ocorrências mais relatadas são irritações nos olhos e nas vias respiratórias e o agravamento de doenças respiratórias pré-existentes, como a asma. Sabe-se que a exposição repetida ao ozônio pode tornar as pessoas mais suscetíveis a infecções respiratórias e à inflamação nos pulmões. Adultos e crianças saudáveis também estão sujeitos aos efeitos danosos causados pelo ozônio se expostos a níveis elevados durante a prática de exercícios físicos (WHO 1979).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda como valor máximo para um período de 8 horas a concentração de $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (ou 60 ppb) de ozônio para a proteção da saúde humana, recomendação esta seguida pelos países do Leste Europeu. Já a Polônia, também situada no leste europeu, considera que em 30 minutos a concentração de ozônio atmosférico não deve exceder $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$, ou 50 ppb. (Godzik 1997).

No Brasil, onde também têm sido observadas elevações nas concentrações de ozônio atmosférico nos grandes centros urbanos, fez-se necessário o estabelecimento de limites legais que visam especialmente à proteção da saúde humana. O padrão legal (PQAR - Padrão de Qualidade do Ar) de $160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (80 ppb), para um período de uma hora, foi estabelecido no decreto estadual 8468/76 e na Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) 03/90. Este tem sido diversas vezes ultrapassado na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), em Cubatão e no interior de São Paulo (CETESB 2006).

Medições efetuadas pela CETESB em seu relatório de qualidade do ar, realizado na Operação Inverno 2006, mostraram que as concentrações de ozônio em São Paulo não só ultrapassaram o PQAR, mas também atingiram frequentemente valores horários entre 200 a 800 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (100 a 400 ppb). Altas concentrações de ozônio são frequentemente observadas nos meses mais quentes, na primavera e no verão. Porém, têm sido observados picos de ozônio e ultrapassagens do PQAR no período de inverno (CETESB 2006).

Ozônio é igualmente tóxico às plantas. Ele, assim como outros poluentes gasosos, penetra na planta diretamente pelos estômatos, durante o processo de trocas gasosas, podendo provocar efeitos fisiológicos, metabólicos, ultraestruturais e estruturais, que levam a sintomas como cloroses e necroses em tecidos e órgãos, que podem evoluir e levar a morte do indivíduo (Manning & Feder 1980, Larcher 2000).

Esses efeitos são, também, de natureza oxidativa, uma vez que o ozônio, após ser absorvido pela planta através do estômato, reage rapidamente com água, o que leva à formação das EROs na interface da parede celular e à destruição oxidativa dos lipídios e proteínas da membrana plasmática e a produção em cadeia de outros radicais livres e demais intermediários reativos (Mehlhorn *et al.* 1990, Schraudner *et al.* 1998, Kanofsky & Sima 2005, Pucckette *et al.* 2007). Toda essa situação gera o denominado estresse oxidativo. Entre outros fatores que geram uma condição de estresse oxidativo no ambiente, além da poluição atmosférica, incluem-se herbicidas, metais pesados, seca, calor, frio, ferimentos na planta e alta intensidade luminosa.

No entanto, cabe lembrar que as EROs são produzidas pelas plantas em seu metabolismo normal, como ocorre na respiração e na fotossíntese. Elas são formadas durante certas reações redox e durante a redução incompleta do oxigênio ou oxidação da água pela cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto ou na mitocôndria. A formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) estimula subsequente a produção de outras EROs, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânions superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila ($\text{HO}^{\bullet}$) e peridroxilas

($\text{O}_2\text{H}^\bullet$). Os ânions superóxido são produzidos nos cloroplastos quando os elétrons são transferidos diretamente do Fotossistema I (PSI) para o oxigênio. Estas moléculas reativas, especialmente $\text{HO}^\bullet$, são altamente destrutivas para os lipídios, ácidos nucleicos e proteínas. No entanto, EROs como $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 são utilizados na lignificação e funcionam também como um sinal de resposta de defesa contra infecções por patógenos (Bray *et al.* 2000).

Diante disso, as plantas, assim como outros seres vivos, dispõem de um sistema de defesas antioxidativas, situado em diversos compartimentos sub-celulares, capaz de evitar danos oxidativos de origem fisiológica. Entre as principais funções desse sistema, destacam-se a remoção de radicais livres, a minimização na disponibilidade de pró-oxidantes – como íons ferro e cobre – e a proteção de biomoléculas contra possíveis danos em suas estruturas (Halliwell & Gutteridge 2007). De acordo com Muggli (1993), os principais componentes desse sistema de defesas antioxidativas podem ser divididos em: *a*) enzimáticos, encontrados principalmente em meio intracelular (superóxido dismutase, catalase, e glutationalas peroxidase, transferase e redutase) e *b*) pequenas moléculas não-enzimáticas, que podem ser subdivididas em solúveis em água (ácido ascórbico, bilirrubina e glutationalas) ou solúveis em lipídios (α -tocoferol, β -caroteno e licopeno).

O ácido ascórbico (AA), em particular, é uma pequena molécula antioxidante, não enzimática e hidrossolúvel, que executa funções metabólicas essenciais para a vida de plantas e animais. Alguns fungos podem sintetizar ácido eritro-ascórbico, uma vitamina C análoga com funções metabólicas similares. Entre os procariontes, somente as cianobactérias possuem uma pequena quantidade de ácido ascórbico (Arrigoni & De Tullio 2002). O ácido ascórbico serve como co-fator para muitas enzimas (De Tullio *et al.* 1999, Arrigoni & De Tullio 2000) e contribui para a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (Smirnoff & Wheeler 2000, Conklin 2001, Conklin & Barth, 2004). Essa atividade antioxidante do ácido ascórbico está associada com sua resistência ao estresse oxidativo e longevidade em plantas e animais. Além do mais, tem-se sugerido que os níveis endógenos de ácido ascórbico são

importantes na regulação do desenvolvimento da senescência e na defesa das plantas contra patógenos (Pastori *et al.* 2003, Barth *et al.* 2004, Pavet *et al.* 2005). Evidências recentes sugerem que o ácido ascórbico também desempenha papel na indução floral. Ele pode ser encontrado no citossol, em cloroplastos, nos vacúolos e no apoplasto (Barth *et al.* 2006). Segundo Smirnoff (1996), o ascorbato é o principal metabólito secundário das plantas. Dentro do aparato fotossintético, o ácido ascórbico participa da remoção do peróxido de hidrogênio, formado na foto-redução do Fotossistema I. Essa reação entre ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio é catalisada pela ascorbato peroxidase, que se encontra na divisa do tilacóide e também pode neutralizar o peróxido de hidrogênio. Segundo Conklin & Barth (2004), o ácido ascórbico atua como primeira linha de defesa nas plantas superiores, uma vez que ele se encontra em grande concentração no apoplasto, apresentando dessa forma um efeito direto na proteção contra o ozônio troposférico.

A superóxido dismutase (SOD) é uma substância enzimática que catalisa a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio. Dentro da célula, a SOD é a primeira linha de defesa das plantas contra espécies reativas de oxigênio (Alscher & Hess, 1993). O O_2^- é produzido em todos locais onde a cadeia transportadora de elétrons encontra-se presente e, portanto, a ativação do O_2 pode ocorrer em diferentes compartimentos da célula (Elstner 1991) incluindo mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos, apoplasto e citossol. Neste caso, não é de surpreender que a SOD possa ser encontrada em todos esses compartimentos subcelulares. Embora todos compartimentos celulares possam ser sítios possíveis de formação de O_2^- , os cloroplastos, a mitocôndria e os peroxissomos são as organelas nas quais a maior parte das espécies reativas de oxigênio é formada (Fridovich 1986). Três classes de SOD foram identificadas, dependendo dos metais presentes em seu sítio ativo: cobre/zinco SOD, manganês SOD e ferro SOD. Em plantas superiores, a FeSOD é encontrada nos plastídeos, a MnSOD na matriz mitocondrial e a Cu/Zn SOD no citossol

(Bannister *et al.* 1987). Em folhas senescentes, as atividades da SOD tendem a diminuir, ao passo que a peroxidação lipídica tende a aumentar.

Entre as peroxidases, a ascorbato-peroxidase é uma substância enzimática que desempenha importante papel na decomposição do peróxido de hidrogênio. Segundo Iqbal *et al.* (1996), a atividade das peroxidases aumenta nas plantas à medida que ocorrem choques mecânicos, aumento da poluição aérea e sazonalidade climática.

Essas e outras substâncias atuam em conjunto em um ciclo de defesas antioxidativas chamado de Halliwell-Asada, conhecido também por ciclo ascorbato-glutationa (Figura 2). Nesse ciclo esquemático, um radical superóxido é eliminado pela superóxido dismutase numa reação que produz peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é consumido através da sua conversão em oxigênio e água pela catalase ou somente em água através da oxidação do ascorbato. O ascorbato é regenerado por meio de dois mecanismos: através da redução enzimática do monodeidroascorbato, que ocorre nos plastídeos, ou alternativamente, o monodeidroascorbato, que é dismutado espontaneamente em deidroascorbato, pode reagir com a glutatona (GHS), produzindo ascorbato e glutatona oxidada (GSSH), numa reação catalisada pela deidroascorbato redutase. A GSSH é reduzida pela glutatona redutase, utilizando o consumo de NADPH. O oxigênio singlete e os íons hidroxila são eliminados no ciclo da glutatona. Os danos provocados pelo oxigênio singlete e íons hidroxila podem ser também minimizados por antioxidantes não enzimáticos, vitamina E e carotenóides (Bray *et al.* 2000).

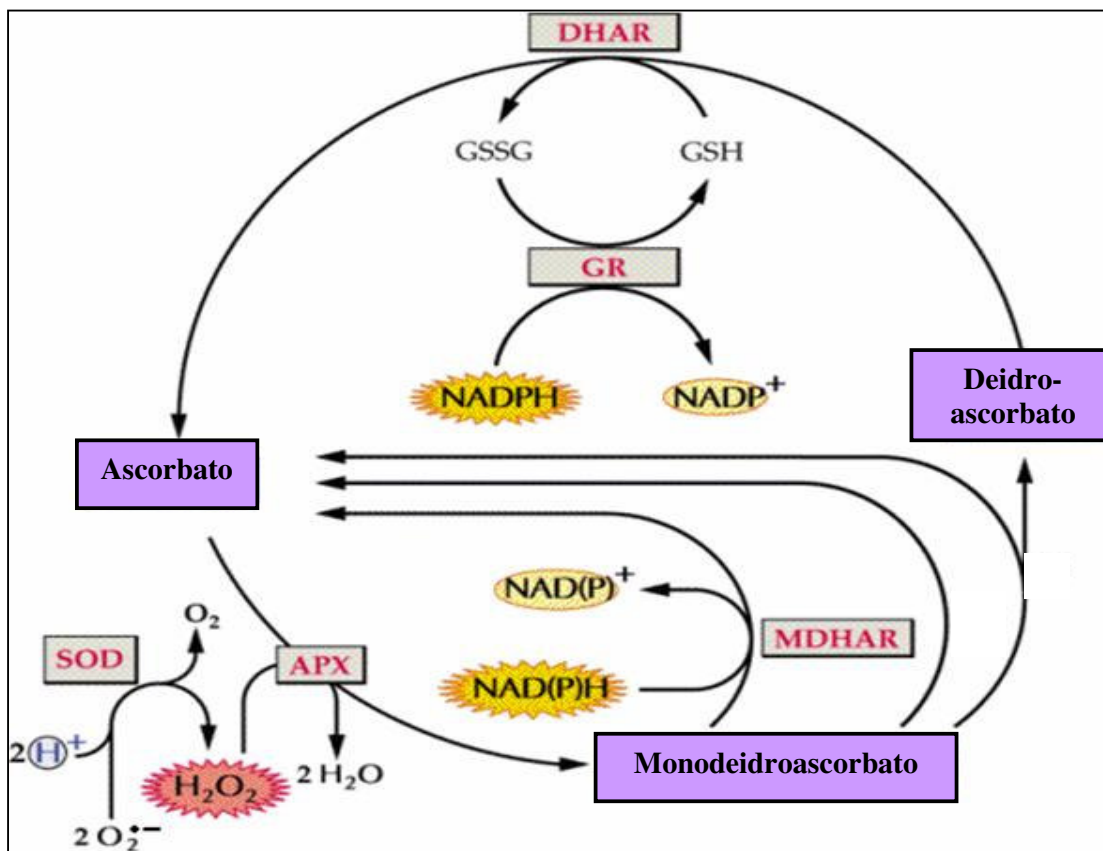


Figura 2. Ciclo ascorbato-glutationa (adaptado de Bray *et al.* 2000). **APX** – ascorbato peroxidase; **DHAR** – deidroascorbato redutase; **GR** – glutathione redutase; **GSH**– glutathione reduzida; **GSSG** – glutathione oxidada; **SOD** – superóxido dismutase; **MDHAR** – monodeidroascorbato redutase.

Esse ciclo, na ausência de espécies reativas de oxigênio em excesso, mantém o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante nas células. Porém, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos mencionados fatores ambientais de estresse oxidativo, pode levar à alteração desse equilíbrio, momento em que os danos oxidativos podem acontecer (Muggli 1993, Bray *et al.* 2000). Como já mencionado anteriormente, o ozônio é um forte oxidante, que pode levar à rápida alteração desse equilíbrio, especialmente em plantas sensíveis, promovendo danos em nível molecular (em lipídios e ácidos graxos, proteínas, pigmentos e

ácidos nucléicos), celular (em membranas, perda da função de organelas, redução da eficiência do metabolismo, redução da fixação do carbono, mutações, morte) e tecidual, quando surgem injúrias visíveis na superfície da folha (Scandalios 1993).

Segundo Krupa & Manning (1988), as injúrias foliares provocadas por ozônio, em plantas com folhas largas, surgirão primeiramente na superfície adaxial da folha e entre as nervuras, já que as células paliçádicas do mesofilo, situadas logo abaixo da epiderme superior, são suscetíveis ao ozônio. Em coníferas e plantas com células mesofílicas indiferenciadas, os sintomas podem ocorrer em ambas superfícies adaxial e abaxial ou somente perto do estômato afetado por ozônio. Em muitas plantas, as injúrias provocadas por ozônio são delimitadas nas extremidades das folhas mais jovens, tornando-se mais extensas nas folhas maduras. Folhas ainda em expansão ou que atingiram seu tamanho máximo são mais suscetíveis ao ozônio (Lacasse & Treshow 1976).

Como se pode observar na Figura 3, as injúrias foliares provocadas pela exposição ao ozônio podem ser classificadas como agudas - necroses e pontuações - ou crônicas - pigmentação, clorose e senescência prematura (Krupa *et al.* 2000).

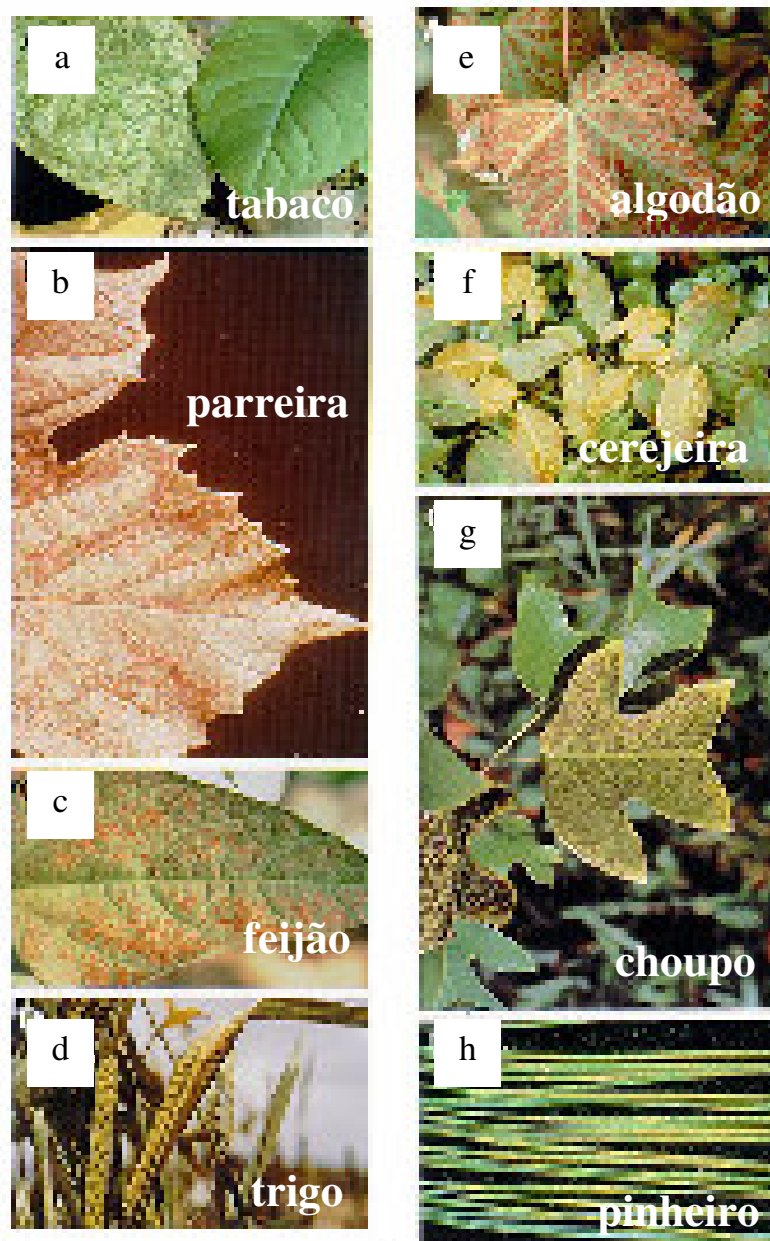


Figura 3. Sintomas de injúria foliares provocadas por ozônio: *necroses*, no tabaco (a) e no feijão (c); *pontuações*, na parreira (b), cerejeira (f) e choupo (g); *pigmentações*, no algodão (e); *cloroses*, no trigo (d) e no pinheiro (h) e *senescência prematura*, também no algodão (e) (Adaptado de Krupa *et al.* 2000).

Tais injúrias visíveis, que ocorrem nas plantas em resposta à exposição ao ozônio, têm sido utilizadas como importante ferramenta no biomonitoramento da qualidade do ar.

Segundo Klumpp (2001), o biomonitoramento pode ser conceituado como o uso de seres vivos para a verificação e avaliação dos efeitos da poluição ambiental, seja da água, do ar ou do solo. Os seres vivos, bioindicadores, são organismos ou comunidades de organismos que reagem a alterações ambientais com a modificação de suas funções vitais normais e/ou da sua composição química, permitindo assim conclusões a respeito das condições ambientais (Arndt & Schweizer 1991). O biomonitoramento pode ser classificado como qualitativo ou quantitativo. O biomonitoramento qualitativo é aquele baseado em decisões do tipo sim/não, como por exemplo, a presença ou ausência de espécies, ou em atributos que predominantemente mudam em resposta a influências ambientais. Já o biomonitoramento quantitativo, que deve servir, em tese, para indicar níveis de contaminação atmosférica por determinados poluentes, requer mais trabalho, pois envolve medidas de alguma natureza e exige padronizações.

Existem diversas nomenclaturas para classificar as plantas utilizadas em programas de biomonitoramento. Porém, uma das mais recentes, proposta por De Temmerman *et al.* (2004) com base em extensa revisão bibliográfica, parece bastante adequada, por classificar as plantas de acordo com o tipo de resposta bioindicadora predominante que apresentam. Assim, de acordo com esses autores, temos: a) plantas biosensoras ou biomarcadoras, que são aquelas que mostram danos “invisíveis”, em níveis celular, molecular, bioquímico ou fisiológico (ex: clones de *Tradescantia*, que mostram alterações cromossômicas); b) plantas bioacumuladoras, que são consideradas tolerantes, por acumularem elementos da poluição do ar e partículas em seus tecidos (ex: *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* cv. Lema, cultivar acumuladora de metais pesados, enxofre, flúor); c) comunidades de plantas apontadoras, nas quais observam-se mudanças na composição em espécies ou nas relações fitossociológicas entre as espécies (ex: comunidades de líquens) e d) plantas bioindicadoras, que são sensíveis e mostram sintomas visíveis, como necroses ou cloroses (ex: *Nicotiana tabacum* Bel W3, bioindicadora de ozônio).

O biomonitoramento com plantas é considerado uma ferramenta vantajosa, pois os métodos utilizados são efetivos para indicar a presença e, em certos casos, estimar os níveis de poluentes aéreos e seus impactos sobre os receptores biológicos, além de permitir monitorar riscos impostos por vários poluentes aos seres vivos.

Um programa de biomonitoramento que obteve sucesso foi o EUROBIONET (rede européia para avaliação da qualidade do ar utilizando plantas bioindicadoras), realizado entre 2000 e 2003. Este foi coordenado por pesquisadores da Universidade de Hohenheim, na Alemanha e envolveu 10 países europeus. As plantas bioindicadoras utilizadas foram o choupo (*Populus nigra*), o clone 4430 de *Tradescantia* (proveniente de um híbrido entre *T. subcaulis* e *T. hirsutifolia*), azevém (*Lolium multiflorum* ssp. *italicum* cv. Lema), couve (*Brassica oleracea achepala*) e tabaco (*Nicotiana tabacum* Bel W3). Os objetivos desse programa foram estabelecer o uso de plantas bioindicadoras para avaliar a qualidade do ar na Europa e transferir conhecimentos e métodos na área de biomonitoramento para instituições científicas e repartições públicas (Klumpp *et al.* 2001). Nesse programa, por exemplo, foi possível mapear com sucesso as áreas mais e menos afetadas por ozônio nas diferentes cidades envolvidas, independentemente de sua localização geográfica, utilizando plantas de *N. tabacum* ‘Bel-W3’ (Klumpp *et al.* 2006).

A cultivar Bel W3 de *Nicotiana tabacum* é uma planta bioindicadora sensível ao ozônio, muito utilizada em programas de biomonitoramento. Trata-se de uma espécie herbácea dicotiledônea pertencente à família Solanaceae (Cronquist 1981). Segundo Heggstad (1991), o início da padronização de *N. tabacum* ‘Bel W3’ como bioindicadora de ozônio data de 1957, com o início de pesquisas para determinar as causas de manchas que surgiam nas folhas das plantações de tabaco em Connecticut Valley, em determinadas épocas do ano. Essas manchas eram inicialmente atribuídas ao clima, sendo referidas como *weather flecks*. No ano seguinte, no sul da Califórnia, pesquisas científicas atribuíram ao ozônio a responsabilidade pelo surgimento de danos foliares em parreiras. Em 1959, ainda nos Estados

Unidos, foi realmente constatado que o ozônio era responsável pelos danos em parreiras e apresentavam similaridade com o tabaco. Nesse mesmo ano, diversos estudos californianos concluíram que o ozônio também era responsável pelas manchas no tabaco. Há 3 cultivares de tabaco, bem definidas quanto à sensibilidade ao ozônio: a cultivar Bel B, que é considerada resistente; a cultivar Bel C, que é considerada intermediária e a Bel W3, a cultivar sensível. Em 1962, a cultivar Bel W3 foi recomendada como as primeiras plantas bioindicadoras de ozônio (Heggstad 1991).

Nicotiana tabacum Bel W3, devido a sua alta sensibilidade, manifesta sintomas foliares visíveis rapidamente, quando exposta sob baixos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, os quais são muitos característicos e facilmente quantificáveis (Heggstad 1991). As necroses 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 adaxial, com o tempo tornam-se de cor prata a bege e então marrom clara (Figura 4). O protocolo de métodos para utilização dessa planta em biomonitoramento, do cultivo à exposição em campo e à avaliação das injúrias foliares, tem sido constantemente revisado e atualizado pelo VDI (Verein Deutscher Ingenieure), órgão alemão responsável pela definição e atualização dos protocolos relacionados ao biomonitoramento com plantas. O protocolo mais recente encontra-se descrito em VDI 2003.



Figura 4. Necroses (representadas em 30%) tipicamente induzidas por ozônio em folhas de *N. tabacum* Bel W3.

Neste protocolo há recomendação de que as necroses sejam mentalmente agrupadas e, então, seja estimado o quanto da área foliar é ocupada pelas mesmas, que as estimativas sejam sempre feitas somente para necroses típicas e que estas sejam feitas sempre pela mesma pessoa, previamente treinada na metodologia. Assim, assume-se que erros de quantificação durante a avaliação visual são de importância secundária em relação à variação normal dos efeitos entre as plantas introduzidas no mesmo local.

Existem equipamentos e programas de computador capazes de calcular a área foliar total, entretanto, a estimativa da área necrosada é mais difícil, uma vez que tais equipamentos ou programas específicos não têm sensibilidade suficiente para identificar as diferentes tonalidades das cloroses e necroses. Em função desse fato e da praticidade e dos bons resultados alcançados, a estimativa visual tem sido adotada na grande maioria dos estudos em

que se empregam técnicas de biomonitoramento com plantas sensíveis e naqueles em que são feitos mapeamentos em grande escala dos efeitos de poluentes atmosféricos sobre florestas nos continentes europeu e americano, com base em sintomas foliares visíveis.

O tabaco já foi amplamente utilizado para avaliação dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio em países de clima temperado. 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 Catalunha (Espanha) seguiu o padrão de concentração de ozônio. Klumpp *et al.* (2006), como mencionado anteriormente, expuseram o tabaco em várias cidades européias e observaram qualitativamente, com eficiência, o impacto do ozônio em áreas urbanas, suburbanas e rurais.

Outros estudos analisaram os efeitos do ozônio, em nível bioquímico e histoquímico em plantas de tabaco, confirmando sua alta sensibilidade ao estresse oxidativo induzido pelo poluente. Langebartels *et al.* (2002) constataram que o acúmulo de peróxido de hidrogênio no tabaco ocorre no espaço extracelular, ao redor das células paliçádicas. Esses locais de acúmulo de peróxido de hidrogênio correspondem aos locais onde ocorre morte celular em cultivares de tabaco e tomate, gerando futuros danos. Baker *et al.* (2002) constataram que células saudáveis de tabaco e de tomate apresentam depósitos extracelulares significantes de compostos fenólicos, que atenuam a explosão oxidativa resultante de estresse, como ataques de micróbios. Schraudener *et al.* (1998) fumigaram plantas de tabaco Bel W3 e Bel B e corroboraram alguns resultados de Langebartels *et al.* (2002): a cultivar Bel W3 apresenta um acúmulo de peróxido de hidrogênio, considerado o local inicial da explosão oxidativa.

No Brasil, a cultivar Bel W3 de tabaco também foi utilizada em biomonitoramento qualitativo. Klumpp *et al.* (1994) e Domingos *et al.* (1998) estudaram a região de Cubatão, no estado de São Paulo, e verificaram que quanto mais distantes das fontes de poluição, maiores eram as porcentagens de danos foliares. Sant'Anna (2007), em sua tese de doutorado, avaliou o potencial de uso de *N. tabacum* Bel W3 como bioindicadora de ozônio

na cidade de São Paulo, utilizando para isso o parâmetro de dano foliar relacionado à concentração de ozônio atmosférico. Com esse trabalho, a autora confirmou que, nas nossas condições atmosféricas, a planta utilizada foi eficiente para distinguir as áreas e as épocas do ano mais e menos contaminadas por ozônio, ou seja, também para biomonitoramento qualitativo. Porém, a variação da porcentagem de danos foliares foi pouco explicada por variação na concentração de ozônio, fato que deveria ocorrer para que se pudesse utilizá-la de forma padronizada para biomonitoramento quantitativo. A autora verificou que fatores climáticos e, possivelmente, outros poluentes oxidativos presentes na atmosfera urbana de São Paulo, ao atuarem sobre as plantas, interferem na relação entre danos foliares e níveis de ozônio na atmosfera.

Aliás, diversos autores já demonstraram que as variações meteorológicas também interferem na eficiência da resposta bioindicadora de *N. tabacum* Bel W3, sob condições de clima temperado. Koppel & Sild (1995) constataram que as condições climáticas foram importantes para explicar o efeito de ozônio sobre essa cultivar na Estônia. Antonielli *et al.* (1997) e Finnan *et al.* (1996) afirmaram que a radiação foi fator importante para determinar seu grau de sensibilidade em estudos realizados na Itália e Irlanda, respectivamente. Peñuelas *et al.* (1999) também verificaram em seu estudo que a fitotoxicidade do ozônio, na Espanha, varia fortemente em diferentes estações e períodos, dependendo de fatores como temperatura, umidade e ventos, que atuam na abertura e fechamento dos estômatos.

Certamente os fatores meteorológicos afetam as trocas gasosas, regulando, também, o fluxo de ozônio para o interior das plantas e, assim, a intensidade de necroses foliares, conforme foi mencionado pelos citados autores e por Klumpp *et al.* (2006). Mas, é possível supor também que as variações na concentração de ozônio e/ou nas condições meteorológicas podem alterar as respostas antioxidativas diárias e, por conseguinte, a manifestação de danos foliares em *N. tabacum* Bel W3. Esta foi a hipótese testada no presente trabalho.

Portanto, os objetivos traçados foram:

- a) Determinar, em experimentos de campo, as relações entre as necroses foliares e respostas antioxidativas diárias (concentração de ácido ascórbico total e atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidases) em plantas de tabaco em um local da cidade de São Paulo contaminado por altos níveis de ozônio atmosférico e entre essas medidas biológicas e variações em fatores ambientais ao longo dos períodos experimentais;
- b) Confirmar, em câmaras de fumigação, a existência das relações entre os mesmos indicadores de defesas antioxidativas e necroses foliares em plantas de tabaco expostas a concentrações conhecidas de ozônio atmosférico, simulando a concentração de O₃ que ocorre na cidade de São Paulo.

Os resultados serão apresentados nos capítulos a seguir. No capítulo II, será abordado o experimento realizado em campo e, no capítulo III, serão apresentados os resultados dos experimentos realizados em câmaras de fumigação. Finalmente, o capítulo IV será destinado para a discussão conjunta de todos os resultados obtidos.

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.

Alscher, R.G. & Hess, J.L. 1993. Antioxidants in higher plants. Boca Raton: CRC Press.

- Arrigoni O. & De Tullio, M.C.** 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology* 157: 481-488.
- Arrigoni O. & De Tullio, M.C.** 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* 1569: 1 – 9.
- Bannister, J.V.; Bannister, W.H. & Rottilo. G.** 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews Biochemistry* 22: 111 – 180.
- Baird, C.** 2002. *Química Ambiental*. 2^a ed. Bookman. pp. 1 – 622.
- Barth C.; Moeder, W.; Klessig, D.F. & Conklin, P.L.** 2004. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1. *Plant Physiology* 134: 1784 – 1792.
- Barth, C.; De Tullio, M. & Conklin, P.L.** 2006. The role of acid ascorbic in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* 57 (8): 1657 – 1665.
- Baker, C.J.; O'Neill, N.R.; Deahl, K. & Lydon. J.** 2002. Continuous production of extracellular antioxidants in suspension cells attenuates the oxidative burst detected in plant microbe interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 40 (6): 641 – 644.
- Brasseur, G.P.; Orlando, J.J. & Tyndall, G.S.** 1999. *Atmospheric Chemistry and Global Change*. Oxford University Press, Inc. pp. 1 – 654.
- Bray, E.A.; Baylei-Serres, J. & Werentilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. 2000 eds). American Society of Plant Physiologists. USA, New York, pp. 1158 – 1203.
- CETESB.** 2006. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2005. Série Relatórios. Secretaria do Estado do Meio Ambiente.

- Conklin, P.L.** 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment* 24: 383 – 394.
- Conklin, P.L. & Barth, C.** 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment* 27: 959 – 971.
- Cronquist, A.** 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University press, New York.
- De Temmerman, L.; Bell, J.N.B.; Garrec, J.P.; Klumpp, A.; Krause, G.H.M. & Tonneijck, A.E.G.** 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: *Proceedings of Eurobionet 2002 – Urban air pollution, bioindication and environmental awareness*. A. Klumpp, W. Ansel, G. Klumpp (eds). pp. 337 – 373.
- De Tullio, M.C.; Paciolla, C.; Dalla Vecchia, F.; Rascio, N.; D’Emérico, S.; De Gara, L.; Liso, R. & Arrigoni, O.** 1999. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209: 424 – 434.
- Domingos, M.; Klumpp, A. & Klumpp, G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230 – 236.
- Domingos, M.; Bourotte, C.; Klumpp, A.; Klumpp, G. & Forti, M. C.** 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo* (Bicudo DC, Forti MC & Bicudo CEM, orgs.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo, pp. 221 – 249.
- Eltner, E.F.** 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Pell E.J.; Steffen K.L., eds. *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 13 – 25.

- Farrell, A. E.** 2005. Learning to see the invisible: discovery and measurement of ozone. Environmental Monitoring and Assessment 106: 59 – 80.
- Finnan, J.M.; Jones, M.B. & Burke, J.J.** 1996. A time-concentration study on the effects of ozone on spring wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Effects on yield. Agriculture, Ecosystems and Environment 57: 158 – 167.
- Freedman, B.** 1995. Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses. 2nd ed. Academic Press Inc., San Diego.
- Fridovich, I.** 1986. Superoxide dismutases. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 58: 61 – 97.
- Godzik, B.** 1997. Ground level ozone concentration in the Kraków region, Southern Poland. Environmental Pollution 98: 273 – 280.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.** 2007. Free Radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford University Press. pp. 1 – 851.
- Heggestad, H.E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C e Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. Environmental Pollution. 74: 264 – 291.
- Iqbal, M.; Abdin, M.Z.; Mahmooduzzafar, M.Y. & Agrawal, M.** 1996. Resistance mechanisms in plant against air pollution. In: Plant Response to Air Pollution (M. Yunnus e M. Iqbal eds). John Wiley and Sons, Chischester, p. 195 – 240.
- Kanofsky, J.R. & Sima, P.D.** 1995. Singlet oxygen generation from the reaction of ozone with plant leaves. Journal of Biology and Chemistry 270: 7850 – 7852.
- Klumpp A.; Klumpp G. & Domingos, M.** 1994. Plant as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. Environmental Pollution 85: 109 – 116.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. & Fomin, A.** 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade

- do ar usando plantas bioindicadoras (Eurobionet). Revista Brasileira Botânica 24 (4): 511 – 518.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G.; Vergne, P.; Sifakis, N.; Sanz, M.J.; Rasmussen, S.; Ribas, H.; Peñuelas, J.; Kambezidis, H.; He, S.; Garrec, J.P. & Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. Atmospheric Environment 40 (38): 7437 – 7448.
- Koppel, A. & Sild, E.** 1995. Bioindication of ozone in Estonia by using the tobacco variety Bel W3. Air and soil pollution 85: 1515 – 1519.
- Krupa, S. V. & Manning, W. J.** 1998. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. Environmental Pollution 50: 101 – 137.
- Krupa, S.V.; McGrath, M.T.; Andersen, C.P.; Burkey, F.L.B.K.O.; Chappelka, A.H.; Chevone, B.I.; Pell, E.J. & Zilinskas, B.A.** 2000. Ambient ozone and plant health. Plant Disease Vol. 85 n° 1.
- Lacasse, N.L. & Treshow, M.** 1976. Diagnosing vegetation injury caused by air pollution. US Environmental Protection Agency Handbook.
- Langerbatels, C.; Wohlgemuth, H.; Kschieschan, S.; Grun, S. & Sandermann, H.** 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. Plant Physiology Biochemistry 40: 567 – 575.
- Larcher, W.** 2000. Ecofisiologia Vegetal. Rima, São Carlos.
- Mackenzie, F. T.** 2003. Our changing planet: an introduction to earth system science and global environmental change. 3th ed. Pearson Education, Inc. pp. 1 – 580.
- Manahan, S.E.** 2005. Environmental Chemistry. 8th ed. CRC Press LLC. pp. 1 – 783.
- Manning, W. J. & Feder, W. A.** 1980. Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Publishers LTDA., London.
- Mayer, H.** 1999. Air pollution in cities. Atmospheric Environment. 33: 4029 – 4037.

- Mehlhorn, H.; Tabner, B.J. & Wellburn, A.R.** 1990. Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plantas exposed to ozone. *Physiology Plantarum* 79: 377 – 383.
- Miguel, A. H.** 1992. Poluição atmosférica urbana no Brasil: uma visão geral. *Química Nova*, São Paulo, v. 15, nº 2, p. 138 – 142.
- Muggli, R.** 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: *Free radicals and antioxidants in nutrition* (F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi and C. Rice-Evans eds.). Richelieu Press, London, p. 189 – 250.
- Nebel, B.J. & Wright, R. T.** 2000. *Environmental Science: The way the world works*. 7th ed. Prentice Hall. pp. 1 – 664.
- Pastori, G.M.; Kiddle, G.; Antoniow, J.; Bernard, S.; Veljovic-Jovanovic, S.; Verrier, P.J.; Noctor, G. & Foyer, C.H.** 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defence transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell* 15: 939 – 951.
- Pavet, V.; Olmos, E.; Kiddle, G.; Mowla, S.; Kummar, S.; Antoniv, J.; Alvarez, M.E. & Foyer, C.H.** 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 1291 – 1303.
- Peñuelas, J.; Ribas, A.; Gimeno, B.S. & Filella, I.** 1999. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (NE. Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* 56 (2): 221 – 224.
- Puckette, M.C.; Weng, H. & Mahalingam, R.** 2007. Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 70 – 79.
- Raven, P. H.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. E.** 2007. *Biologia Vegetal*. 7th ed. Guanabara Koogan. pp. 1 – 906.

- Ribas, A. & Peñuelas, J.** 2002. Ozone bioindication in Barcelona and surrounding area 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.
- Sant’Anna, S.M.R.** 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* Bel W3 para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo. Tese de doutorado - São Paulo.
- Schraudner, M.; Moeder, W.; Wiese, C.; Van Camp, W.; Inzé, D.; Langebartels, C. & Sandermann, H.J.** 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The plant journal* 2: 235 – 245.
- 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.
- Scandalios, J. G.** 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7 – 12.
- Schauraudner, M.; Moeder, W.; Wiese, C.; Van Camp, W.; Inze, D.; Langebartels, C. & Sandermann, H.** 1997. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant Journal* 16: 235 – 245.
- Seinfeld, J. H.** 1986. *Atmospheric chemistry and physics of air pollution*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 1 – 738.
- 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.

- Smirnoff, N. & Wheeler, G.L.** 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35: 291 – 314.
- Souza, S. R. & Carvalho L. R. F.** 1997. Determinação de ácidos carboxílicos na atmosfera de São Paulo: uma abordagem analítica e Ambiental. *Química Nova*, São Paulo, v. 20, nº 3, p. 245 – 249.
- 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.
- World Health Organization (WHO).** 1979. Environmental Health Criteria: Photochemical Oxidants, Geneva.

CAPÍTULO II

**RELAÇÕES ENTRE RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS E INJÚRIAS FOLIARES
EM PLANTAS DE *NICOTIANA TABACUM* “BEL W3” EM AMBIENTE POLUÍDO
POR OZÔNIO, NA CIDADE DE SÃO PAULO, BRASIL**

Resumo

A poluição atmosférica causa perturbações ambientais que podem ser avaliadas através de reações específicas mostradas por plantas bioindicadoras. A cultivar Bel W3 de *Nicotiana tabacum* está entre as espécies sensíveis mais utilizadas em biomonitoramento de ozônio atmosférico, mostrando uma relação satisfatória entre concentrações atmosféricas de ozônio e porcentagem de área foliar necrosada. Entretanto, alguns estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa relatam que tais necroses podem ser influenciadas não somente por ozônio como também por variações climáticas e modificadas na presença de outros poluentes. Dessa forma, supomos que essa cultivar pode apresentar defesas antioxidativas mais intensas quando expostas em locais poluídos da nossa cidade. Assim, objetivou-se verificar se plantas de *N. tabacum* Bel W3 mostram respostas antioxidativas às variações nas condições climáticas e de poluição de São Paulo, e se estas podem retardar o surgimento de necroses foliares visíveis ou restringir sua progressão. Para isso, foram realizadas, diariamente, análises espectrofotométricas de antioxidantes (ácido ascórbico total-AA, superóxido dismutase-SOD e peroxidase-POD) e análises visuais de injúrias em folhas de plantas de tabaco, expostas em ambiente de São Paulo poluído por ozônio por 14 dias e em quatro períodos distintos do ano, e determinar a relação desses parâmetros biológicos com fatores abióticos (ozônio, temperatura, umidade e radiação global). Verificou-se que 63% das injúrias foliares puderam ser explicadas por menores níveis de antioxidantes (AA e SOD) no momento da estimativa de área foliar ocupada pelas mesmas e por maiores valores de concentração de ozônio e de temperatura do ar quatro dias antes dessa estimativa. Esses resultados corroboram os de diversos estudos anteriores e demonstram que a cultivar deve ser utilizada cautelosamente como bioindicadora de ozônio em nossas condições atmosféricas.

Palavras-chave: biomonitoramento, ozônio, *Nicotiana tabacum* Bel W3, antioxidantes

Abstract

Air pollution causes environmental disturbances that can be evaluated through specific reactions shown by bioindicator plants. The cultivar Bel W3 of *Nicotiana tabacum* has high sensitivity to atmospheric ozone (O₃) and is among the species mostly used in biomonitoring programs, showing a satisfactory relationship between concentration of atmospheric ozone and percentage of injured leaf area. However, some recent studies carried out by our research group have reported that the percentage of leaf area affected by necroses in plants growing under the polluted atmosphere in the city of São Paulo can be influenced by weather variations, and modified in the presence of other atmospheric pollutants. Furthermore, we supposed that this cultivar can intensify antioxidative responses when exposed to polluted sites in our city. Therefore, the objective of the present study was to verify if *N. tabacum* Bel W3 shows antioxidative responses to variations on the climatic conditions and on air pollution contamination in São Paulo and if these responses can retard the appearance of leaf necroses or restrict their progression. For this reason, we performed everyday spectrophotometric analysis of antioxidants (ascorbic acid-AA, superoxide dismutase-SOD and peroxidase-POD) and visual analysis of injury in leaves of tobacco plants exposed for 14 days in an area of Sao Paulo contaminated by ozone, during four distinct periods of the year. The relationship between these biological parameters and abiotic factors (ozone, temperature, humidity and global radiation) was also determined. We verified that lower levels of antioxidants (AA and SOD) at the moment of injury evaluation and by higher values of ozone concentrations and of air temperature four days before this evaluation could explain 63% of leaf injury. These results corroborate those from several studies previously conducted, and demonstrate that the plant should be used cautiously as ozone bioindicator under the weather conditions observed in the city of São Paulo.

Keywords: biomonitoring, ozone, *Nicotiana tabacum* Bel W3, antioxidants

Introdução

A atmosfera da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) é fortemente afetada pelo fenômeno urbano denominado *smog fotoquímico*, que é formado na troposfera por meio de reações entre hidrocarbonetos e óxidos de nitrogênio (NO_x) na presença de luz solar, produzindo ozônio (O_3) e outras espécies oxidantes (Souza *et al.* 1998). Nessa região, os níveis de O_3 são altos o suficiente para exceder diversas vezes os padrões de qualidade do ar de 80 ppb por 1 hora, causando sérios problemas ambientais na região (Molina & Molina 2004).

O O_3 é um forte oxidante, nocivo para as plantas (Fuhrer *et al.* 1997). Os efeitos oxidativos nos processos metabólicos, fisiológicos e ultra-estruturais nas células das plantas ocorrem devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) tão logo o O_3 é absorvido através dos estômatos (Mehlhorn *et al.* 1990, Schraudner *et al.* 1998, Puckette *et al.* 2007). Entretanto, a extensão dos danos oxidativos na planta dependerá do grau de sensibilidade da planta ao O_3 , que é determinado, entre outros aspectos, pela eficiência de seu sistema de defesas antioxidativas de manter o balanço pró-oxidante/antioxidante (Muggli 1993, Bray *et al.* 2000). As enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidases (POD), assim como o ácido ascórbico (AA) – uma molécula não enzimática solúvel em água – entre outras substâncias com função antioxidativa, ao serem mobilizadas, podem eliminar ao menos parte das EROs e/ou reparar os danos causados por elas, aumentando a resistência das plantas às condições estressantes do ambiente poluído (Winston 1990, Bray *et al.* 2000, Halliwell & Gutteridge 2007).

As alterações nos níveis de antioxidantes, que podem resultar no restabelecimento do balanço pró-oxidante/antioxidante, são consideradas respostas precoces de plantas à contaminação atmosférica por poluentes oxidativos e/ou às variações em fatores ambientais naturalmente estimuladores da formação de EROs, como os climáticos, que estão envolvidos em processos fisiológicos. Isto porque tais alterações não somente ocorrem antes da

observação dos distúrbios metabólicos ou fisiológicos nas células das plantas ou mesmo de injúrias visíveis em plantas sensíveis, como também podem retardar seu surgimento ou minimizá-los. O estresse oxidativo, assim, é caracterizado a partir do momento em que há a quebra desse balanço, induzindo a ocorrência de injúrias em células e tecidos vegetais (Faoro & Iriti 2005).

Em tese, em espécies vegetais sensíveis ao O₃, o balanço pró-oxidante/antioxidante é rapidamente quebrado, culminando na morte de células ou mesmo de porções de tecido. Conseqüentemente, ocorrem as injúrias visíveis típicas nas plantas, como necroses foliares (Manning & Feder 1980, Larcher 2000). Em função disto, tais plantas vêm sendo utilizadas como simples, porém eficientes bioindicadoras em programas de biomonitoramento. A cultivar Bel W3 de *Nicotiana tabacum*, devido a sua extrema sensibilidade, tem sido freqüentemente utilizada para o biomonitoramento de O₃ atmosférico em centros urbanos europeus (Koppel & Sild 1995, Vergé *et al.* 2002, Klumpp *et al.* 2006).

Essa cultivar de tabaco foi primeiramente utilizada na região sudeste do Brasil, ao redor do pólo industrial, mostrando habilidade em discriminar qualitativamente locais mais e menos afetados por O₃ (Klumpp *et al.* 1994, Domingos *et al.* 1998). Entretanto, um estudo recente e intensivo realizado na cidade de São Paulo, situada na mesma região do país, mostrou que a porcentagem de área foliar de *N. tabacum* Bel W3 afetada por necroses não estava diretamente relacionada apenas com as concentrações de ozônio atmosférico (Sant'Anna 2007). Além disso, Souza *et al.* (2008) verificaram que há sempre um atraso de três a seis dias no surgimento dos primeiros danos foliares visíveis, independentemente do nível de contaminação atmosférica por O₃. Dessa forma, as seguintes hipóteses são levantadas: *a)* variações diárias nos níveis de antioxidantes são determinantes da porcentagem de área foliar afetada pela necrose durante a permanência de plantas de *N. tabacum* Bel-W3 em ambiente poluído por ozônio; *b)* as respostas antioxidativas diárias e, por conseguinte, a extensão dos danos visíveis, podem ser influenciadas por variações diárias

ou sazonais na concentração de O_3 e/ou nas condições meteorológicas da cidade de São Paulo, visto que esta cultivar pode não estar bem aclimatada para o clima subtropical, o qual caracteriza a região sudeste do Brasil. Neste estudo, objetivou-se testar essa hipótese, por meio do estabelecimento das relações diárias entre a porcentagem de área foliar afetada por necroses e níveis foliares de antioxidantes (AA total, SOD e POD) em plantas de *N. tabacum* Bel W3 expostas por 14 dias em um local da cidade de São Paulo tipicamente afetado por O_3 atmosférico e entre essas variações diárias nas concentrações de O_3 e nas condições meteorológicas, em diferentes períodos do ano.

Material e Métodos

Cultivo e exposição de plantas de Nicotiana tabacum Bel W3

Sementes de *N. tabacum* Bel W3 foram germinadas em gerbox de plástico de 100 cm² contendo preparado de substrato comercial Plantimax (Eucatex) e vermiculita fina, na proporção de 3:1 (Figura 1). Após a germinação das sementes, em aproximadamente duas semanas, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos, contendo o mesmo preparado de substrato comercial. Os vasos permaneceram em casa de vegetação com ar filtrado (Figura 2), no Instituto de Botânica, até o início de cada exposição, sobre caixas plásticas cobertas com tela de arame galvanizado. A irrigação adequada das plantas foi garantida por capilaridade (Figura 3), através de cordões de náilon inseridos na base dos vasos, sendo que uma de suas extremidades esteve em contato com as raízes e a outra extremidade permaneceu mergulhada em água de torneira contida na caixa plástica (VDI, 2003). Para uma nutrição favorável, as plantas receberam solução nutritiva preparada com macro e micronutrientes, de acordo com protocolo proposto por Epstein (1975). As plantas foram expostas após o desenvolvimento total da 4ª, 5ª e 6ª folhas, sendo que, após três semanas do transplante, a 3ª folha foi marcada com barbante para facilitar a identificação de

tais folhas, que foram analisadas quanto ao conteúdo ou atividade das espécies antioxidativas e à porcentagem de área foliar afetada por injúrias foliares.



Figura 1. Plântulas de *N. tabacum* Bel W3 desenvolvendo-se em gerbox.



Figura 2. Casa de Vegetação com ar filtrado, instalada no Instituto de Botânica (São Paulo): ambiente utilizado para produção das plantas e como referência para as etapas experimentais realizadas neste capítulo.



Figura 3. Irrigação das plantas de *N. tabacum* Bel W3 por capilaridade.

O local de exposição das plantas de *N. tabacum* Bel W3, assim como a mencionada casa de vegetação, está situado em um parque estadual na região sul da cidade de São Paulo – Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) – entre os paralelos 28° 38' 08''S e 23° 40' 18''S e os meridianos 46° 36' 48''W e 46° 38' 00''W e a aproximadamente 3 km de uma importante rodovia que apresenta um tráfego veicular frequentemente denso. O ar nessa região é principalmente contaminado por ozônio, e seus precursores parecem ser oriundos predominantemente de emissões biogênicas de fragmentos de floresta protegidos pelo parque estadual e de emissões veiculares (Souza & Carvalho 2001, Monteiro *et al.* 2002). A cidade de São Paulo é a maior em área e população do complexo denominado Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), que agrega 39 municípios e ocupa 8.501 km de área, além de ser considerada a maior região industrializada e urbanizada da América Latina (Molina & Molina 2004). A RMSP apresenta uma topografia complexa, rodeada por montanhas que atingem de 650 a 1.200 m de altura, condições ideais para freqüente acúmulo de poeira e baixa dispersão de poluentes atmosféricos.

O clima na RMSP é subtropical, com estação mais seca ocorrendo no inverno. As médias de temperaturas mensais no verão e no inverno alcançam 23°C (de dezembro a fevereiro) e 16°C (de junho a agosto), respectivamente. A estação mais chuvosa normalmente tem início em setembro e término em março, com uma média anual de precipitação de 1.200 mm. A circulação local é dada por ventos do sudeste e nordeste, principalmente associada com a circulação da brisa vinda do oceano Atlântico (Andrade 2004).

Vinte e oito plantas de *N. tabacum* Bel W3 foram expostas às condições ambientais do local mencionado em quatro períodos distintos de catorze dias: a 1ª exposição ocorreu no inverno (no período de 31 de agosto a 09 de setembro de 2004), a 2ª exposição ocorreu no início da primavera (14 a 27 de outubro de 2004), a 3ª exposição ocorreu no final da primavera (21 de novembro a 04 de dezembro); e finalmente a 4ª exposição ocorreu no final do verão (07 a 19 de março de 2005). Durante tais períodos, as plantas foram mantidas, no local descrito, sobre suportes construídos com base em modelo proposto por Arndt & Schweizer (1991) (Figura 4). Além do lote de plantas exposto nas condições ambientais do PEFI em cada período, outro lote permaneceu na casa de vegetação, que foi considerada como local de referência, especialmente para ocorrência de injúrias foliares por possuir ar filtrado e climatizado.

Durante cada período de exposição, a porcentagem de área afetada por necroses típicas, as concentrações de AA e as atividades das enzimas SOD e POD foram analisadas diariamente, nas 4ª, 5ª e 6ª folhas de duas plantas amostradas aleatoriamente em ambos os ambientes.



Figura 4. Suporte para exposição das plantas de *N. tabacum* Bel W3 nas condições ambientais do PEFI (adaptado de Arndt & Schweizer 1991).

Procedimentos analíticos

As necroses tipicamente induzidas por ozônio nas folhas de *N. tabacum* Bel W3 têm diferentes tamanhos e formatos, ocorrendo sempre entre as nervuras. Inicialmente, são de cor prata a bege e com o tempo tornam-se de cor marrom claro (Figura 5A). Devido ao decréscimo do volume das células injuriadas, as necroses formam depressões na superfície foliar, em relação aos tecidos saudáveis, mesmo nos estágios muito iniciais, quando a mudança de cor ainda não ocorreu (VDI 2003).

A análise visual dos danos em plantas sensíveis é um procedimento recomendado pelo *Verein Deutscher Ingenieure* (VDI), órgão alemão responsável pela definição e atualização dos protocolos relacionados ao biomonitoramento com plantas. Por questões de ordem prática, esse órgão recomenda que as necroses sejam mentalmente agrupadas e, então, seja estimado o quanto da área foliar é ocupada pelas mesmas, que as estimativas sejam

sempre feitas somente para necroses típicas e que estas sejam feitas sempre pela mesma pessoa, previamente treinada no método.

A porcentagem de área foliar com danos típicos induzidos por ozônio foi expressa em classes de 5 em 5% de área foliar danificada nas folhas número 4, 5 e 6 (Figura 5B).

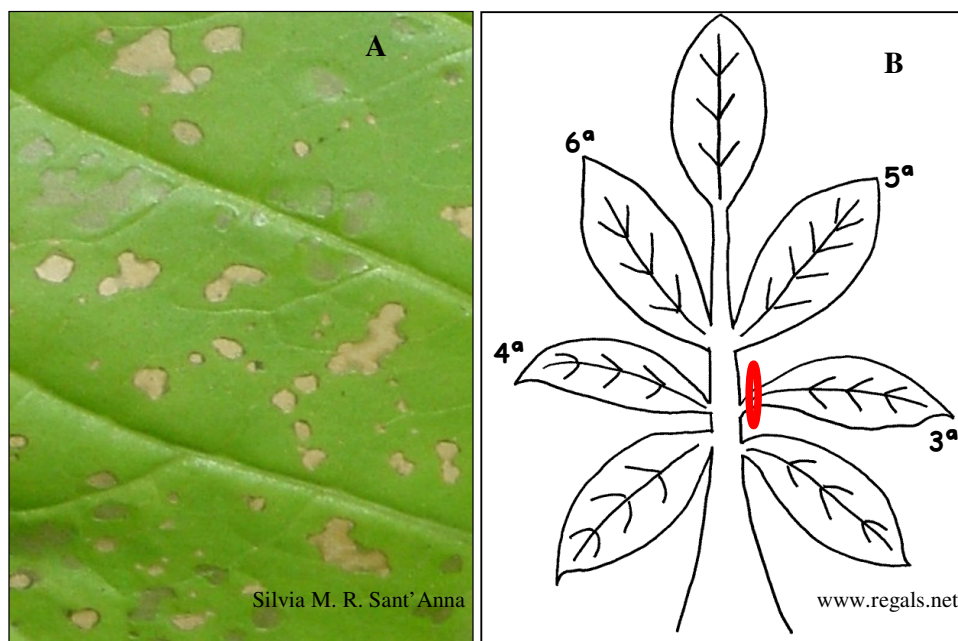


Figura **5A)** Necroses foliares típicas induzidas por ozônio em folhas de *N. tabacum* Bel W3; **5B)** Desenho ilustrando a marcação da 3^a folha mais velha, visando obter referência da posição das 4^a, 5^a e 6^a folhas a serem analisadas.

A cada dia, todos antioxidantes foram analisados em porções das folhas não afetadas por necroses, no momento exato da preparação dos respectivos extratos. As coletas das folhas e a preparação dos extratos foram sempre feitas numa mesma seqüência de tempo para evitar variações causadas por ritmos diurnos que poderiam interferir na interpretação dos resultados. Os antioxidantes foram determinados por métodos espectrofotométricos específicos considerando os conceitos básicos da lei de Beer (Harris, 2001). Para todas as determinações, foram utilizados espectrofotômetro (UV-160, Shimadzu) e cubetas de quartzo

de 1cm de caminho óptico. Os métodos analíticos utilizados para as determinações das substâncias de interesse estão descritos a seguir:

Ácido Ascórbico total (AA) - Após a avaliação dos danos visuais, as folhas (4^a, 5^a e 6^a) foram submetidas a análises químicas para determinação de ácido ascórbico. A concentração de ácido ascórbico foi determinada através do método sugerido por Keller & Schweizer (1977). Cerca de 0,5 g de cada folha fresca das respectivas plantas foi triturada com uma solução extração contendo ácido oxálico a 0,05 mol/L e EDTA (etileno diamina tetra acetato dissódio) a $2,01 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Os extratos foram centrifugados por 30 minutos na velocidade de 18.000 rpm e temperatura de 2 °C. O sobrenadante foi armazenado em geladeira por aproximadamente 30 minutos antes da análise. Para determinar a concentração de ácido ascórbico, foi obtida a absorbância, em comprimento de onda $\lambda = 520\text{nm}$, de uma alíquota do extrato contendo, como reagente cromóforo, 0,2 g/L de 2,6 diclorofenol-indofenol sal de sódio dihidratado e de outra alíquota do mesmo extrato contendo, além do cromóforo, ácido ascórbico 1%. A concentração de ácido ascórbico foi calculada através da diferença dessas absorbâncias, expressa em [mg/g (ms)].

Superóxido Dismutase (SOD) – A atividade da superóxido dismutase foi determinada a seguir, em 0,35 g de folhas frescas (4^{as}, 5^{as} e 6^{as}). Um volume de 6 mL da solução extração, contendo tampão fosfato de potássio 50mM (pH = 7,5), EDTA (1mM), NaCl (50 mM) e ácido ascórbico (1 mM), e cerca de 1,5 g de PVP (polivinilpolipirrolidona) foi adicionado em tubos contendo as folhas frescas e recém-pesadas, sendo os extratos obtidos por trituração.. Estes foram centrifugados por 25 minutos na velocidade de 10.000 rpm e na temperatura de 2°C. O sobrenadante foi armazenado em geladeira até o momento da análise. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente utilizando NBT (nitro blue tetrazolium) a $4,4 \cdot 10^{-4}$ mol/L e riboflavina (vitamina B2) a $1,06 \cdot 10^{-3}$ mol/L como reagentes cromóforos (Osswald *et al.* 1992). Soluções controle contendo apenas reagentes foram mantidas no escuro enquanto soluções contendo extrato e reagentes permaneceram por 30

minutos expostas à luz fluorescente. Após esse período, a absorbância dos extratos foi medida contra a absorbância das soluções controle, em comprimento de onda igual a $\lambda = 560\text{nm}$. A atividade da enzima foi determinada pela inibição da redução do NBT, expressa em Uni/SOD/gs.

Peroxidase (POD) – A atividade da peroxidase foi finalmente determinada também em folhas frescas. Para tal, 0,3 g de folhas foram trituradas com 6 mL de solução extração (tampão fosfato de potássio 0,1M em pH = 7,0) e cerca de 1,5 g de PVP (polivinilpolipirrolidona). O extrato resultante foi centrifugado por 30 minutos em uma velocidade de 18.000 rpm e temperatura igual a 2 °C. O sobrenadante foi armazenado em geladeira até o momento da análise. A atividade da peroxidase foi determinada espectrofotometricamente através da medida da absorbância obtida pela reação entre a peroxidase e p-fenilenodiamina (0,0925 mol/L), catalisada com peróxido de hidrogênio 0,3 %, em comprimento de onda igual a $\lambda = 485\text{nm}$ (Klumpp *et al.* 1989). A atividade enzimática foi expressa em dE/min/gs.

No presente estudo, a atividade da peroxidase começou a ser monitorada apenas na 2ª exposição, devido à impossibilidade de armazenamento das amostras em freezer a -40°C, o qual se encontrava danificado na época do experimento.

Vale ressaltar que todas as etapas de obtenção da concentração de AA e da determinação da atividade dos antioxidantes enzimáticos foram realizadas em banho de gelo, para que não ocorresse a perda dessas substâncias.

Os níveis de ozônio durante as quatro exposições foram monitorados continuamente por um analisador de ozônio modelo Ecotech™ 9680. Os dados contínuos de radiação global, temperatura e umidade relativa do ar foram obtidos em estação meteorológica do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo (IAG/USP), também localizada no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), bairro da Água Funda.

Análises Estatísticas

Diferenças estatísticas entre as exposições foram determinadas por análise de variância (One Way ANOVA) seguida por teste de comparações de pares de Student-Newman-Keuls.

Foram realizadas análises de regressão multivariada para determinar o quanto da variação na extensão de área foliar afetada por danos pôde ser explicada por variações em fatores abióticos (temperatura, umidade relativa, radiação global e ozônio) e respostas antioxidativas (AA total, SOD, POD), e quais deles contribuem significativamente para explicar a ocorrência de danos foliares. Essas análises foram feitas com todo o conjunto de dados, utilizando-se os valores obtidos por planta em cada dia de análise (para danos e antioxidantes foliares) e valores médios dos fatores abióticos quatro dias antes da tomada dos dados biológicos. Optou-se por esse modelo, visto que foi o mais explicativo entre os testados, nos quais relacionaram-se os dados biológicos às condições ambientais observadas até sete dias antes da tomada dos mesmos. Essas análises multivariadas foram realizadas pelo método *Stepwise*. O procedimento de ajuste de cada regressão iniciou com um modelo saturado, com todas as variáveis presentes, removendo aquelas de menor participação para explicar as variações nos antioxidantes e novos ajustes foram feitos. Ao final, permaneceram somente as variáveis que contribuíram significativamente para explicar as variações nas variáveis biológicas.

Quando necessário, os dados foram transformados para alcançar a normalidade e variâncias iguais.

O programa estatístico SIGMA STAT 2.0 foi utilizado para todos os testes aplicados.

Resultados

O perfil médio de temperatura, umidade relativa do ar e radiação global é apresentado na figura 6 e os valores médios desses parâmetros estão descritos na tabela 1. Já o perfil da

concentração de ozônio atmosférico e porcentagem de injúrias foliares é apresentando na figura 7, sendo que seus valores médios estão descritos nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Os maiores valores de ozônio foram encontrados na 1ª e 3ª exposições, e os menores nas 2ª e 4ª exposições. Os níveis máximos foram medidos na primavera, alcançando valores acima de 80 ppb (correspondente a 160), especialmente em setembro, durante a 1ª exposição. Além disso, nessa exposição, picos de concentração de ozônio foram observados em contraste com a umidade relativa do ar; por exemplo, 90 e 30 ppb de ozônio (correspondentes a 180 e 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de ozônio) foram medidos em dias com umidade relativa de 60 e 90%, respectivamente. Também na 2ª exposição, os níveis de ozônio foram menores quando comparados aos medidos na 1ª exposição, quando a umidade relativa era mais alta. As oscilações ao longo das exposições na radiação global e na temperatura foram menos evidentes do que nos níveis de ozônio. Os maiores índices de radiação global e de temperatura foram observados na 3ª e 4ª exposição, respectivamente. Na 2ª exposição, a umidade relativa foi significativamente mais alta do que nas demais. A temperatura foi significativamente menor na 4ª exposição, em comparação com os valores obtidos nos experimentos anteriores.

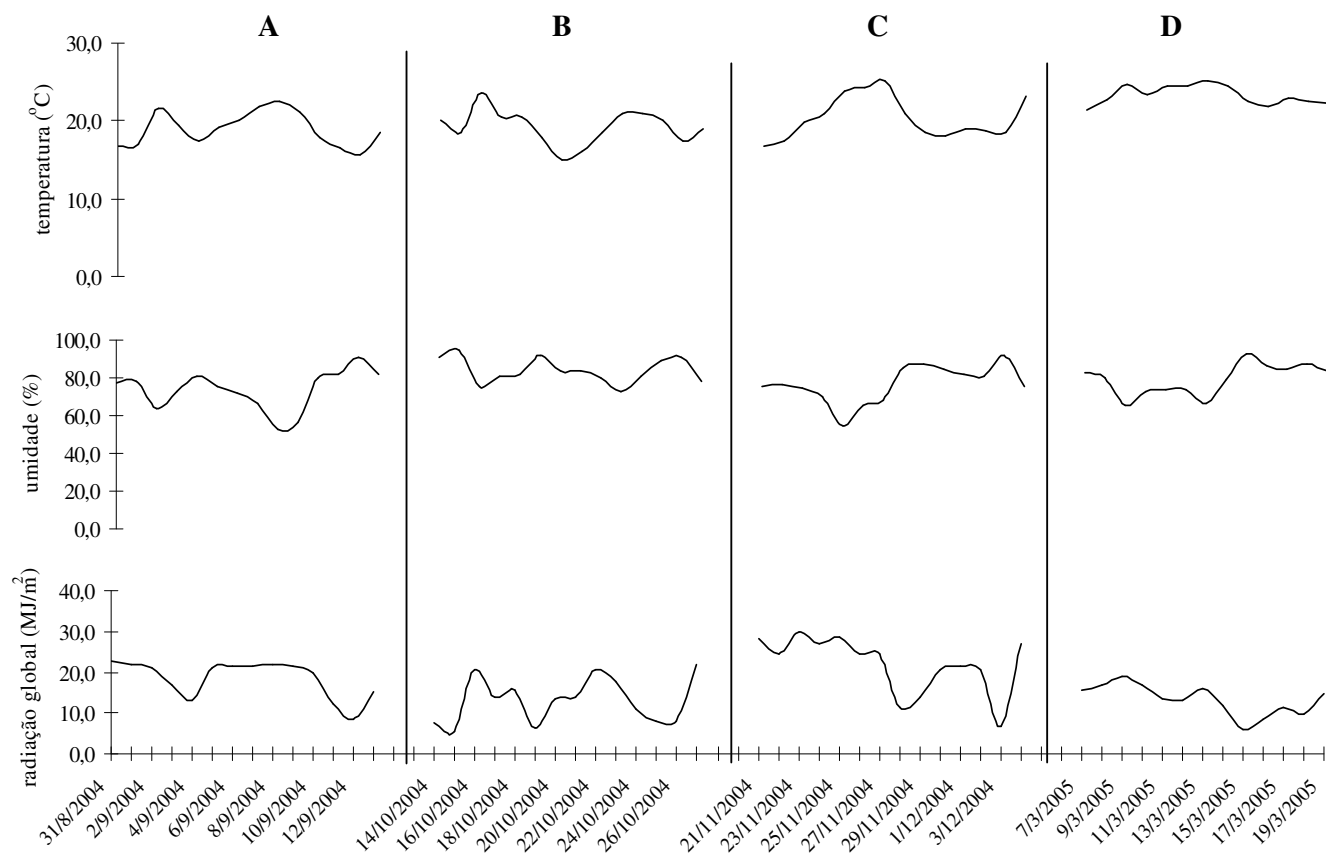


Figura 6. Perfil diário da temperatura, umidade relativa do ar e radiação global durante as 4 exposições de *N. tabacum* Bel W3 no ar ambiente do Instituto de Botânica. **A** = 1ª exposição, **B** = 2ª exposição, **C** = 3ª exposição e **D** = 4ª exposição.

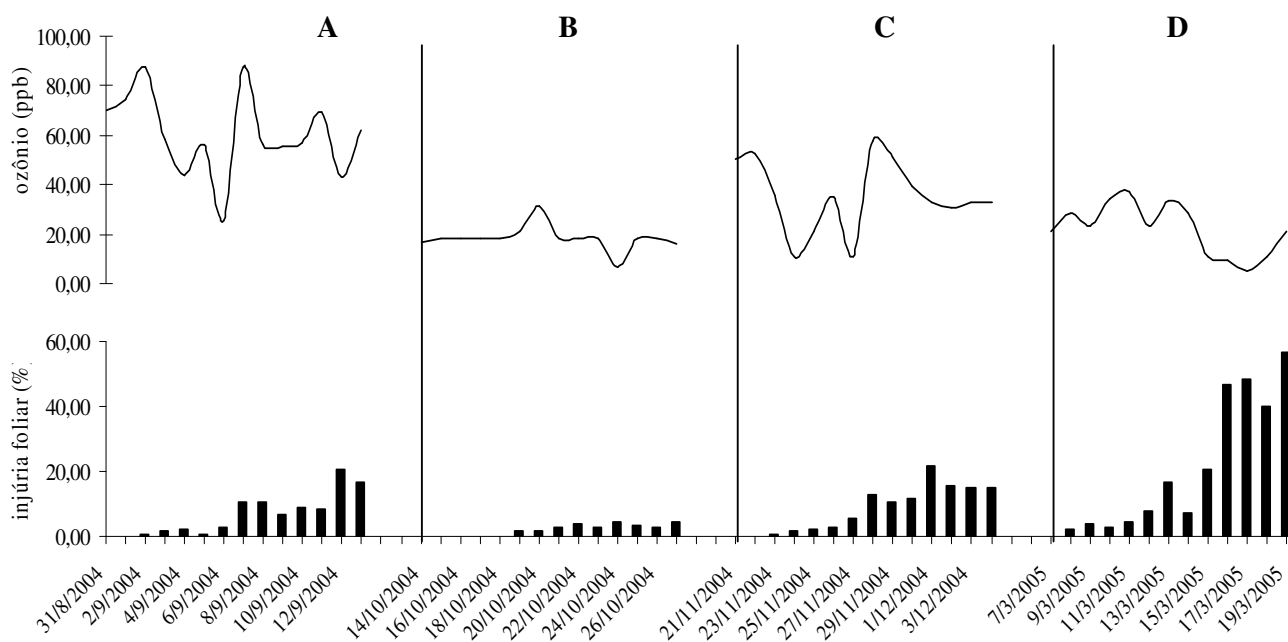


Figura 7. Perfil diário da média de concentração de ozônio atmosférico e injúrias foliares durante as 4 exposições de *N. tabacum* Bel W3 no ar ambiente do Instituto de Botânica. **A** = 1ª exposição, **B** = 2ª exposição, **C** = 3ª exposição e **D** = 4ª exposição.

Na figura 8, são apresentados os valores médios de temperatura e de umidade relativa medidos no local de referência (casa de vegetação), para as quatro exposições de *N. tabacum*, no decorrer dos 14 dias de experimento. Tais variáveis climáticas oscilaram pouco. Em média, a temperatura máxima foi de 25,7°C e a mínima de 21,8°C (desvio padrão $\pm 0,92$) e a umidade relativa do ar apresentou máxima de 77,8% e mínima de 50% (desvio padrão $\pm 7,1$).

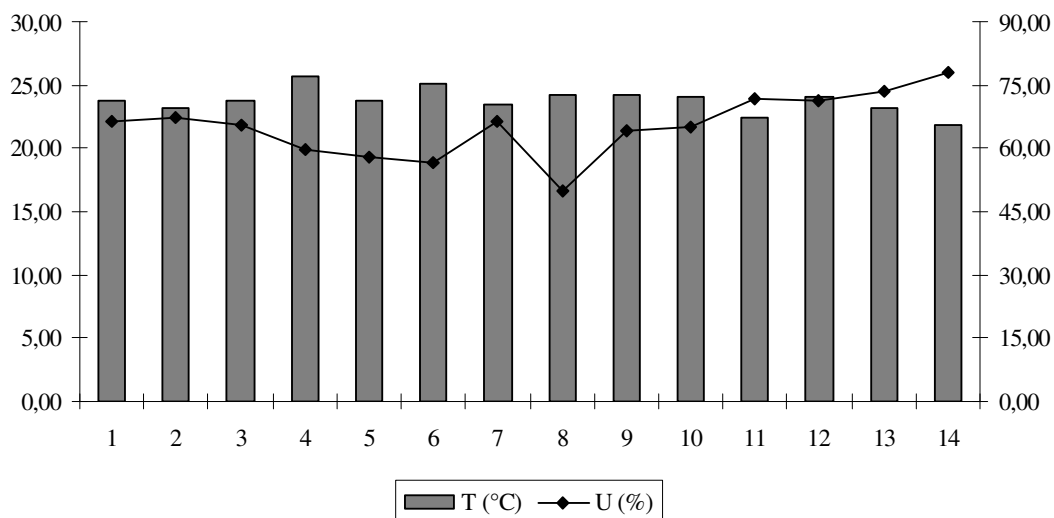


Figura 8. Perfil médio diário de temperatura e umidade relativa do ar obtidos nas quatro exposições de *N. tabacum* em casa de vegetação, ao longo dos 14 dias de exposição.

Como não houve diferenças marcantes nos níveis de antioxidantes entre as 4^a, 5^a e 6^a folhas de cada planta, estes foram apresentados como médias, tanto para plantas mantidas na casa de vegetação como para as exposta no ambiente poluído.

Nenhum dano foliar foi observado nas folhas das plantas que permaneceram na casa de vegetação durante as quatro exposições, demonstrando a eficácia desse local como local de referência para danos visíveis. A média das espécies antioxidantes nas folhas dessas plantas é apresentado na tabela 2. Nota-se que a atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase não diferiu significativamente ao longo das exposições. A concentração de ácido ascórbico, por sua vez, foi significativamente maior nas plantas das 1^a e 4^a exposições.

Nas plantas mantidas fora da casa de vegetação, em todas as exposições, foram observados danos foliares tipicamente induzidos por ozônio, conforme mostrado na figura 5. Os primeiros sintomas típicos surgiram entre o 3^o e o 6^o dia de exposição, e foram encontrados em todas as 4^{as} folhas e em quase todas as 5^{as} e 6^{as} folhas s. A extensão média de área foliar afetada por danos visíveis não diferiu significativamente entre os períodos de exposição, como pode ser observado na tabela 2. A porcentagem média de necroses

observadas nas folhas das plantas expostas ao ambiente foi sempre inferior a 18%. A porcentagem máxima de área foliar atingida por necroses foi observada na 4ª exposição (100%), período em que a temperatura foi mais alta (23,3% em média) e os níveis de ozônio foram menores, quando comparados com as 1ª a 3ª exposições.

Na tabela 2, também são apresentados os níveis das espécies antioxidantes, considerando todas as plantas expostas nos períodos de exposição. A média da concentração de ácido ascórbico seguiu padrões similares ao ozônio: maiores valores na 1ª e 3ª exposições e menores na 2ª e 4ª exposições. Não foi encontrada nenhuma variação na atividade média da superóxido dismutase. Em contraste, a atividade da peroxidase na 2ª exposição foi menor do que nas exposições 3 e 4.

O perfil diário da concentração de ácido ascórbico e da atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase nas folhas de *N. tabacum* Bel W3 expostas ao ar ambiente do Instituto de Botânica é apresentado na figura 9. Pode ser observado que os níveis de ácido ascórbico apresentam um decréscimo com o passar dos dias de exposição, enquanto a atividade da superóxido dismutase e peroxidase pareceu não seguir a mesma tendência. Foram encontrados picos da atividade da superóxido dismutase no início da 1ª e 2ª exposições e final da 4ª exposição. Apenas na 2ª exposição foi observado um comportamento similar nas atividades da superóxido dismutase e peroxidase.

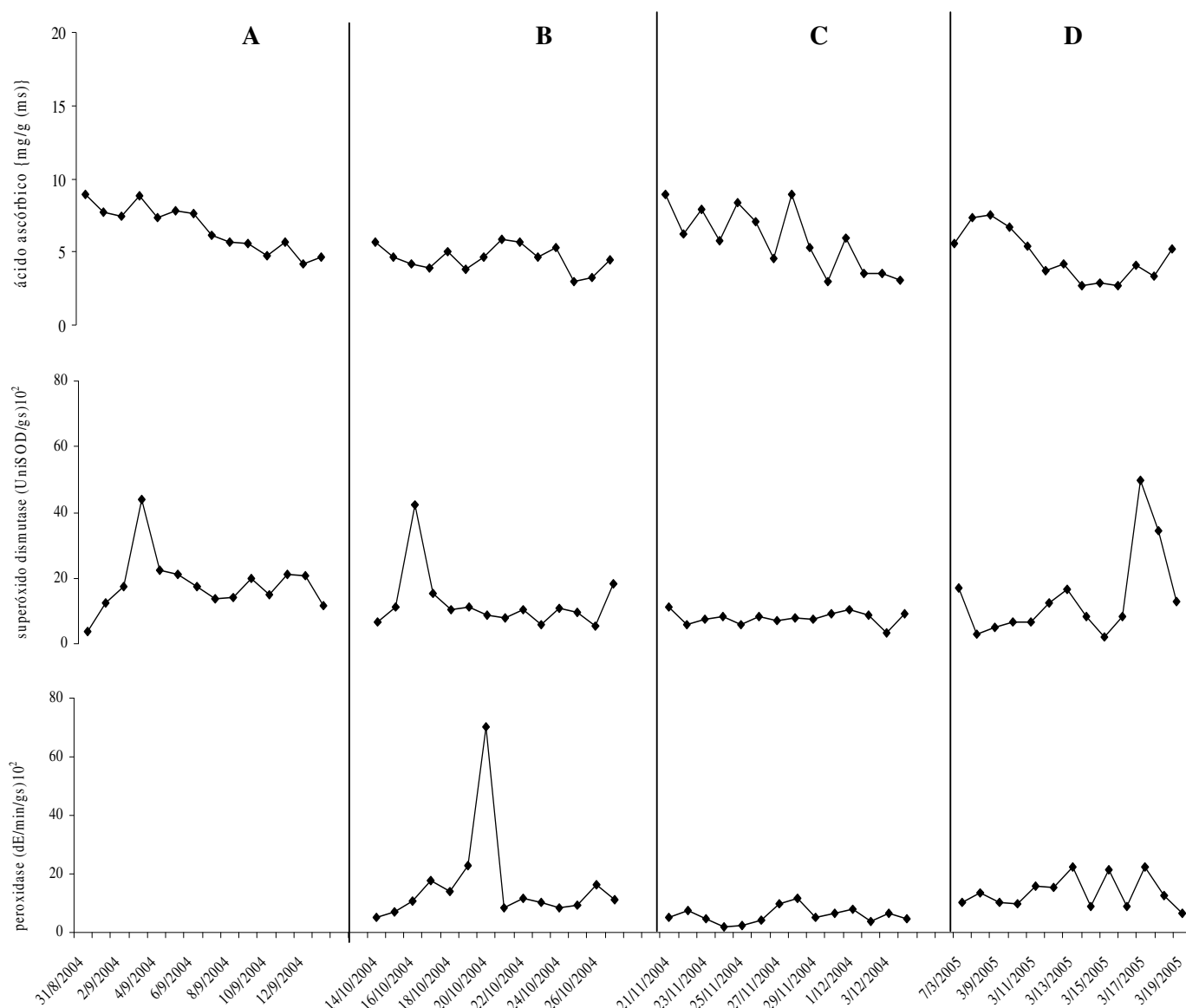


Figura 9. Perfil médio dos antioxidantes – ácido ascórbico, superóxido dismutase e peroxidase – ao longo dos 14 dias de experimento nas diferentes exposições de *N. tabacum* Bel W3 no ar ambiente do Instituto de Botânica. **A** = 1ª exposição, **B** = 2ª exposição, **C** = 3ª exposição e **D** = 4ª exposição. Peroxidase não medida na 1ª exposição.

A figura 10 apresenta a relação média entre os antioxidantes e a porcentagem de injúrias foliares. Nota-se que, entre o 8º e o 9º dia de exposição, há um decréscimo dos níveis de todos os antioxidantes analisados, seguido por aumento conspícuo da % de área foliar afetada por injúrias.

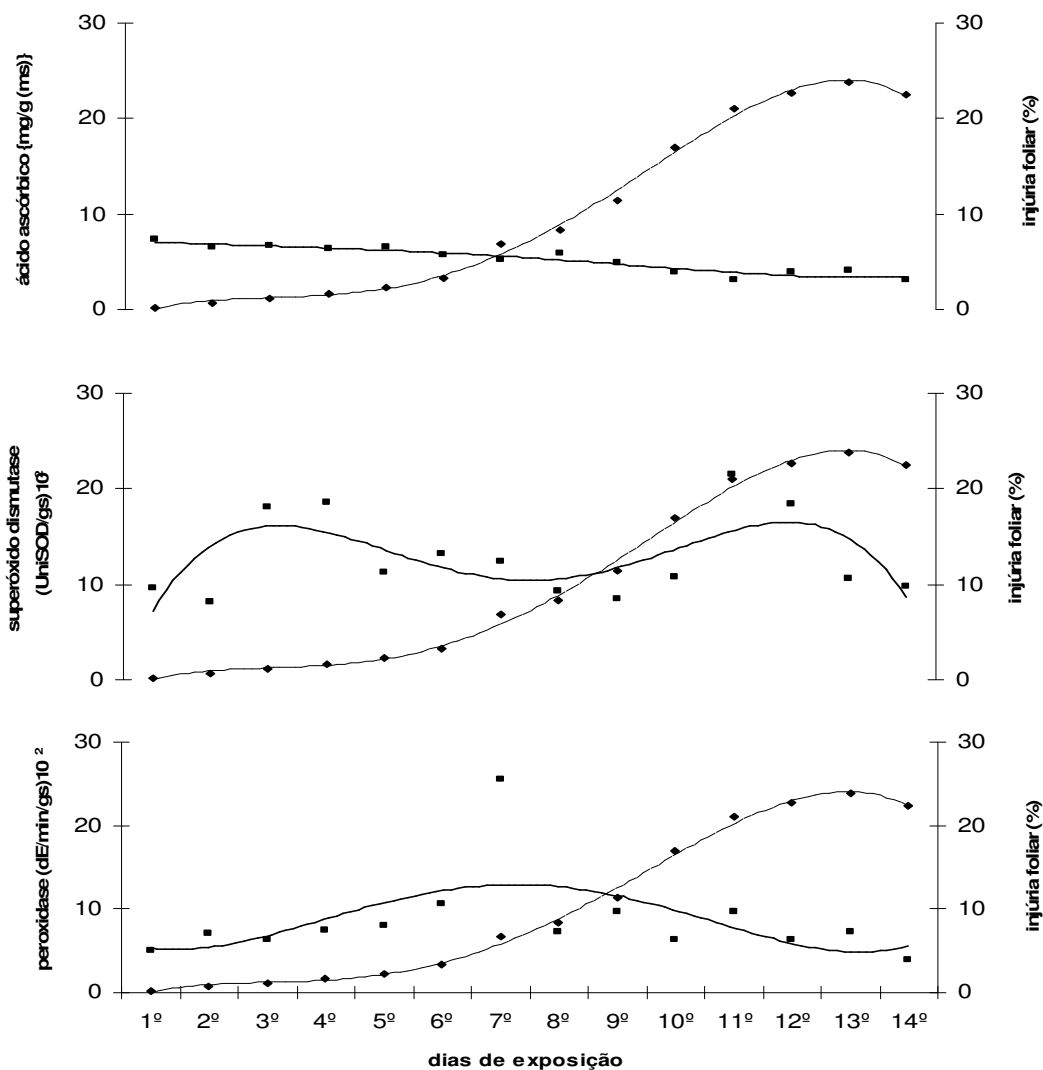


Figura 10. Relação entre médias das injúrias foliares (linha pontilhada) em plantas de *N. tabacum* Bel W3 e média dos antioxidantes (linha contínua) analisados ao longo dos catorze dias de exposição.

A análise de regressão múltipla mostrou que 63,3% da variação na porcentagem de injúrias foliares ao longo de todo o período experimental foi explicada por menores níveis de antioxidantes (AA e SOD) no momento da estimativa de área foliar ocupada pelas mesmas e por maiores valores de concentração de ozônio e de temperatura do ar quatro dias antes dessa estimativa. (tabela 3).

Tabela 1. Valores máximos e mínimos, assim como médias $\pm$ desvios padrões entre parênteses, de temperatura, umidade relativa, ozônio e radiação global no Instituto de Botânica, durante as 4 exposições de *N. tabacum* Bel-W3. Letras distintas indicam diferenças significativas nos parâmetros analisados entre as exposições ($p < 0,05$).

Exposição	Temperatura (°C)	Umidade relativa (%)	Ozônio (ppb)	Radiação global (MJ/m ²)
1 ^a	13,8 – 27,1	41,6 – 93,3	25,9 – 87,7	8,2 – 22,7
	(19,0 $\pm$ 6,3) a	(73,6 $\pm$ 25,1) b	(60,5 $\pm$ 12,5) a	(18,4 $\pm$ 4,5) a
2 ^a	15,9 – 23,7	63,8 – 94,7	6,5 – 31,5	5,6 – 21,9
	(19,2 $\pm$ 5,6) a	(83,9 $\pm$ 15,8) a	(21,1 $\pm$ 2,3) b	(13,1 $\pm$ 5,6) a
3 ^a	15,8 – 26,3	54,4 – 92,8	10,8 – 57,5	6,8 – 28,6
	(20,4 $\pm$ 5,4) a	(76,6 $\pm$ 19,5) b	(35,0 $\pm$ 11,7) a	(22,1 $\pm$ 6,9) a
4 ^a	18,9 – 29,5	53,8 – 94,8	5,1 – 37,5	5,9 – 18,8
	(23,3 $\pm$ 4,7) b	(79,1 $\pm$ 19,9) b	(21,2 $\pm$ 9,3) b	(13,2 $\pm$ 3,7) a

Tabela 2. Valores máximos e mínimos, assim como médias $\pm$ desvios padrões entre parênteses, para danos visíveis e para os antioxidantes foliares – ácido ascórbico (AA), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD) – em plantas de *N. tabacum* Bel W3 mantidas em casa de vegetação e no ambiente externo do Instituto de Botânica. Letras distintas indicam diferenças significativas nos parâmetros analisados entre as exposições, em cada local de estudo ($p < 0,05$).

Exposição	Dano foliar	AA	SOD	POD
	(%)	[mg g ⁻¹ (MS)]	[10 ² Uni g ⁻¹ (MS)]	[10 ² Δ E min ⁻¹ (MS)]
Casa de Vegetação				
1 ^a	0,0	2,5 – 19,2 (6,8 $\pm$ 2,7) a	1,6 – 159,5 (19,5 $\pm$ 19,6) a	/
2 ^a	0,0	0,9 – 10,8 (4,3 $\pm$ 1,8) b	2,9 – 44,7 (11,6 $\pm$ 6,9) a	1,9 – 39,4 (13,8 $\pm$ 4,7) a
3 ^a	0,0	0,8 – 12,4 (5,3 $\pm$ 2,6) b	2,3 – 27,1 (7,5 $\pm$ 4,4) a	1,2 – 18,3 (6,3 $\pm$ 3,5) a
4 ^a	0,0	2,8 – 13,8 (5,7 $\pm$ 1,8) a	1,8 – 32,7 (9,5 $\pm$ 7,0) a	1,4 – 12,1 (5,5 $\pm$ 2,4) a
Ambiente externo				
1 ^a	0,0 – 65,0 (6,0 $\pm$ 10,0) a	1,8 – 13,0 (6,6 $\pm$ 2,1) a	1,7 – 63,1 (18,2 $\pm$ 10,5) a	/
2 ^a	0,0 – 20,0 (2,0 $\pm$ 3,0) a	1,7 – 12,1 (4,6 $\pm$ 1,8) b	3,3 – 158,0 (12,5 $\pm$ 18,8) a	3,0 – 118,8 (15,9 $\pm$ 17,7) a
3 ^a	0,0 – 50,0 (7,0 $\pm$ 10,0) a	1,9 – 21,2 (5,9 $\pm$ 2,9) a	1,9 – 23,6 (7,8 $\pm$ 3,6) a	0,7 – 25,4 (5,8 $\pm$ 4,2) b
4 ^a	0,0 – 100,0 (18,0 $\pm$ 23,0) a	0,9 – 15,8 (4,9 $\pm$ 2,3) b	1,0 – 144,8 (14,4 $\pm$ 20,8) a	2,3 – 38,5 (14,1 $\pm$ 8,0) a

Tabela 3. Análise de regressão linear utilizando o parâmetro de danos foliares como fator dependente. Os danos puderam ser explicados em 63,3% através do aumento da concentração de ozônio e temperatura, e decréscimo do ácido ascórbico e superóxido dismutase.

Grupo	Coeficiente	Coef. padrão	P
O ₃	0,404	0,327	0,024
temperatura	1,753	0,364	0,019
ácido ascórbico	-3,931	-0,498	0,003
superóxido dismutase	-0,008	-0,404	0,009
$R^2 = 0,633$			

Discussão

As respostas antioxidativas de plantas de *N. tabacum* Bel-W3 foram geralmente similares, tanto nas mantidas em casa de vegetação, sob ar filtrado, quanto nas expostas no ambiente externo do local de estudo. Este é o primeiro indicativo de que as oscilações nos antioxidantes nas plantas mantidas nesse local poluído, onde fatores de estresse oxidativo estavam presentes, não seriam suficientes para conter os danos foliares.

No presente estudo, o ácido ascórbico (AA) mostrou ser o antioxidante de *N. tabacum* Bel W3 mais afetado pelo tempo de exposição, entre os analisados, sofrendo um decréscimo contínuo ao longo dos dias. O ácido ascórbico funciona como um substrato para muitas enzimas (De Tullio *et al.* 1999, Arrigoni & De Tullio 2000) e contribui para a neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Smirnoff *et al.* 2000, Conklin 2001, Conklin & Barth 2004). Esta atividade antioxidante do AA está associada com a resistência ao stress oxidativo e com a longevidade em plantas e animais. Além do mais, os níveis endógenos de AA foram recentemente notificados como sendo importantes na regulação da senescência e defesa das plantas contra patógenos (Pastori *et al.* 2003, Barth *et al.* 2004 e 2006, Pavet *et al.* 2005) e danos oxidativos resultantes de diversos poluentes (Smirnoff 1996). É sugerido que o ascorbato presente nas paredes celulares fornece uma primeira linha de defesa contra o

ozônio e o dióxido de enxofre (Castillo & Greppin 1988, Takahama *et al.* 1992, Luwe *et al.* 1993). Em outros estudos, a fumigação com ozônio aumentou os níveis de ascorbato e a atividade do ciclo ascorbato-glutationa, contendo danos provocados pela geração de EROs (Castillo & Greppin 1988). Por outro lado, estudos feitos com mutantes deficientes em AA e clones (Conklin *et al.* 1996 e 2000, Veljovic-Jovanovic *et al.* 2001) relacionaram as baixas concentrações de AA no tecido da planta ao crescimento deficiente e ao aumento da sensibilidade ao ozônio. No presente estudo, o AA apesar de aparentemente ser um dos fatores limitantes para o surgimento de danos visíveis no início da exposição, momento em que suas concentrações ainda estavam mais altas, parece ser um forte indicador do aumento da sensibilidade da cultivar ao ozônio ao longo do tempo e não apenas do grau de eficiência do sistema de defesas antioxidativas para conter os danos oxidativos. Isto porque, conforme comprovado pela análise de regressão múltipla e claramente visualizado no gráfico da figura 10, a redução linear dos níveis de AA coincidiu com o aumento dos danos foliares durante os dias de exposição.

Diversos estudos têm constatado que durante a adaptação ao stress oxidativo, a atividade de superóxido dismutase (SOD) e de outras enzimas podem oscilar, dependendo da espécie da planta e grau de desenvolvimento, para impedir o aumento de EROs, evitando assim reações com moléculas específicas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, que poderiam causar problemas celulares ou danos em todo organismo (Gaspar *et al.* 1982, Pramanik *et al.* 1996, Rank 1997, Kuk *et al.* 2003). Assim, o papel da SOD em combater o stress oxidativo tem sido muito bem documentado por diversos autores. Durante a adaptação ao aumento do stress oxidativo, os níveis da SOD podem aumentar, dependendo da espécie de planta, grau de desenvolvimento e nível da condição de stress (Decleire *et al.* 1984, Krupa & Manning 1988, Pramanik *et al.* 1996). Além disso, condições ambientais, tais como seca, frio e anoxia, têm mostrado correlação com a atividade da SOD. Uma extensa variabilidade nos níveis de SOD foi encontrada por Polle & Rennenberg (1991) em diferentes clones de

abetos vermelhos que cresceram em câmaras fechadas fumigadas com ozônio. Assim, os resultados desses autores tendem a sustentar a hipótese de que a SOD pode contribuir para a resistência da planta contra poluentes atmosféricos, mas pode não ser o primeiro mecanismo envolvido, de acordo com dados de Ranieri *et al.* (1994). No entanto, no presente estudo, a análise multivariada mostrou que a atividade da SOD pode ter sido outro indicador de sensibilidade de *N. tabacum* Bel-W3 ao estresse oxidativo, visto que a redução linear na atividade dessa enzima também coincidiu com o aumento dos danos foliares.

No presente experimento, a atividade da POD não aumentou e nem teve relação significativa com a porcentagem de área foliar afetada por danos, como esperado. As peroxidases são consideradas as indicadoras mais sensíveis dos efeitos dos poluentes nas plantas, mesmo na ausência de sintomas visíveis (Gaspar *et al.* 1982). Em abóbora, a peroxidase tem um papel fundamental em combater o stress oxidativo causado por poluentes (Ranieri *et al.* 1994).

A sazonalidade climática, principalmente temperaturas mais altas, foi também um fator importante para explicar as variações no surgimento de danos visíveis em plantas *N. tabacum*. Allen (1995), Payton *et al.* (2001), Yabuta *et al.* (2002), Yoshimura *et al.* (2004) and Ding *et al.* (2007) igualmente constataram que a sensibilidade das plantas aos oxidantes aumenta com o aumento da temperatura.

Possivelmente, as temperaturas mais altas registradas no período experimental do presente estudo não foram estressantes o suficiente para causar a morte dos tecidos foliares, contribuindo diretamente para a ocorrência das necroses foliares. Mas, nessas condições climáticas, as taxas fotossintéticas e a respiração podem ter sido mais altas e, assim, houve um aumento natural da produção espécies reativas de oxigênio. A relação positiva entre % de área foliar com danos e temperatura do ar, portanto, pode ter refletido a influência da temperatura sobre as defesas antioxidativas e estas, por sua vez, teriam controlado a manifestação de danos oxidativos, como já foi discutido. Além disso, podemos considerar

que o fluxo de ozônio através dos estômatos na folha e a conseqüente absorção de ozônio é modificado por vários fatores ambientais como temperatura, umidade e velocidade do vento. Em períodos mais favoráveis ao aumento da fotossíntese, a absorção de ozônio também será maior (Peñuelas *et al.* 1999, Karlsson *et al.* 2004, Filella *et al.* 2005, Hassan 2006).

Otto & Daines (1969) constataram que a umidade influencia grandemente a resposta da planta ao ozônio. Eles concluíram que a alta umidade encontrada na parte oriental dos Estados Unidos poderia explicar a grande sensibilidade das plantas ao ozônio em contraste com a umidade encontrada no sudoeste. De acordo com Wilhour (1970), a sensibilidade do nabo ao ozônio também aumenta com a umidade relativa. Essa variável climática, ao interferir nas trocas gasosas do mesmo modo que a temperatura, também altera as respostas antioxidativas e o fluxo de ozônio para o interior da planta, afetando indiretamente a intensidade de danos oxidativos (Wieser *et al.* 2000). Contudo, no presente estudo, a relação entre variações na umidade relativa do ar e na extensão de danos foliares não foi comprovada.

Finalmente, comprovou-se que ozônio esteve entre os fatores explicativos das variações na porcentagem de danos foliares e concentração atmosférica, como observado por diversos autores (Ball *et al.* 1998, Penuelas *et al.* 1998, Ribas & Penuelas 2003, Yuska *et al.* 2003, Klumpp *et al.* 2006, Calatayud *et al.* 2007), demonstrando que, sob as condições atmosféricas de São Paulo, *N. tabacum* Bel-W3 poderia ser usada em biomonitoramento. Porém, isto deve ser feito cautelosamente, tendo em vista os comentários anteriores.

Referências Bibliográficas

Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology* 107: 1094-1054.

- Andrade, M.F.; Ynoue, R.Y.; Harley, R. & Miguel, A.H.** 2004. Air quality model simulating photochemical formation of pollutants: the São Paulo Metropolitan Area, Brazil. *International Journal of Environment and Pollution* 22 (4): 460 – 475.
- 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, Eschoborn. pp. 199 – 298.
- Arrigoni, O. & De Tullio, M.C.** 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology* 157: 481 – 488.
- Ball, G.R.; Benton, J.; Palmer-Brown, D.; Fuhrer, J.; Skarby, L.; Gimeno, B.S. & Millis, G.** 1998. Identifying factors which modify the effects of ambient ozone in white clover (*Trifolium repens*) in Europe. *Environmental Pollution* 103: 7-16.
- Barth, C.; De Tullio, M. & Conklin, L.** 2006. The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* Vol. 57, n° 8, pp. 1657 – 1665.
- Barth, C.; Moeder, W.; Klessig, D.F. & Conklin, P.L.** 2004. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient Arabidopsis Mutant *vitamin c-1¹*. *Plant Physiology* 134: 1784 – 1792.
- Bisessar, S.** 1982. Effect of O₃, antioxidant protection and early blight on potato in the field. *Journal of the american society of horticulture science* 107: 597 – 599.
- Bray, E.A.; Baylei-Serres, J. & Werentilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. 2000 eds). American Society of Plant Physiologists USA, New York, pp. 1158 – 1203.

- Calatayud, V.; Sanz, M.J.; Calvo, E.; Cerveró, J.; Ansel, W. & Klumpp, A.** 2007. Ozone biomonitoring with Bel-W3 tobacco plants in the city of Valencia (Spain). *Water Air Soil Pollution* 183: 283-291.
- Castilho, F. J & Greppin, H.** 1988. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany* 28: 231-238.
- Conklin, P.L. & Barth, C.** 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens and the onset of ozone. *Plant, Cell and Environment*. 27: 959 – 970.
- Conklin, P.L.** 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment* 24: 383-394.
- Conklin, P.L.; Saracco, S.A.; Norris, S.R. & Last, R.L.** 2000. Identification of ascorbic acid deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* 154: 847 – 856.
- Conklin, P.L.; Williams, E.H. & Last, R.L.** 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 9970 – 9974.
- De Tullio, M.C.; Paciolla, C.; Dalla Vecchia, F.; Rascio, N.; D’Emérico, S.; De Gara, L.; Liso, R. & Arrigoni, O.** 1999. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209: 424 – 434.
- Decleire, M.; Cat, W.; Temmerman, L. & Baeten, H.** 1984. Changes of peroxidase, catalase and superoxide dismutase activities in ozone fumigated spinach leaves. *Journal of Plant Physiology*.
- Ding, Z.S.; Tian, S.P.; Zheng, X.L.; Zhou, Z.W. & Xu, Y.** 2007. Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Physiologia Plantarum* 130: 112-121.

- Domingos, M.; Klumpp, A. & Klumpp, G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230 – 236.
- 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.
- Faoro, F. & Iriti, M.** 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biologia Plantarum* 49 (4): 585 – 592.
- 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.
- Furher, J.; Skarby, L. & Ashmore, M.R.** 1997. Critical Levels of ozone effects on vegetation in Europe. *Environment Pollution* 97: 91-101.
- Gaspar, T.; Perrel, C.; Thorpe, T. & Greppin, H.** 1982. Peroxidases 1970-1980. p. 124-129. *In* A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Univ. of Genève, Switzerland.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.** 2007. Free Radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford University Press. pp. 1 – 851.
- Harris, D. C.** 2001. Análise Química Quantitativa. 5ª edição. Rio de Janeiro: LTC.
- Hassan, I.A.** 2006. Effects of water stress and high temperature on gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Triticum aestivum* L. *Photosynthetica* 44: (2) 312 – 315.
- Karlsson, G.P.; Karlsson, P.E.; Soja, G.; Vandermeiren, K. & Pleijel, H.** 2004. Test of the short-term critical levels for acute ozone injury on plants – improvements by ozone uptake modelling and the use of an effect threshold. *Atmospheric Environment* 38: 2237 – 2245.
- Keller, T.A. & Schwager, H.** 1977. Air pollution and ascorbic acid. *European Journal of Forest Pathology* 7:338-350.

- Klumpp, G.; Guderian, R. & Kupers, K.** 1989. Peroxidase-und superoxiddismutase-aktivitat sowie Prolingehalte von fichtenna-deln nach belastung mit O₃, SO₂ und NO₂. European Journal Forest Pathology 19: 84-97.
- Klumpp A.; Klumpp G. & Domingos, M.** 1994. Plant as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. Environmental Pollution 85: 109 – 116.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G.; Vergne, P.; Sifakis, N.; Sanz, M.J.; Rasmussen, S.; Ribas, H.; Peñuelas, J.; Kambezidis, H.; He, S.; Garrec, J.P. & Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. Atmospheric Environment 40 (38): 7437 – 7448.
- Koppel, A. & Sild, E.** 1995. Bioindication of ozone in Estonia by using the tobacco variety Bel W3. Air and soil pollution 85: 1515 – 1519.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1998. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. Environmental Pollution 50: 101-137.
- Kuk, Y. I, Shin, J. S., Burgos, N. R., Hwang, T. E., Han, O., Cho, B.H., Jung, S.Y. & Guh, J. O.** 2003. Antioxidative enzyme offer protection from chilling damage in rice plants. Crop Science 43 (96): 2109-2117.
- Larcher, W.** 2000. Ecofisiologia Vegetal. Rima, São Carlos.
- Luwe, M.W.F.; Takahama, U. & Heber, U.** 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacea oleraceae* L.) leaves. Plant Physiology 101: 969 – 976.
- Manning, W. J. & Feder, W. A.** 1980. Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Pubhishers LTDA., London.

- Mehlhorn, H.; Tabner, B.J. & Wellburn, A.R.** 1990. Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plantas exposed to ozone. *Physiology Plantarum* 79: 377 – 383.
- Molina, M.J. & Molina, L.T.** 2004. Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association* 54: 644 – 680.
- Monteiro, L.; Vasconcellos, P.C.; Souza, S.R.; Pires, M.A.F.; Sanchez-Ccoyllo, O.R.; Andrade, M.F. & Carvalho, L.R.F.** 2002. Measurements of atmospheric carboxylic acids and carbonyl compounds in São Paulo City, Brazil. *Environmental Science Technology* 35: 3071-3081.
- Muggli, R.** 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: *Free radicals and antioxidants in nutrition* (F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi and C. Rice-Evans eds.). Richelieu Press, London, p. 189 – 250.
- Osswald, W.F.; Kraus, R.; Hipelli, S.; Bens, 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 damage spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Physiology* 139: 742-748.
- Otto, H.W. & Daines, R.H.** 1969. Plant injury by air pollutants: influence of humidity on stomatal apertures and plant response to ozone. *Science* 163 (3872): 1209 – 1210.
- Pastori, G.M.; Kiddle, G.; Antoniow, J.; Bernard, S.; Veljovic-Jovanovic, S.; Verrier, P.J.; Noctor, G. & Foyer, C.H.** 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defence transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell* 15: 939 – 951.
- Pavet, V.; Olmos, E.; Kiddle, G.; Mowla, S.; Kumar, S.; Antoniow, J.; Alvarez, M.E. & Foyer, C.H.** 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 1291-1303.

- Payton P.; Webb R.; Kornyejev D.; Allen R. & Holaday A.S.,** 2001. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *Journal of Experimental Botany* 52: 2345-2354.
- Peñuelas, J.; Ribas, A.; Gimeno, B.S. & Filella, I.** 1998. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (N.E. Spain). *Environmental Monitoring and Assessment*. 56: 221 – 224.
- Polle, A. & Rennenberg, H.** 1991. Superoxide dismutase activity in needles of scots pine and norway spruce under field and chamber conditions: lack of ozone effects. *New Phytologist* 117 (2): 335 – 343.
- Pramanik, S.; Raychaudhuri. S. & Chakraborty, S.** 1996. Changes in esterase and superoxide dismutase isozymes during *in vitro* morphogenesis in *Plantago ovata* Forsk. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 44: 123 -127.
- Puckette, M.C.; Weng, H. & Mahalingam, R.** 2007. Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 70 – 79.
- Ranieri, A.; Schenone, G.; Lencioni, L. & Soldatini, G.F.** 1994. Detoxificant enzymes in pumpkin grown in polluted ambient air. *Journal of Enviromental Quality* 23: 360 – 364.
- Rank, B.** 1997. Oxidative stress response and photossystem efficiency in trees of urban ares. *Potosynthetica* 33: 467-481.
- Ribas, A. & Peñuelas, J.** 2003. Biomonitoring of tropospheric ozone phytotoxicity in rural Catalonia. *Atmospheric Environment* 37: 63-71.
- Sant’Anna, S.M.R.** 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* Bel W3 para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo. Tese de doutorado - São Paulo.

- Schraudner, M.; Moeder, W.; Wiese, C.; Van Camp, W.; Inzé, D.; Langebartels, C. & Sandermann, H.J.** 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The plant journal* 2: 235 – 245.
- Smirnoff, N.** 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.
- Smirnoff, N.; Wheeler, G.L. & Loewus, F.A.** 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in biochemistry and molecular biology* 35 (4): 291 – 314.
- Souza, S.R.; Korn, M.; Tavares, M.F.; Carvalho, L.R.F. & Korn, M.G.A.** 1998. Multi parametric evaluation of the chemical ultrasonic irradiation effects in a heterogeneous metal-water system. *Ultrasonics, Holanda*. Vol. 36 p. 595-602.
- Souza, S. R. & Carvalho, L. R. F.** 2001. Seasonality Influence in the distribution of formic and acid in the urban atmosphere of São Paulo City, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society, Revista Brasileira*, v. 12, p. 755-762.
- Souza, S. R.; Sant’Anna, S. M. R.; Rinaldi, M. C. S. & Domingos, M.** 2008. Short-term leaf responses of *Nicotiana tabacum* Bel W3 to ozone under the environmental conditions of São Paulo, SE-Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. No prelo.
- Takahama, U. & Oniki, T.** 1992. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant and cell physiology* 33: 379 – 387.
- 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 3957/3. *VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft*, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

- Veljovic-Jovanic, S.D.; Pignocchi, C.; Noctor, G. & Foyer, C.H.** 2001. Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology* 127: 426 – 435.
- Vergé, X.; Chapuis, A. & Delpoux, M.** 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental Pollution* 118: 337 – 349.
- Wieser, G.; Hasler, R.; Gotz, B.; Koch, W. & Havranek, W.M.** 2000. Role of climate, crown position, tree age and altitude in calculated ozone flux into needles of *Picea abies* and *Pinus cembra*: a synthesis. *Environmental Pollution* 109: 415 – 422.
- Wilhour, R. G.** 1970. The influence of ozone on white ash (*Fraxinus americana* L.) Ph.D. Dissertation, Pennsylvania State Univ., University Park, PA (Pennsylvania State Univ. CAES Pub. N° 188-71. 86 pp).
- Winston, G. W.** 1990. Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defences. In: Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanism. RG Alscher, JR Cummings (eds.). Wiley-Liss, New York, pp. 57-86.
- Wu, Y.X. & Tiedemann, A.V.** 2002. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environmental Pollution* 116: 37-47.
- Yabuta, Y.; Motoki, T.; Yoshimura, K.; Takeda, T.; Ishikawa, T. & Shigeoka, S.** 2002. Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative system under photo-oxidative stress. *The Plant Journal* 32: 915 – 925.
- Yoshimura, K.; Miyao, K.; Gaber, A.; Takeda, T.; Kanaboshi, H.; Miyasaka, K. & Shigeoka, S.** 2004. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. *The Plant Journal* 37: 21 – 33.

Yuska, D.E.; Skelly, J.M.; Ferdinand, J.A.; Stevenson, R.E.; Savage, J.E.; Mulik, J.D.

& Hines, A. 2003. Use of bioindicators and passive sampling devices to evaluate ambiente ozone concentrations in north central Pennsylvania. *Environmental Pollution* 125: 71 – 80.

CAPÍTULO III

RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS EM PLANTAS DE *NICOTIANA TABACUM* “BEL W3” AO OZÔNIO E SUAS RELAÇÕES COM DANOS FOLIARES

Resumo

Como constatado no capítulo II, variações diárias nos níveis de ácido ascórbico total e na atividade de superóxido dismutase, juntamente com variações na temperatura do ar e na contaminação atmosférica por ozônio, foram determinantes da progressão dos danos foliares durante a permanência de plantas de *N. tabacum* Bel-W3 em ambiente poluído por ozônio. Desta forma, o estudo desse capítulo teve como objetivo verificar se o ozônio, em concentrações observadas no meio urbano de São Paulo, é de fato capaz de alterar os níveis de respostas antioxidativas em plantas de *N. tabacum* Bel W3 e se tais alterações podem interferir na ocorrência e na intensidade de necroses foliares. Escolheram-se o ácido ascórbico e superóxido dismutase como indicadores de tais respostas. As plantas foram expostas, por dois e quatro dias, em duas câmaras de fumigação, sendo que uma recebia ar filtrado e a outra recebia ar filtrado acrescido de poluente em concentrações previamente estabelecidas: 20, 40, 60 e 80 ppb de ozônio (correspondente a 40, 80, 120 e 160 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), definidas em função da concentração atmosférica diária observada em experimentos de campo. Os resultados mostram que a redução no conteúdo de ácido ascórbico nas plantas expostas a concentrações crescentes de ozônio, ao ser acompanhada pelo aumento da porcentagem da área foliar tomada por necroses, foi uma clara indicação da sensibilidade dessa cultivar ao ozônio. Os resultados apontam também para a existência de respostas bioquímicas dependentes do tempo de exposição em plantas de tabaco Bel W3 sob fumigação de ozônio.

Palavras-chaves: *Nicotiana tabacum* Bel W3, ozônio, respostas antioxidativas

Abstract

As noted in chapter II, daily variations on the levels of ascorbic acid as well as on air temperature and ozone concentrations determined the progression of leaf injury during the exposure of plants of *N. tabacum* Bel W3 at a contaminated environment by ozone. Thus, the study of this chapter aimed to confirm whether the ozone in concentrations observed in the city of São Paulo, is able to change the levels of antioxidative responses in plants of *N. tabacum* Bel W3 and whether such changes can interfere on the occurrence and intensity of injury. Ascorbic acid and superoxide dismutase were chosen as indicators of such responses. The plants were exposed in two fumigation chambers, for two and four days. One of them received filtered air and the other received filtered air plus ozone in concentrations previously established according to the daily atmospheric concentration observed in the field experiments (20, 40, 60 and 80 ppb of ozone). The results show that the reduction in the content of ascorbic acid in plants exposed to increasing concentrations of ozone was followed by the increase of percentage of leaf area affected by necroses. This is a clear indication of the sensitivity of this cultivar to ozone. The results also showed that the biochemical responses in tobacco plants exposed to ozone were time dependent.

Keywords: *Nicotiana tabacum* Bel W3, ozone, antioxidative responses

Introdução

Diversos problemas ambientais têm sido causados pela poluição troposférica na região metropolitana de São Paulo. Milhões de habitantes estão constantemente expostos a emissões provenientes das indústrias e dos veículos. Os veículos constituem a principal fonte de poluição atmosférica em São Paulo, não somente devido a sua grande frota e à inexistência de controle de sua emissão de gases, como também devido ao uso de diferentes tipos de combustível (Domingos *et al.* 2002). Segundo Campos *et al.* (1999), nossa frota já era constituída, no final do século passado, por 62%, 30% e 8% de veículos movidos pela queima de gasool (uma mistura de gasolina e etanol), etanol puro e diesel, respectivamente, tornando a composição da atmosfera de São Paulo peculiar.

A queima de combustível introduz compostos oxigenados na troposfera, como óxido nítrico, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos, os quais são responsáveis por diversas reações atmosféricas que produzem radicais orgânicos, peróxido de hidrogênio, nitrato de peroxiacetila e ozônio (Monteiro *et al.* 2002).

Conforme comentado no capítulo anterior, os compostos fotoquímicos, como o ozônio, são extremamente tóxicos aos organismos por causarem um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células, que podem afetar moléculas vitais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Muggli 1993). Por outro lado, antioxidantes não-enzimáticos, como o ácido ascórbico e enzimáticos, como a superóxido dismutase e as peroxidases, podem minimizar os efeitos tóxicos das EROs (Iqbal *et al.* 1996). Entretanto, em plantas sensíveis como *N. tabacum* Bel-W3, o balanço oxidante-antioxidante é geralmente interrompido rapidamente (Muggli 1993). Como resultado disso, espera-se que ocorram distúrbios metabólicos, fisiológicos e estruturais nas folhas dessas plantas sensíveis, que podem culminar com morte celular pronunciada e, em consequência, com o surgimento de necroses foliares. Tais plantas sensíveis são consideradas, assim, excelentes bioindicadoras de poluição atmosférica (VDI 1999; De Temmerman *et al.* 2004).

Nicotiana tabacum “Bel W3” tem sido utilizada para biomonitoramento de ozônio na Europa e América do Norte (Krupa & Manning 1988, Heggstad 1991, VDI 2000), devido a sua alta sensibilidade ao poluente, mostrando necroses em suas folhas, inquestionavelmente associadas ao ozônio e facilmente quantificáveis ao olho nu (Horsman 1981, Peñuelas *et al.* 1999, Vergé *et al.* 2002). Klumpp *et al.* (2006), através de um programa de biomonitoramento executado com sucesso em diversas cidades européias, por exemplo, mostrou que a cultivar “Bel W3” de tabaco foi adequada para indicar locais e períodos do ano mais e menos contaminados por ozônio. Entretanto, relações lineares fortes entre concentrações de ozônio e porcentagem de tecido foliar coberto por necroses, uma condição ideal para biomonitoramento quantitativo, de acordo com Arndt & Schweizer (1991), foram encontradas somente em poucas cidades. Estes autores e outros, como Koppel & Sild (1995), Finnan *et al.* (1996), Antonielli *et al.* (1997), Peñuelas *et al.* (1999) e Vergé *et al.* (2002), concluíram que variações meteorológicas podem interferir na absorção de ozônio via estômato, e assim afetar as relações lineares. Portanto, a eficiência bioindicadora de *N. tabacum* “Bel W3” é fortemente dependente de condições ambientais como um todo.

Na cidade de São Paulo, situada na região sudeste do Brasil, *N. tabacum* “Bel W3” foi utilizada com sucesso para o biomonitoramento qualitativo de ozônio ao redor do complexo industrial de Cubatão (Klumpp *et al.* 1994) e de maneira preliminar em um local urbano da cidade de São Paulo (Domingos *et al.* 2002). Entretanto, esses autores não puderam mostrar se as injúrias foliares foram predominantemente causadas por ozônio troposférico, devido à carência de dados de qualidade do ar. Diante disso, Sant’Anna (2007), em um estudo posterior realizado para determinar a viabilidade dessa planta para biomonitoramento de ozônio atmosférico na cidade de São Paulo, partiu a priori da hipótese de que *N. tabacum* “Bel W3” seria eficiente para biomonitoramento quantitativo sob as condições tropicais encontradas em São Paulo, por meio do estabelecimento de relação linear significativa entre necroses foliares e concentração de ozônio atmosférico. Entretanto, a autora rejeitou a

posteriori essa hipótese, visto que tal relação linear não foi comprovada e que, além de ozônio, fatores meteorológicos e outros poluentes estão entre as variáveis determinantes da ocorrência e da extensão de danos visíveis sobre as folhas. Por isso, com base em conceitos bem estabelecidos, levantaram-se novas hipóteses para explicar a ausência de tais relações lineares, parte das quais vêm sendo testadas na presente dissertação de mestrado, em condições de campo e experimentais.

No capítulo II, comprovou-se que variações diárias nos níveis de ácido ascórbico e na atividade de superóxido dismutase, juntamente com variações na temperatura do ar e na contaminação atmosférica por ozônio, foram determinantes da progressão dos danos foliares durante a permanência de plantas de *N. tabacum* Bel-W3 em ambiente poluído por ozônio.

O estudo contido neste capítulo teve como objetivo verificar se o ozônio, em concentrações observadas no meio urbano de São Paulo, é de fato capaz de alterar os níveis de respostas antioxidativas em plantas de *N. tabacum* Bel-W3 e se tais alterações podem interferir na ocorrência e na intensidade de necroses foliares. Desse modo, essa etapa foi desenvolvida em condições de laboratório.

Materiais e Métodos

Cultivo de N. tabacum “Bel W3”

O cultivo de *N. tabacum* “Bel W3” seguiu o mesmo protocolo (VDI 2003) já descrito no capítulo II, sendo aqui brevemente citado.

Sementes foram doadas pela Universidade de Hohenheim (Alemanha) e foram utilizados substrato comercial Plantimax (Eucatex) e vermiculita fina, misturados na proporção de 3:1, respectivamente. A irrigação foi mantida por capilaridade, sendo que as mudas permaneceram em casa de vegetação com ar filtrado durante todo cultivo até o início de cada experimento. Os experimentos eram iniciados quando as plantas apresentavam seis

folhas expandidas, sendo que um dia antes de cada experimento, a terceira folha mais velha era marcada.

Sistema de fumigação

Os aparatos, os dispositivos e a instrumentação que compõem o sistema das câmaras estão apresentados na Figura 1. Conforme descrito em detalhes por Sant'Anna (2007), o sistema é constituído das seguintes partes distintas, a saber: aparato para purificar e umidificar o ar; misturador, tubulação e válvulas; dispositivo gerador de ozônio e controlador de gases; câmaras de fumigação; instrumentação para monitoramento de poluentes e aquisição de dados (Figura 2).

O aparato para purificação do ar é composto de um compressor, seguido de filtro secador, regulador de pressão e tubo de aço inox, contendo filtros para eliminar contaminantes em baixas concentrações, tais como hidrocarbonetos (THC), NO, O₃ e outros. Um nebulizador de vapor de água é inserido na tubulação de ar purificado para gerar umidade adequada. Ainda, nessa linha de tubulação, encontram-se termopares para medir a temperatura de bulbo seco (TBS) e bulbo úmido (TBU). É importante monitorar essas duas categorias de temperatura para calcular a umidade resultante no sistema.

O compartimento seguinte contém dois tubos cilíndricos (75 x 350 mm), denominados misturadores, que promovem à homogeneidade da mistura. Esses tubos são semelhantes aos pré-reatores utilizados no sistema de reator. Cada misturador possui aberturas laterais que permitem introduzir gases contidos em cilindros de alta pressão, tais como THC, NO, CO. Válvulas de segurança (VS) são acopladas aos misturadores para reduzir a pressão no sistema quando necessário.

Medidores e controladores de vazão mássica (MV) são fixados no sistema para conhecer as vazões de ar e do gás poluente a serem introduzidos nas câmaras. Um equipamento gerador de ozônio é acoplado entre os dois misturadores. Quando o ar isento de

impurezas passa através do primeiro misturador, a válvula de controle (VC) se abre, fornecendo ar ao ozonizador e permitindo, assim, ocorrer a geração de ozônio. Quando não é necessária a geração de ozônio, esta válvula se mantém fechada.

Válvulas de controle (VC) também são introduzidas na linha de tubulação antes da entrada dos gases nas câmaras. Estas válvulas têm a finalidade de manter o fluxo de gás constante e igual no interior das câmaras. A pressão de entrada do gás é monitorada por meio de dois manômetros de coluna d'água, que são instalados entre as câmaras.

As câmaras de fumigação, propriamente ditas, são fechadas, com volume de 1m^3 e são construídas de filme de Teflon fixado em armação de aço inox. A parte inferior das câmaras e os suportes das plantas são também constituídos de aço inox.

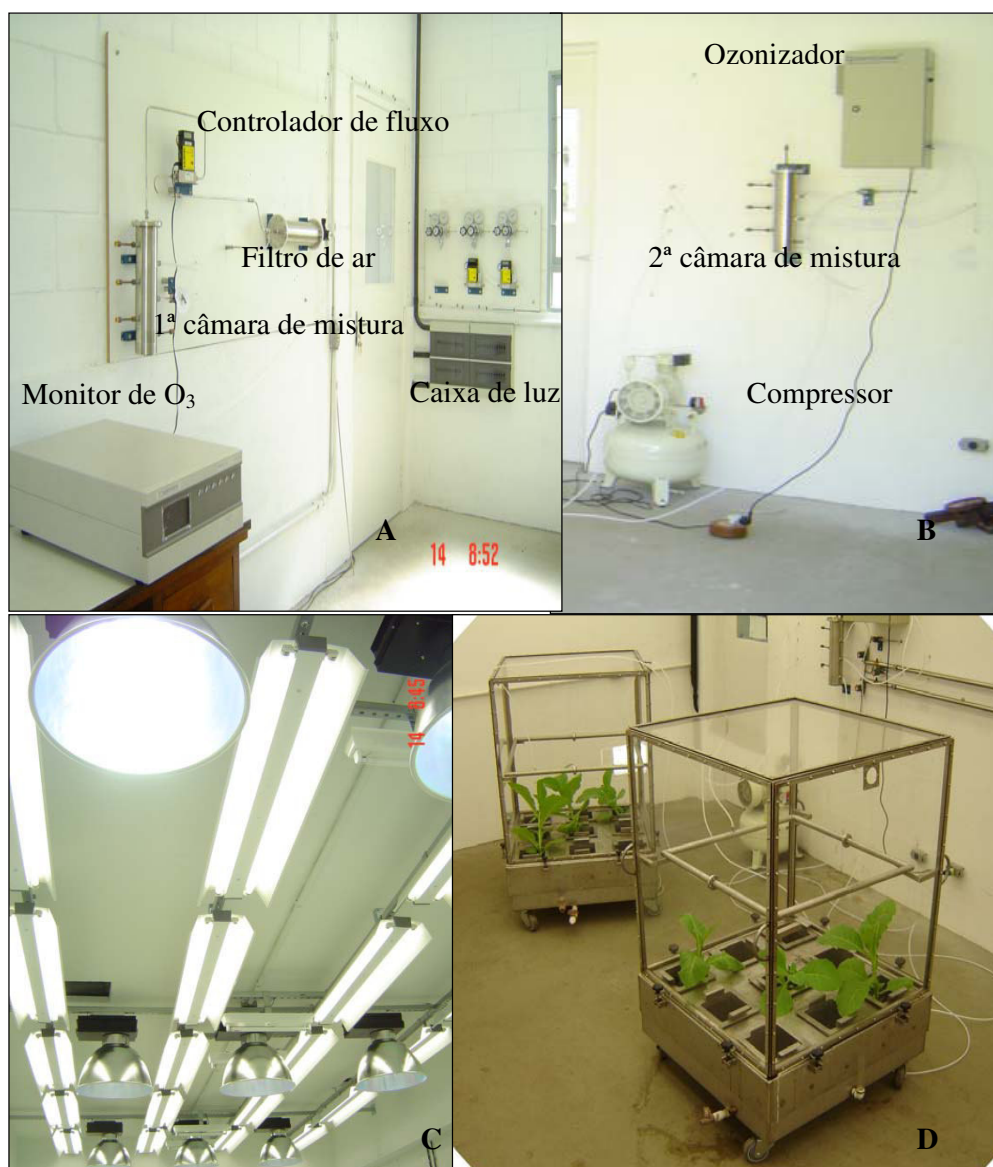


Figura 2. Fotos do sistema de fumigação: equipamentos (A e B), câmaras (C) e lâmpadas (D), elaborado pela Dra. Silvia Maria Romano Sant'Anna (2007).

Todos os experimentos de fumigação foram conduzidos em duas câmaras, uma câmara recebia ar filtrado e a outra, ar filtrado acrescido do poluente em concentrações previamente estabelecidas. Durante os experimentos, estas permaneceram no interior de um laboratório, sob iluminação artificial (em média $156 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por 8 horas), suprida por lâmpadas de vapor metálico 400 W e de fluorescência 30 W TL05, que emitem luz na faixa de 400-700 nm, simulando a faixa espectral de radiação fotossinteticamente ativa. 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, umidade relativa do ar e radiação foram 28 ± 4 °C, $88 \pm 6\%$ e $156 \pm 8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente.

Experimentos de fumigação com ozônio

O ozônio foi produzido por um equipamento (ozonizador). Na 1ª câmara de mistura, o ar limpo foi dividido e uma pequena parte deste passava pelo equipamento e o ozônio produzido era homogeneizado com o ar limpo na 2ª câmara de mistura, em proporções que variaram em função da concentração de ozônio a ser gerada, sendo, então, levado para a câmara de fumigação. O ozônio era gerado por descarga elétrica, pela dissociação do oxigênio contido no ar filtrado. Os níveis de ozônio no interior da câmara foram continuamente medidos com um monitor modelo EcotechTM 9810B.

As concentrações de ozônio escolhidas para a fumigação em plantas de *N. tabacum* foram 20, 40, 60 e 80 ppb, as quais foram definidas em função da concentração atmosférica diária observada em experimentos de campo. Uma réplica de cada tratamento foi realizada.

Para cada experimento, foram utilizadas seis plantas de *N. tabacum* “Bel W3” por câmara, sendo que três plantas eram mantidas por dois dias e as três restantes eram mantidas por quatro dias sob fumigação com ozônio e com ar filtrado.

Avaliação da injúria foliar e procedimentos analíticos

A avaliação das injúrias foliares, realizada por Sant’Anna (2007), seguiu protocolo proposto por VDI (2003) previamente descrito no capítulo II. Da mesma forma, a concentração de ácido ascórbico total e atividade de superóxido dismutase também seguiram os respectivos protocolos já descritos no capítulo II, sendo analisada por espectrofotometria, segundo Keller & Schwager (1977) e Osswald *et al.* (1992), respectivamente.

Análise Estatística

Diferenças entre os tratamentos nos experimentos de fumigação foram determinadas através da análise de variância (Teste F), seguida pelo teste de comparação de pares Student Newman-Keuls. Valores médios das medidas realizadas nas plantas expostas ao mesmo tratamento de fumigação por dois e quatro dias foram comparados pelo teste T. Quando necessário, os dados foram transformados ($\log_{10}$ ou raiz quadrada) para alcançar a normalidade e a igualdade de variância. O software SigmaStat 2.0 foi utilizado em todos os testes. Análises de regressão entre % de área foliar com necroses e respostas antioxidativas foram igualmente realizadas.

Resultados

A Figura 3 apresenta o perfil médio da concentração de ácido ascórbico total ao longo dos diferentes tratamentos de fumigação com ozônio por dois e quatro dias. A maior concentração do antioxidante ocorreu em plantas fumigadas por dois dias com 40 ppb de ozônio. Por outro lado, as plantas que permaneceram expostas por quatro dias a 20 e 40 ppb de ozônio mostraram as mais baixas concentrações. A concentração do ácido ascórbico foi significativamente menor nas plantas expostas a 40 ppb de O_3 por quatro dias do que nas plantas fumigadas com o mesmo nível de ozônio por dois dias. A curva que melhor se ajustou aos resultados foi a polinomial de segunda ordem ocorrida na fumigação de quatro dias.

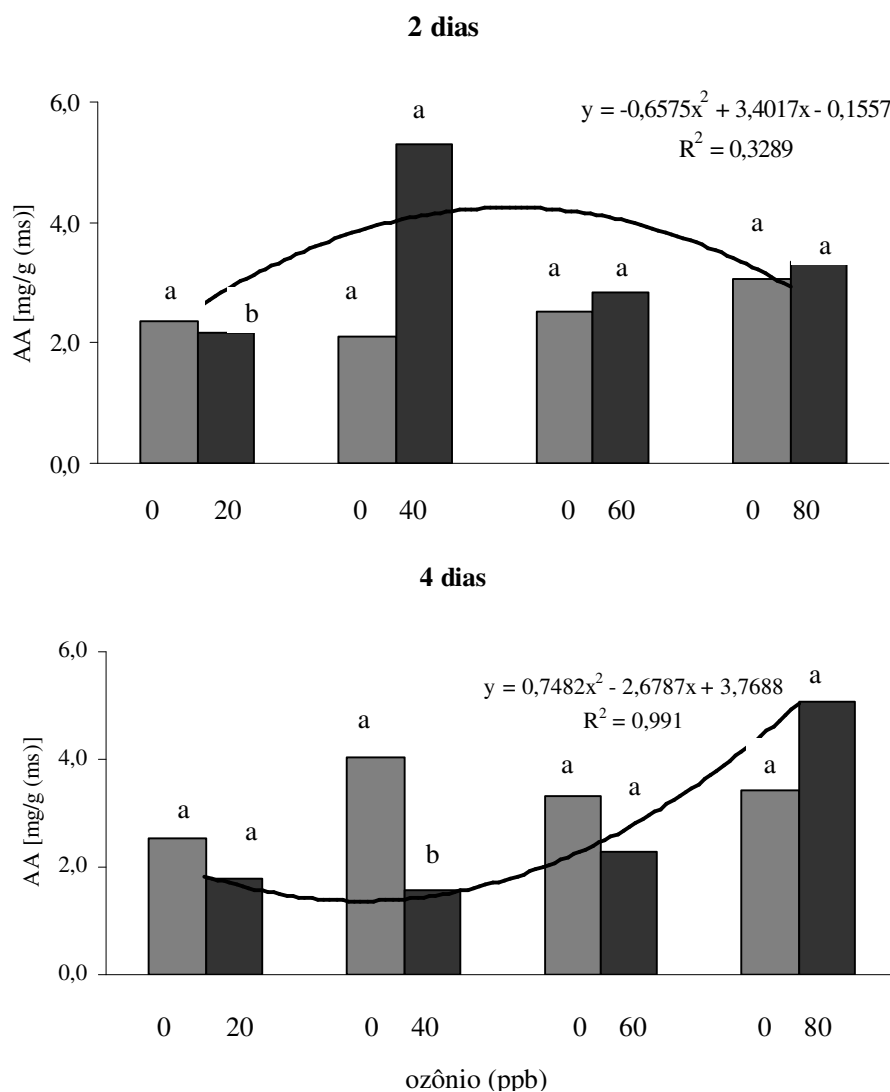


Figura 3. Valores médios da concentração de ácido ascórbico (AA) em plantas de *N. tabacum* “Bel W3” fumigadas com ozônio, em diferentes concentrações, durante dois e quatro dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios obtidos para plantas expostas a situação controle (0) e seus respectivos níveis de ozônio (20, 40, 60 e 80 ppb), após dois e quatro dias de fumigação ($p < 0,05$).

A atividade da superóxido dismutase foi significativamente mais e menos intensa nas plantas fumigadas com 20 e 60 ppb de O_3 , respectivamente, durante dois dias. Atividades similares desta enzima foram verificadas em plantas expostas a todos os níveis de ozônio

durante dois e quatro dias e não diferiram dos valores obtidos nas plantas expostas ao ar filtrado (figura 4). As maiores atividades da enzima superóxido dismutase foram verificadas em plantas fumigadas com 40 ppb de ozônio durante quatro dias, quando comparadas àquelas fumigadas por dois dias. Como ocorrido com o ácido ascórbico, a curva de maior explicabilidade foi a polinomial de segunda ordem, porém, na fumigação de dois dias.

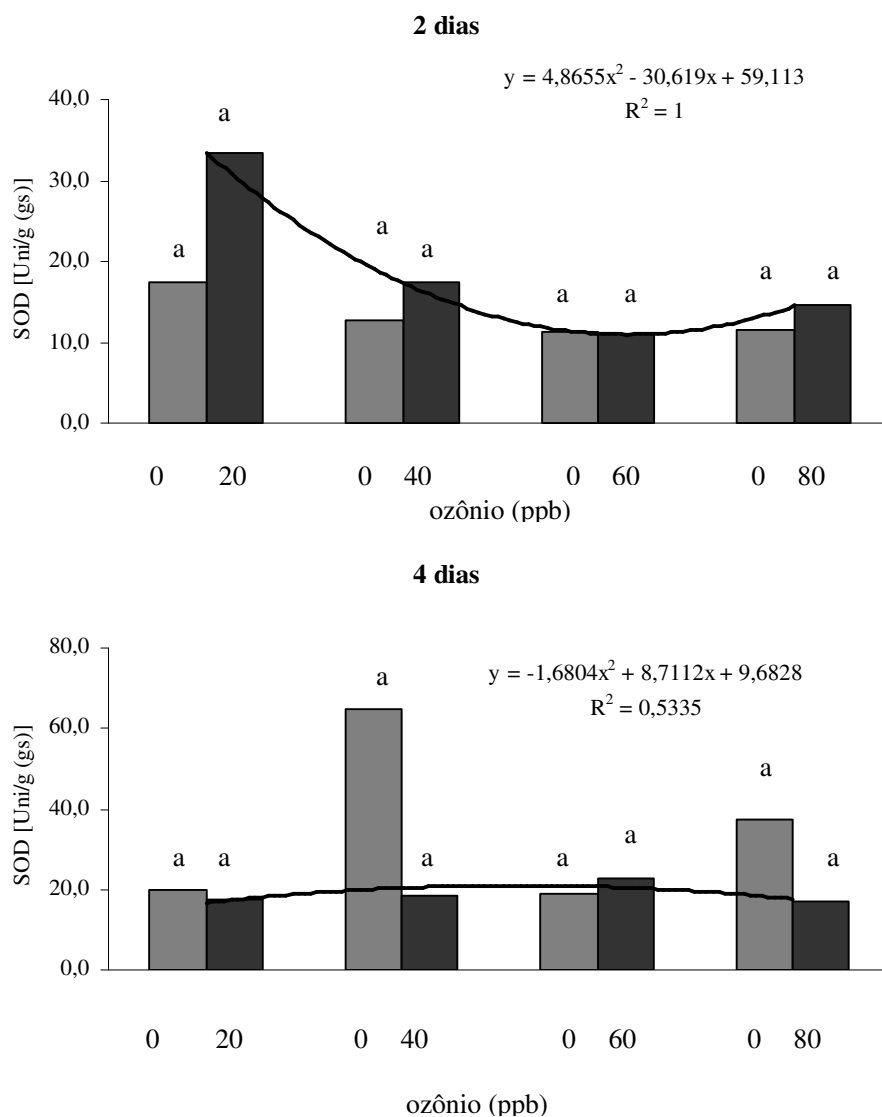


Figura 4. Valores médios da atividade da superóxido dismutase (SOD) em plantas de *N. tabacum* “Bel W3” fumigadas com ozônio, em diferentes concentrações, durante dois e quatro dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios obtidos para plantas expostas a situação controle (0) e seus respectivos níveis de ozônio (20,

40, 60 e 80 ppb), após dois e quatro dias de fumigação ($p < 0,05$). Valores de SOD divididos por 10^2 .

As injúrias foliares foram significativamente mais intensas nas plantas expostas por quatro dias, em relação às outras expostas por dois dias (figura 5). Entretanto, enquanto um aumento dos níveis de ozônio foi seguido por um aumento da porcentagem de injúrias foliares nas plantas expostas por dois dias, a maior intensidade de necroses foliares foi alcançada em plantas mantidas em fumigação de 40 ppb de ozônio por quatro dias. Neste caso, a exposição de 60 ou 80 ppb de O_3 não causou um aumento significativo da área foliar afetada por necroses. Como esperado, as plantas expostas ao ar filtrado (aqui representado por 0 ppb de ozônio) não apresentaram injúrias foliares.

As análises de regressão mostraram não haver relação linear significativa entre a porcentagem de injúrias foliares e concentração de ozônio. O modelo que melhor explicou essa relação, tanto nas plantas fumigadas por dois quanto nas fumigadas por quatro dias foi o polinomial de segunda ordem (figura 5), assim como o ocorrido com o perfil dos antioxidantes. Entretanto, observa-se que a inclinação das curvas foi distinta, mostrando uma tendência à estabilização dos danos nas plantas mantidas sob concentrações acima de 40 ppb por quatro dias e ao aumento crescente da área foliar afetada por necroses naquelas fumigadas com doses superiores a essa por dois dias. Sendo assim, é possível deduzir que ao aumentarmos a concentração de ozônio acima de 80 ppb poderemos obter um aumento de danos foliares para as plantas expostas por dois dias, mas o mesmo não ocorrerá com as plantas expostas por quatro dias (descrição de resultados incluída em Sant'Anna 2007).

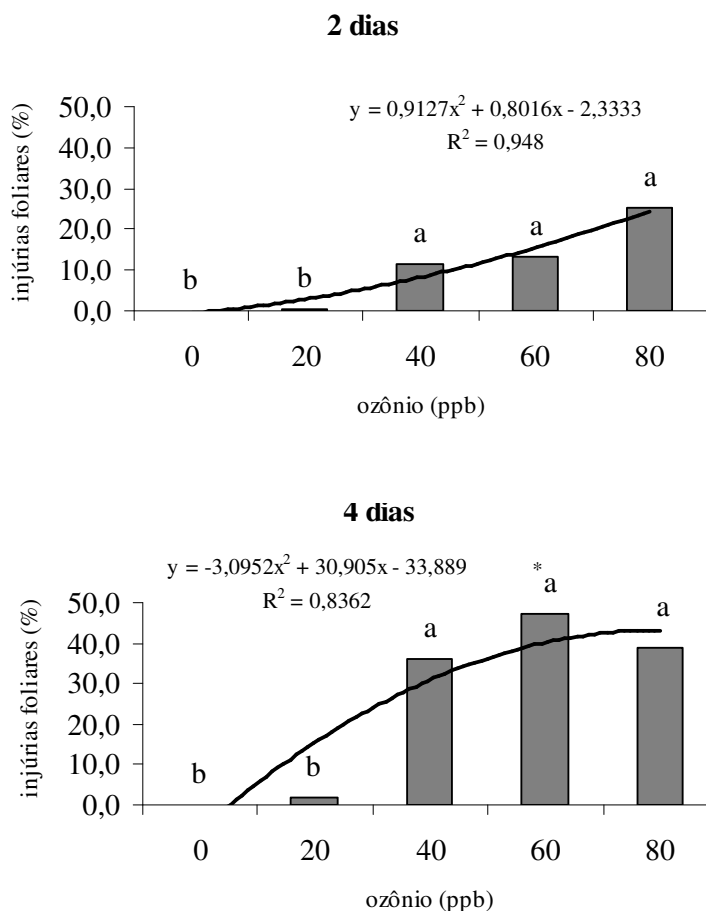


Figura 5. Perfil médio das injúrias foliares nos diferentes tratamentos de fumigação com ozônio (obtido por Sant'Anna 2007). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios obtidos para plantas expostas a diferentes níveis de ozônio após dois e quatro de fumigação ($p < 0,05$). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os valores médios obtidos após dois e quatro dias de exposição ao mesmo tratamento de ozônio.

Em se tratando da relação entre antioxidantes e injúrias foliares, observa-se nas figuras 6 e 7, que as melhores correlações para ácido ascórbico e superóxido dismutase foram obtidas aos dois dias de fumigação de *N. tabacum* com as diferentes concentrações de ozônio. Assim como nos resultados obtidos anteriormente, o modelo que mais explicou a relação entre antioxidantes e injúrias foliares nos dois e quatro dias de fumigação foi o

polinomial de segunda ordem, mas, neste caso, os modelos mais explicativos foram encontrados após dois dias de fumigação.

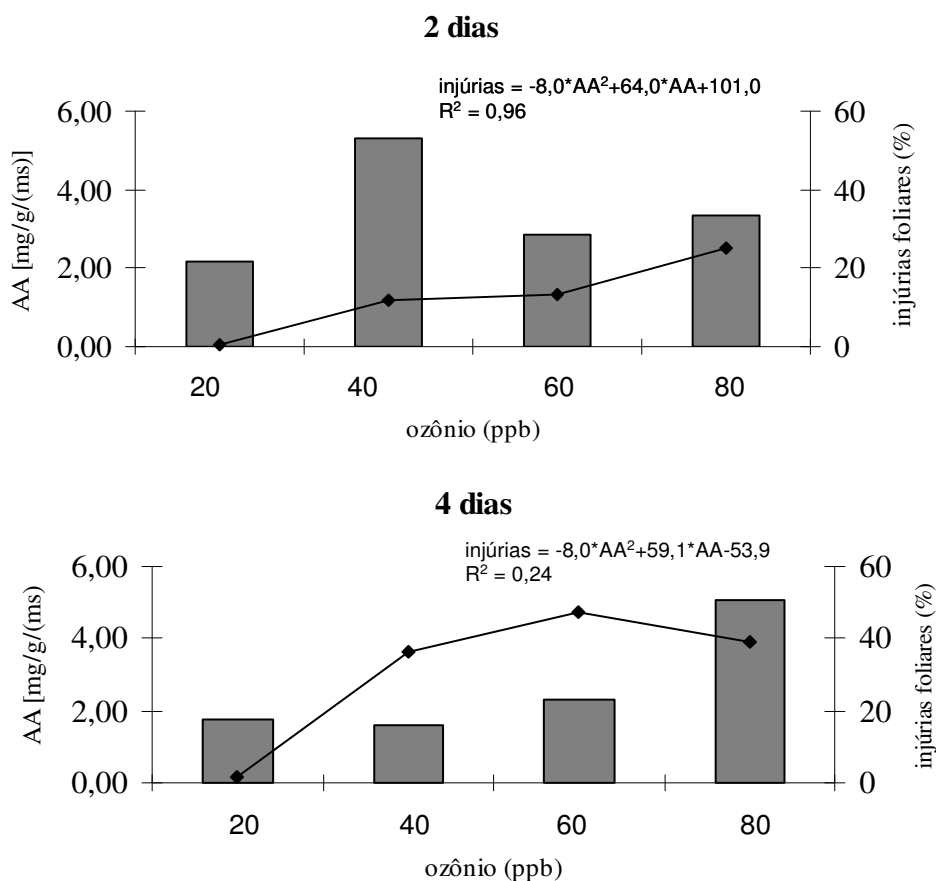


Figura 6. Relação das médias entre ácido ascórbico (AA) e injúrias foliares nos diferentes tratamentos de fumigação de *N. tabacum* Bel W3 aos dois e quatro dias, respectivamente.

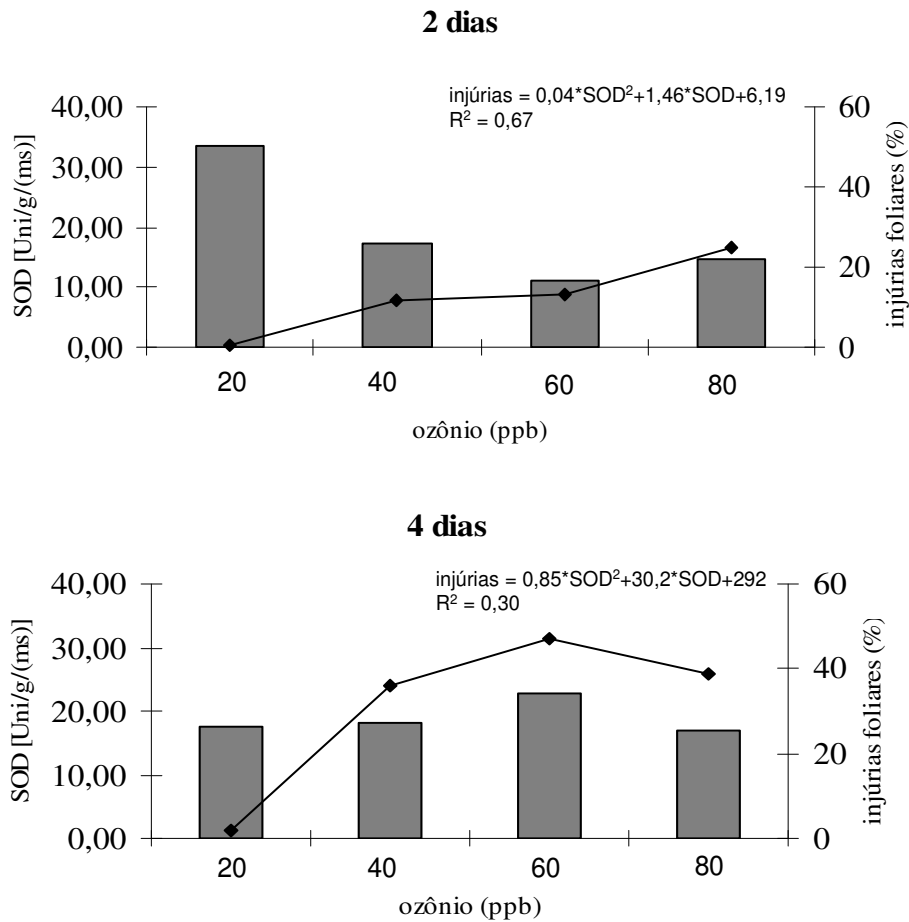


Figura 7. Relação das médias entre superóxido dismutase (SOD) e injúrias foliares nos diferentes tratamentos de fumigação de *N. tabacum* Bel W3 aos dois e quatro dias, respectivamente. Dados de SOD divididos por 10^2 .

Discussão

As defesas antioxidativas encontradas nas plantas podem ser consideradas um dos muitos fatores que interferem na resposta visual das plantas ao ozônio, ao prevenir os danos oxidativos nas células. No presente estudo, o ácido ascórbico, entre os antioxidantes analisados, foi o mais evidentemente modificado nas plantas de *N. tabacum* Bel W3 fumigadas por dois e quatro dias com 40 ppb de O_3 ou mais. A redução no conteúdo de ácido

ascórbico nas plantas expostas a concentrações crescentes de ozônio, ao ser acompanhada pelo aumento da porcentagem da área foliar tomada por necroses, é uma clara indicação da sensibilidade dessa cultivar ao ozônio. Experimentos realizados por Puckette *et al.* (2007) revelaram que o ácido ascórbico foi igualmente um antioxidante chave para determinação do grau de tolerância de cultivares de *Medicago truncatula* à fumigação aguda com O₃ (75 nmol⁻¹ de O₃ por seis horas durante oito dias). Em algumas cultivares, houve aumentos significativos em seus níveis após a fumigação com ozônio, enquanto em outras houve um decréscimo significativo, sugerindo que diversos mecanismos fisiológicos e bioquímicos podem governar a tolerância ou a sensibilidade das plantas ao ozônio. Outros estudos reforçam essa hipótese. Por exemplo, plantas transgênicas de tabaco, com superexpressão de deidroascorbato redutase, aumentam a concentração endógena de ascorbato e se tornam mais tolerantes ao ozônio (Chen & Gallie 2005). Lee *et al.* (1984) reportaram um acúmulo de AA em células de soja após exposição ao ozônio. Varshney & Rout (1998) observaram o aumento dos níveis de ácido ascórbico em plantas resistentes e decréscimo em plantas sensíveis de tomate. Burkey & Eason (2002), em estudo realizado com o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), constataram que os níveis extracelulares de ácido ascórbico estão associados com a tolerância ao ozônio. Já em 2006, em estudo realizado com espécies selvagens nativas dos Estados Unidos, Burkey *et al.* concluem que as diferenças no metabolismo do ácido ascórbico determinam o grau de sensibilidade ao ozônio.

Porém, uma relação direta entre ácido ascórbico e a sensibilidade ao ozônio nem sempre é observada. De acordo com D'Haese *et al.* (2005), somente o aumento das concentrações de ascorbato apoplástico não puderam explicar diferenças no que diz respeito à tolerância de ozônio em clones de *Trifolium*. Tiwari *et al.* (2006), em estudo realizado com cenoura (*Dacus carota* var. Pusa Kesar), constataram que o aumento do conteúdo de AA poderia ser uma consequência de um substancial estresse oxidativo e não exatamente uma indicação de tolerância ao ozônio.

No presente estudo, alterações na atividade da superóxido dismutase, por sua vez, não foram respostas indicadoras claras da sensibilidade de plantas de tabaco Bel W3 ao ozônio, especialmente após quatro dias de exposição a qualquer concentração de ozônio. A atividade dessa enzima apresentou-se oscilatória no presente experimento de fumigação, a exemplo do que ocorreu nos experimentos de campo (capítulo II), apesar de ser uma substância antioxidante de suma importância para evitar a ocorrência de injúrias foliares após exposição ao ozônio em muitas plantas. Na literatura, verifica-se que a função antioxidativa da superóxido dismutase, medida por meio de sua atividade, é demonstrada algumas vezes e em outras não. Schulz & Hartling (2001), em estudo de campo realizado com pinheiros em diversas localidades da Alemanha, relataram que a atividade da enzima não se modificou quando as plantas eram expostas à poluição provocada por dióxido de enxofre (SO₂), óxidos de nitrogênio (NO_x) e O₃. Em estudos realizados com duas cultivares de trevo (*Trifolium repens* L. cv. Sonja e *Trifolium pratense* L. cv. Milvus), a atividade de SOD mostrou mudanças significativas após 3 horas de fumigação a 150 nl L⁻¹ de O₃ em ambas cultivares analisadas, porém, a tendência foi diferente nas duas espécies. Houve um decréscimo de aproximadamente 27% na atividade de SOD em *T. pratense* e aumento de 50% nas folhas de *T. repens* (Scebba *et al.* 2003). Já Van Camp *et al.* (1998) e Pitcher & Zilinskas (1996) mostraram a importância da atividade da SOD em limitar ou prevenir o desenvolvimento das lesões provocadas por ozônio nas plantas transgênicas de tabaco. Em trabalho realizado com uma cultivar egípcia de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Kara), Hasan (2006) relatou que o efeito do ozônio sobre várias enzimas antioxidantes foi inconsistente em relação a sua indução ou degradação. No citado experimento, a atividade da SOD e da glutathione redutase (GR) foi inibida pela ação do poluente.

No presente estudo, verificou-se também que a relação entre níveis de ácido ascórbico e intensidade de necroses foliares ou mesmo entre esta última e variações na atividade da SOD não foi linear. Isto sugere que há outros processos fisiológicos ou bioquímicos, além

das respostas antioxidativas, que podem restringir a progressão das necroses foliares nas plantas expostas ao ozônio. Sant'Anna *et al.* (2008) mostraram, por meio de medidas da fluorescência da clorofila *a*, que o processo fotossintético, nas mesmas plantas utilizadas no presente estudo, foi comprometido, especialmente quando foram expostas a concentrações acima de 40 ppb de ozônio por quatro dias. Em função disso, as autoras concluíram que o fluxo de ozônio para o interior das folhas, via estômatos, deve ter sido reduzido em plantas expostas a concentrações acima de 40 ppb, explicando, pelo menos parcialmente, a estabilização da % de área foliar com necroses.

Além disso, a explicabilidade dos modelos propostos entre respostas antioxidativas e injúrias foliares foi nitidamente maior para plantas expostas ao ozônio por dois dias do que para plantas fumigadas por quatro dias. Isto aponta para a existência de respostas bioquímicas dependentes do tempo de exposição em plantas de tabaco Bel W3 sob fumigação 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, Eschoborn pp. 199 – 298.

Burkey, K.O. & Eason, G. 2002. Ozone tolerance in snap bean is associated with elevated

ascorbic acid in the leaf apoplast. Physiologia Plantarum 114: 387 – 394.

Burkey, K.O.; Neufeld, H.S.; Souza, L.; Chappelka, A.H. & Davison, A.W. 2006.

Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone-sensitive

wildflowers. Environmental Pollution 143: 427-434.

- Campos, I.C.; Pimentel, 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.
- Chen, Z. & Gallie, D.R.** 2005. Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiology* 138: 1673-1689.
- D’Haese, D.; Vandermeiren, K.; Asard, H. & Horemans, N.** 2005. Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L. *Plant Cell and Environment* 28: 623 – 632.
- 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, M. C.** 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo* (Bicudo DC, Forti MC & Bicudo CEM, orgs.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo, pp. 221 – 249.
- Finnan, J.M.; Jones, M.B. & Burke, J.J.** 1996. A time-concentration study on the effects of ozone on spring wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Effects on yield. Agriculture, Ecosystems and Environment* 57: 158 – 167.
- Hasan, I.A.** 2006. Physiological and biochemical response of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Kara) to O₃ and antioxidant chemicals: possible roles of antioxidant enzymes. *Annals of Applied Biology* 148: 197 – 206.
- Heggstad, H.E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C e 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 Melbourne using tobacco as an indicator plant. *Environmental Pollution Ser.B*, 69-77.
- Iqbal, M.; Abdin, M.Z.; Mahmooduzzafar, M.Y. & Agrawal, M.** 1996. Resistance mechanisms in plant against air pollution. In: *Plant Response to Air Pollution* (M. Yunnus e M. Iqbal eds). John Wiley and Sons, Chischester, p. 195 – 240.
- Keller, T.A. & Schwager, H.** 1977. Air pollution and ascorbic acid. *European Journal of Forest Pathology* 7:338-350.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G.; Vergne, P.; Sifakis, N.; Sanz, M.J.; Rasmussen, S.; Ribas, H.; Peñuelas, J.; Kambezidis, H.; He, S.; Garrec, J.P. & Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* 40 (38): 7437 – 7448.
- Klumpp A.; Klumpp G. & Domingos, M.** 1994. Plant as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85: 109 – 116.
- Koppel, A. & Sild, E.** 1995. Bioindication of ozone in Estonia by using the tobacco variety Bel W3. *Air and soil pollution* 85: 1515 – 1519.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1998. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.
- Lee, E.H.; Jersey, J.A.; Gifford, C. & Bennett. J.** 1984. Differential ozone tolerance in soybean and snap beans: analysis of ascorbic acid in O₃-susceptible and O₃-resistant cultivars by high-performance liquid chromatography. *Environment Experimental Botany* 24: 331-341.
- Monteiro, L.; Vasconcellos, P.C.; Souza, S.R.; Pires, M.A.F.; Sanchez-Ccoyllo, O.R.; Andrade, M.F. & Carvalho, L.R.F.** 2002. Measurements of atmospheric

- carboxylic acids and carbonyl compounds in São Paulo City, Brazil. *Environmental Science Technology* 35: 3071-3081.
- Muggli, R.** 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: *Free radicals and antioxidants in nutrition* (F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi and C. Rice-Evans eds.). Richelieu Press, London, p. 189 – 250.
- Osswald, W.F.; Kraus, R.; Hipelli, S.; Bens, 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 damage 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 of different sites in Catalonia (NE. Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* 56 (2): 221 – 224.
- Pitcher, L.H. & Zilinskas, B.A.** 1996. Over expression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiology* 110: 583 – 588.
- Puckette, M.C.; Weng, H. & Mahalingam, R.** 2007. Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 70 – 79.
- Sant’Anna, S.M.R.** 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* Bel W3 para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo. Tese de doutorado - São Paulo.
- Sant’Anna, S.M.R.; Esposito, M.P.; Domingos, M. & Souza, S.R.** 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* “Bel W3” for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* 151: 389 - 394.

- Scebba, F.; Soldatini, G. & Ranieri, A.** 2003. Ozone differentially affects physiological and biochemical responses of two clover species, *Trifolium repens* and *Trifolium pretense*. *Environmental Pollution* 123: 209 – 216.
- Schulz, H. & Hartling, S.** 2001. Biochemical parameters as biomarkers for the early recognition of environmental pollution on scots pines trees. II. The antioxidative metabolites ascorbic acid, glutathione, α -tocopherol and the enzymes superoxide dismutase and glutathione reductase. *Z. Naturforsch.* 56 (9-10): 767 – 780.
- Tiwari, S.; Agrawal, M. & Marshall, F.M.** 2006. Evaluation of ambient air pollution impact on carrot plants at a sub urban site using open top chambers. *Environmental Monitoring and Assessment* 119 (1-3): 15-30.
- Van Camp, W.; Van Montagu, M. & Inzé, D.** 1998. H_2O_2 and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Science* 3: 330 – 334.
- Varshney, C.K. & Rout, C.** 1998. Ethylenediurea (EDU) protection against O_3 injury in tomato plants at Delhi. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 188 – 193.
- 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. Standadised exposure of tobacco. VDI 3957/6. 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 3957/3. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

Vergé, X.; Chapuis, A. & Delpoux, M. 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Environmental Pollution 118: 337 – 349.

CAPÍTULO IV
DISCUSSÃO GERAL

Conforme já ressaltado nos capítulos anteriores, *Nicotiana tabacum* “Bel W3” tem sido utilizada com sucesso para biomonitoramento de ozônio na Europa e América do Norte (Krupa & Manning 1988, Heggstad 1991, VDI 2000), devido a sua alta sensibilidade ao poluente, mostrando necroses em suas folhas, inquestionavelmente associadas ao ozônio e facilmente quantificáveis ao olho nu (Horsman 1981, Peñuelas *et al.* 1999, Vergé *et al.* 2002).

Contudo, espera-se encontrar uma forte relação linear entre concentrações atmosféricas de ozônio e porcentagem de área foliar afetada por tais injúrias foliares, para se alcançar, em nível regional, uma condição ideal para biomonitoramento quantitativo. Aliás, este tem sido o maior desafio de pesquisadores que atuam nesse campo em várias partes do mundo.

Na cidade de São Paulo, Sant’Anna (2007) e Sant’Anna *et al.* (2007) relataram a fraca eficiência do tabaco Bel W3 para biomonitoramento quantitativo de ozônio, considerando a fraca relação linear obtida entre injúrias foliares e o poluente em questão. Klumpp *et al.* (2006) relataram a eficiência qualitativa de *Nicotiana tabacum* Bel W3 para biomonitoramento dos níveis de ozônio atmosférico em cidades européias, sob condições de campo. Porém esses autores comprovaram alta eficiência dessa cultivar para biomonitoramento quantitativo apenas para algumas das cidades européias monitoradas. Tonneijck & Bugter (1991) e Krupa *et al.* (1993) também concluíram que, apesar das respostas foliares de *N. tabacum* Bel W3 serem utilizadas como indicador qualitativo de poluição provocada por ozônio, se o intuito for derivar interferências quantitativas, a resposta foliar não deve ser a única variável a ser caracterizada. Medidas espaciais e temporais simultâneas de ozônio atmosférico e de outras variáveis ambientais, como temperatura do ar e precipitação devem ser realizadas, assim como medidas de crescimento das plantas.

De fato, como apontado pelos autores citados anteriormente e por outros (Koppel & Sild 1995; Finnan *et al.* 1996; Antonielli *et al.* 1997; Peñuelas *et al.* 1999; Vergé *et al.* 2002),

variações meteorológicas podem interferir na absorção do ozônio via estômato e então interferir na relação entre necroses foliares e ozônio. De acordo com Krupa *et al.* (1993), Munné-Bosch & Alegre (2002) e Davison *et al.* (2003), a resposta bioindicadora da cultivar “Bel W3” de tabaco de ozônio pode ser afetada pelo fotoperíodo, temperatura, radiação solar, umidade relativa, vento, déficit de pressão de vapor e concentração de dióxido de carbono, os quais são variáveis meteorológicas que podem diminuir a absorção de ozônio, por promover o fechamento dos estômatos.

No capítulo II, foi mostrado que variações diárias nos níveis de ácido ascórbico e na atividade de superóxido dismutase foram, juntamente com variações na temperatura do ar e na contaminação atmosférica por ozônio, determinantes da progressão dos danos foliares durante a permanência de plantas de *N. tabacum* Bel-W3 em ambiente poluído por ozônio. Observou-se também, sob condições de fumigação (capítulo III), que a redução no conteúdo de ácido ascórbico nas plantas expostas a concentrações crescentes de ozônio foi acompanhada pelo aumento da porcentagem da área foliar tomada por necroses. Portanto, as respostas antioxidativas medidas ao longo do tempo de exposição das plantas ao ozônio, quer sob condições de campo ou experimentais, especialmente variações nas concentrações de ácido ascórbico, estão entre os fatores moduladores da ocorrência e progressão das necroses foliares em função das variações nos níveis de ozônio. Sendo assim, pode-se aceitar a hipótese levantada neste trabalho (capítulo I).

Além disso, a explicabilidade dos modelos propostos entre respostas antioxidativas e injúrias foliares foi nitidamente maior para plantas expostas ao ozônio por dois dias do que para plantas fumigadas por quatro dias, indicando a existência de respostas bioquímicas dependentes do tempo de exposição das plantas de tabaco Bel W3 ao ozônio.

Diante de tais resultados, parece provável que a perda da capacidade antioxidativa nas plantas é seguida diretamente pelo aumento da área foliar afetada por necroses, principalmente nos primeiros dias de exposição ao ozônio. A partir desse ponto, distúrbios

em processos fisiológicos ou em processos de outra natureza passam a restringir de forma mais evidente a absorção de ozônio e, consequentemente, a progressão das injúrias foliares. Este fato talvez explique a baixa explicabilidade da regressão linear entre respostas foliares visíveis em plantas de tabaco nos experimentos de campo, os quais foram conduzidos durante 14 dias (capítulo II).

No experimento de fumigação, foi possível observar, ainda, que as respostas antioxidativas mais intensas aconteceram após dois dias de fumigação com 20 e 40 ppb O₃, para SOD e AA, respectivamente; porém estas não foram suficientes para conter danos celulares, visto que, nessas condições, as plantas já apresentavam necroses. Também foi possível supor que estes distúrbios podem ser piores quando plantas de tabaco forem expostas a concentrações superiores a 40 ppb de O₃. Desse modo, fica evidente que a cultivar pode ser mais apropriada para biomonitoramento em São Paulo, em situações de baixas concentrações de ozônio, quando o protocolo proposto pelo VDI (2000) é aplicado, que, aliás, são pouco frequentes em muitas regiões da cidade. Sant'Anna *et al.* (2007), inclusive, propuseram modelo de regressão linear e mais explicativo entre níveis de ozônio atmosférico e % de área foliar afetada por necroses, ao incluírem no modelo apenas resultados de exposições nas quais as concentrações de ozônio (médias para 14 dias) eram iguais ou inferiores a 40 ppb.

Os resultados levam à necessidade de maiores estudos para estabelecer um período ideal de exposição para biomonitoramento, pelo menos para a cidade de São Paulo. Alternativamente, sugere-se a busca de espécies bioindicadoras nativas ou bem adaptadas às condições ambientais da região, como fizeram Cano *et al.* (2007), ao determinarem a capacidade bioindicadora de diferentes espécies de *Sambucus*, para a Espanha.

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.
- Cano, I.; Calatayud, V.; Cerveró, J. & Sanz, M. J.** 2007. Ozone effects on three *Sambucus* species. *Environmental Monitoring and Assessment* 128 (1-3): 83-91.
- Davison, A. W.; Neufeld, H.S.; Chappelka, A.H.; Wollf, K. & Finkelstein, P.L.** 2003. Interpreting spatial variation in ozone symptoms shown by cutleaf cone flower, *Rudbeckia laciniata* L. *Environmental Pollution* 125 (1): 61-70.
- Finnan, J.M.; Jones, M.B. & Burke, J.J.** 1996. A time-concentration study on the effects of ozone on spring wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Effects on yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 57: 158 – 167.
- Heggestad, H.E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C e 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 Melbourne using tobacco as an indicator plant. *Environmental Pollution Ser.B*, 69-77.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G.; Vergne, P.; Sifakis, N.; Sanz, M.J.; Rasmussen, S.; Ribas, H.; Peñuelas, J.; Kambezidis, H.; He, S.; Garrec, J.P. & Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* 40 (38): 7437 – 7448.
- Koppel, A. & Sild, E.** 1995. Bioindication of ozone in Estonia by using the tobacco variety Bel W3. *Air and soil pollution* 85: 1515 – 1519.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1998. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.

- Munné-Bosch, S. & Alegre, L.** 2002. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta*. 214: 608-615.
- Peñuelas, J.; Ribas, A.; Gimeno, B.S. & Filella, I.** 1999. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (NE. Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* 56 (2): 221 – 224.
- Sant’Anna, S.M.R.** 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* Bel W3 para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo. Tese de doutorado - São Paulo.
- Sant’Anna, S.M.R.; Esposito, M.P.; Domingos, M. & Souza, S.R.** 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* “Bel W3” for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* 151: 389 - 394.
- Tonneijck, A.E.G. & Bugter, R.J.F.** 1991. Biological monitoring of ozone effects on indicator plants in the Netherlands: Initial research on exposure-response functions. *VDI Berichte* 901: 613 – 624.
- 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, Berlin.
- Vergé, X.; Chapuis, A. & Delpoux, M.** 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental Pollution* 118: 337 – 349.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES FINAIS

A partir deste estudo, pode-se concluir que:

- A progressão das injúrias foliares visíveis, em plantas de *Nicotiana tabacum* “Bel W3” expostas em ambiente poluído por ozônio, foi mais intensa na medida em que os níveis de antioxidantes (AA e SOD) eram menores no momento da estimativa de área foliar ocupada pelas mesmas e com as concentrações de ozônio e temperatura do ar quatro dias antes dessa estimativa eram mais altas;
- A redução do conteúdo de ácido ascórbico nas plantas de *N. tabacum* Bel W3 expostas a concentrações crescentes de ozônio foi acompanhada do aumento da área foliar afetada por injúrias foliares. As respostas antioxidativas dependeram do tempo de exposição e do nível de ozônio ao qual as plantas foram expostas, sendo mais intensas após os primeiros dois dias de fumigação com 20 e 40 ppb O₃ (3 horas por dia) para SOD e AA, respectivamente.
- Na cidade de São Paulo, o uso desta cultivar parece ser melhor estabelecido em concentrações de até 40 ppb de ozônio troposférico e por um período de exposição ideal que ainda precisa ser determinado. Acima dessa concentração, seu uso pode se tornar inviável, o que limitaria a capacidade bioindicadora da planta na nossa cidade.

ANEXOS

ARTIGOS ACEITOS/ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO

Relations between leaf antioxidants and necroses in plants of *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ under the environmental conditions of São Paulo, SE – Brazil
(Submetido à Plant, Cell and Environment)

Marisia P. Esposito, Mauricio L. Ferreira, Silvia M.R. Sant’Anna, Marisa Domingos, Silvia R. Souza¹
Instituto de Botânica, Seção de Ecologia, Caixa Postal 3005, 01061-970 São Paulo, SP,
Brazil

Antioxidants and necroses in N. tabacum “Bel-W3” growing in São Paulo, Brazil.

Abstract

Previous studies reported that the extent of leaf necroses in *Nicotiana tabacum* “Bel W3” exposed in the city of São Paulo is influenced by weather variations. Antioxidant responses to environmental modifications are possibly involved on this. So, this study aimed at to evaluate if the progression of leaf necroses during plant exposure under climatic conditions and pollution of São Paulo is modulated by daily antioxidant responses and to determine which environmental factors mostly explain the relations between these biological responses. Four plant exposures of 14 days each were performed. During each experiment, three plants were daily taken to determine the accumulated percentage of leaf area affected by necroses and antioxidant responses (concentrations of ascorbic acid-AA and activities of superoxide dismutase-SOD and peroxidases-POD). Ozone concentrations and weather conditions were daily monitored. Multivariate analysis established the relations among these variables. 63% of the increasing percentage of leaf necroses in the whole period were explained by decreasing levels of AA and SOD and by higher values of ozone concentrations and of air temperature four days before the biological measurements. The use of *N. tabacum* Bel-W3 as bioindicator can be restricted by leaf antioxidant responses to both atmospheric contamination and weather conditions.

Key words: *Nicotiana tabacum* “Bel-W3”; antioxidants; leaf necroses; ozone; weather.

Introduction

¹ Correspondance: S. R. Souza. phone: ++ 55 11 5073 6300; fax: ++ 55 11 5073 3678; e-mail: souzasrd@terra.com.br

The atmosphere of the Metropolitan Region of São Paulo (MRSP) is strongly affected by the urban phenomenon denominated photochemical smog, which is formed in the troposphere by means of reactions between hydrocarbons and nitrogen oxides in the presence of sunlight, producing ozone (O₃) and other oxidant species (Souza et al. 1998). Nowadays, the levels of O₃ at that region have been high enough to exceed several times the standard limits of air quality of 80 ppb in one hour. Therefore, it is a potential agent to cause serious environmental problems in the region (Molina & Molina 2004).

Ozone, as a strong oxidant, is generally noxious to the plants (Iriti & Faoro 2008). The oxidative effects on ultrastructure and on physiological and metabolic processes in plant cells are due to the production of reactive oxygen species (ROS) as soon as ozone enters through stomata (Puckette, Weng & Mahalingam et al. 2007). Weather oscillations are also factors of oxidative stress to plants. However, the extent of damage in plants will depend on the efficiency of antioxidants, such as superoxide dismutase (SOD) and peroxidases (POD) and ascorbic acid (AA), in maintaining the oxidant/antioxidant balance (Jones 2006). This increases plant tolerance against the stressing conditions of the polluted environment (Halliwell & Gutteridge 2007). Alterations on antioxidants are then considered early responses of plants growing in that environment, since they may occur before physiological or metabolic disturbances or even before the appearing of visible injury in sensitive plants (Faoro & Iriti 2005).

Theoretically, the pro-oxidant/antioxidant balance is rapidly broken in ozone-sensitive plants, culminating with extensive cell disturbances and death and the appearance of typical visible injuries on leaves, such as chloroses and necroses). They have been used as simple but efficient indicator reactions for biomonitoring purposes. The sensitive cultivar 'Bel-W3' of *Nicotiana tabacum* has been frequently used for biomonitoring ambient ozone in European urban centers (Vergé, Chapuis & Delpoux 2002, Klumpp et al. 2006).

However, a recent study performed in the city of São Paulo, SE Brazil, showed that the percentage of leaf area of *N. tabacum* 'Bel-W3' affected by necroses was not strictly related to the ozone concentrations in the atmosphere (Sant'Anna et al. 2008). Besides, a delay of three to six days in the appearance the first typical visible symptom was observed, independently from the level of atmospheric contamination by ozone. So the following hypothesis was raised: antioxidant responses to short-time variations on ozone concentrations and/or on weather conditions may influence the occurrence and progression of leaf necroses during the plant exposure under the environmental conditions of São Paulo. These hypothesis is acceptable since this cultivar may be not well acclimated to the subtropical climate, which characterizes the SE region of Brazil. The present study aimed at to evaluate if the

progression of leaf necroses during plant exposure under climatic conditions and pollution of São Paulo is modulated by daily antioxidant responses and to determine which environmental factors mostly explain the relations between these biological responses.

Materials and Methods

Exposure site and sampling procedures

The plant exposure site is located inside a State Park, next to a fragment of forest, at the South region of the city of São Paulo (23°38'28.8''S; 46°37'15.8''W; 805 m above sea level). It is approximately 3 Km far from a major highway with frequently heavy vehicular traffic. The air in the region is mainly contaminated by ozone. Its precursors come predominantly from biogenic and vehicular emissions (Souza & Carvalho 2001, Montero et al. 2002). São Paulo is the largest city in area and in population of the Metropolitan Region of São Paulo (MRSP), which congregates 39 municipalities, occupies 8051 Km² of area and is the largest industrialized and urbanized region in Latin America (Molina & Molina 2004). The MRSP has a complex topography surrounded by mountains ranging from 650 to 1200 m high, ideal conditions for often trapping dust and gaseous pollutants in inversion layers, increasing their concentrations in the air.

The climate of MRSP is subtropical with drier season during winter. Monthly average temperatures in the summer and winter times reach 23°C (from December to February) and 16°C (from June to August) respectively. The rainiest season normally begins in September and ends in March, with an annual average precipitation of 1200 mm. The local circulation is given by winds from southeast and northeast, mainly associated with the Atlantic Ocean breeze circulation (Andrade et al. 2004).

Twenty eight plants of tobacco Bel-W3 were exposed to environmental conditions of the mentioned site in four distinct periods: 31 August to 9 September 2004, 14 to 27 October 2004, 21 November to 4 December 2004 and 7 to 19 March 2005 (referred as exposure periods 1 to 4 from now on). The plant cultivation and field exposure system were those recommended by VDI (2003).

During 14 days of each exposure period, the accumulated percentages of leaf area affected by typical necroses were daily determined on the 4th to 6th oldest leaves of all remaining plants. The concentrations of ascorbic acid (AA) and the activity of POD and SOD, taken as antioxidant indicators, were also daily determined in the same leaves of three of these plants sampled randomly.

Leaf injury assessment and analytical procedures

The percentage of leaf area affected by typical necroses was visually estimated in classes of 5% of affected leaf area, according to VDI (2003). The results were presented as average percentage of necroses estimated on the 4th to 6th oldest leaves.

The antioxidant indicators were determined in fresh green portions of the leaves. Both collection of leaves and preparation of extracts always obeyed the same sequence of time in order to avoid variations caused by diurnal.

Ascorbic acid was determined in 0.5 g of leaves, homogenized with 12 mL of EDTA-Na₂ (0.07%) and oxalic acid (0.5%). The mixture was centrifuged at 40000 g for 30 minutes at 2 °C. An aliquot of the supernatant was added to 2.5 mL of DCPiP (0.02%) and absorbance was measured spectrophotometrically at 520 nm (first lecture). After the addition of 0.05 mL of ascorbic acid (1%), a second absorbance measurement was performed. Both absorbance measurements were used to estimate the ascorbic acid content according to Keller & Schwager (1977). Superoxide dismutase activity was determined in 0.35 g fresh leaves, homogenized with 12 mL of potassium phosphate buffer (50 mM pH 7.5) with EDTA-Na₂ 1 mM, NaCl 50 mM and ascorbic acid 1 mM, in the presence of a pinch of PVPP 2% and centrifuged at 22000 g for 25 minutes at 2°C. The activity of SOD was assayed by measuring the SOD inhibition of the NBT photochemical reduction (Osswald et al. 1992). Each reaction mixture contained 0.5 mL of EDTA-Na₂ 0.54 mM, 0.8 mL of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), 0.5 mL of methionine 0.13 mM, 0.5 mL of NBT 0.44 mM, 0.2 mL of riboflavin 1 mM and 0.2 mL of leaf extract. The samples were incubated for 20 minutes under a fluorescent lamp (80 W). The absorbance of the reaction mixture was determined at 560 nm. A similar mixture lacking the leaf extract was used as control, and a dark control mixture served as blank. The enzymatic activity was expressed, as the amount of extractable needed to inhibit the reduction of NBT by 50%. Peroxidase activity was determined in 0.3 g of leaves, homogenized with 12 mL potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) in the presence of a pinch of PVPP 2%. The homogenate was centrifuged at 40000 g for 30 minutes at 2°C. The peroxidases were determined in a reaction mixture of plant extracts, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 5.5) and fenyldiamine (1%), to which was added an aliquot of H₂O₂ (0.3%). Unspecific POD activity was measured spectrophotometrically following the increase in absorbance (ΔE) at 485 nm due to the formation of an H₂O₂-POD complex at two different times in the linear reaction curve (Klumpp, Guderian & Kupers 1989).

The ozone levels during all four exposure period were continuously monitored by EcotechTM 9680 O₃ Analyzer. Continuous data on irradiation, air temperature and relative humidity were provided by a meteorological station of the Institute of Astronomy, Geophysics and Atmospheric Sciences from University of São Paulo, located in the State Park.

Statistical analysis

One Way Analyses of Variance and pair-wise comparison test of Student-Newman-Keuls identified significant differences among the exposure experiments. . A multiple linear regression analysis was performed in order to verify if the leaf necroses might be predicted by daily oscillations on environmental factors variables (O₃, air temperature, relative humidity, irradiation) and/or on antioxidant indicators during the 14 days of exposure (data of all four exposure periods included). The data were analyzed by means of the stepwise backward method, which means that the analysis started with all independent variables and, after successive new adjustments, only those that significantly contributed to explain the variations in leaf necroses remained in the model. When necessary, data were transformed to reach normality and equal variances. Sigma Stat 3.5 Software was used for all tests.

Results

The highest values of ozone were observed in the 1st and 3rd exposure periods, when significantly lower relative humidity was registered. Maximum levels of ozone (above 80 ppb) were measured in spring, especially in September during the 1st exposure. Average temperature was significantly lower during the last period of plant exposure than that measured in the other periods. Average irradiation did not significantly differ among periods (Fig. 1, Table 1).

The leaf necroses appeared between the 3rd and 6th day of exposure (Fig. 1). They occurred in almost all 4th to 6th oldest leaves evaluated (data not shown). The leaf area affected by necroses did not differ significantly among the exposure periods (Table 1), but the accumulated % of necroses at the end of the 4th exposure was the highest (60% in average). The average levels of AA were significantly higher during the 1st and 3rd exposure periods than during the 2nd and 4th periods Average SOD activity did not differ among the

exposure periods. In contrast, POD activity decreased significantly in plants from the 3rd experiment (Table 2).

The AA concentrations in tobacco Bel W3 tended to decrease with time of exposure in all experiments. Daily SOD and POD activities oscillated during plant exposure. Evident high activity of SOD was observed in plants sampled at the beginning of 1st and 2nd and at the end of 4th exposures and of POD at the middle of the 2nd exposure (Fig. 2).

The multivariate analysis established indicated that 63% of the increasing percentage of leaf necroses in the whole period were explained by decreasing levels of AA and SOD and by higher values of ozone concentrations and of air temperature four days before the biological measurements (Table 3). This was the most explicative linear model, among those proposed for other matrices of data, in which the measurements of biological parameters were related to environmental conditions one to seven days before.

Discussion

The ascorbic acid (AA) seemed to be the most involved in the antioxidant capacity of plants, in which could be consider as key indicator of environmental stress. Among several functions, such as action as co-factor for many enzymes and regulation of senescence and of pathogen attack, this antioxidant contributes to increases plant resistance against oxidative stress by detoxifying hydrogen peroxide (Pastori et al. 2003, Conklin & Barth 2004, Barth et al. 2004, Pavet et al. 2005, Barth, De Tullio & Conklin 2006).

Additionally, it has been suggested that ascorbic acid in the cell wall provides a first step of defense against ozone (Baier et al. 2005). In tolerant plants ozone generally promotes increases in AA concentrations and in the activity of enzymes of ascorbate-glutathione (Castillo & Greppin, 1988). On the other hand, the low concentration of AA in leaves of deficient mutants in such substance was associated to restrictions of growth and enhancement of ozone sensitivity (Conklin et al. 2000, Veljovic-Jovanovic et al. 2001). In our study, ascorbic acid seemed to have been one limiting factor for the appearance of visible damage only during the first days of exposure, as also observed by Bulbovas et al. (2007) in plants of a sensitive Brazilian cultivar of soybean. However, the decrease in its concentrations with exposure time appeared to be a measurement of the increasing sensitivity of tobacco plants in the monitored environment, since this effect was straightly followed by the progression of injury.

Multivariate analysis showed that ozone levels modulate these biological responses during plant exposure. Sant'Anna et al. (2008) also observed in fumigation experiments that the association between realistic concentrations of ozone and leaf contents of AA and

necroses in plants of *N. tabacum* Bel W3 was time-dependent. Significant reductions in AA were followed by evident increases in the leaf area affected by necroses in plants exposed to over 40 ppb of ozone for four days.

Numerous studies have observed that during the adaptation to oxidative stress the levels of SOD, POD and others enzymatic antioxidants can oscillate in plants growing in a stressing environment, an effect that was observed in plants of *N. tabacum* Bel W3 during the field experiments. This effect may depend on the plant species, stage of development and intrinsic metabolic rhythms (Kuk et al. 2003). Increases in SOD have been generally observed in response to ozone, as demonstrated by Scebba et al. (2003) for example. However, the reduction in the activity of SOD while the concentrations of ozone as well as the leaf visible disturbances increased may be another indication that the antioxidant system in the plants of the present study disarranged with time. Similar result was obtained by Calatayud & Barreno (2001) in *Lycopersicon esculentum* cv. Tiny Tim treated with ozone.

As supposed, ozone was not the only environmental factor to cause oscillations on the antioxidant responses and on the progression of leaf necroses during the experimental periods. Air temperature also interfered on these relations. For instance, the maximum average % of leaf area affected by necroses was observed during a period (4th exposure) in which the temperature was the highest of the whole experimental period (23.3°C in average), but leaf contents of AA and the concentrations of ozone were lower, compared to the values registered during the 1st exposure. We should consider that the ozone flux through the stomata into the leaf may be modified by various environmental factors such as temperature (Karlsson et al. 2004, Filella, Peñuelas & Ribas 2005, Hassan 2006). So, we may suppose that the environmental conditions during the last field experiment should have been more appropriate to the uptake of ozone than during the other periods, resulting in stronger potential stress, decreased levels of AA and consequently more intense leaf necroses. Some authors, like Payton et al. (2001) and Ding et al. (2007), also found that plants increase sensitivity to oxidants when exposed to chilling temperatures.

Finally, a weak linear relation was observed between % of injury and atmospheric ozone concentration as observed by several authors (e.g., Ribas & Penuelas 2003, Yuska et al. 2003, Klumpp et al. 2006 and Calatayud et al. 2007), reinforcing the conclusion of Sant'Anna et al. (2008) that the employment of % of leaf area affected by necroses as indicator of ozone under atmospheric conditions of São Paulo must be carefully evaluated.

References

- Andrade, M.F., Ynoue, R.Y., Harley, R. & Miguel, A.H. (2004) Air quality model simulating photochemical formation of pollutants: the São Paulo Metropolitan Area, Brazil. *International Journal of Environment and Pollution* **22**, (4): 460 – 475.
- Baier, M., Kandlbinder, A., Gollack, D. & Dietz, K-J. (2005) Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant, Cell & Environment* **28**, (8): 1012 – 1020.
- Barth, C., Moeder, W., Klessig, D.F. & Conklin, P.L. (2004) The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient Arabidopsis Mutant vitamin c-11. *Plant Physiology* **134**, 1784 – 1792.
- Barth, C., De Tullio, M. & Conklin, L. (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* **8**, (57) 1657 – 1665.
- Bulbovas, P., Souza, S.R., Moraes, R.M. & Artaxo, P.N. (2007) Plântulas de soja “Tracajá” expostas ao ozônio sob condições controladas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**, 641 – 648.
- Calatayud, A. & Barreno, E. (2001) Chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. *Environmental Pollution* **115**, (2): 283 – 289.
- Calatayud, A., Sanz, M.J., Calvo, E., Cerveró, J., Ansel, W. & Klumpp, A. (2007) Ozone biomonitoring with Bel-W3 tobacco plants in the city of Valencia (Spain). *Water Air Soil Pollution* **183**, 283-291.
- Castilho, F. J. & Greppin, H. (1988) Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany* **28**, 231-238.
- Conklin, P.L., Saracco, S.A., Norris, S.R. & Last, R.L. (2000) Identification of ascorbic acid deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* **154**, 847 – 856.

Conklin, P.L. & Barth, C. (2004) Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens and the onset of ozone. *Plant, Cell and Environment* **27**, 959 – 970.

Ding, Z.S., Tian, S.P., Zheng, X.L., Zhou, Z.W. & Xu, Y. (2007) Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Physiologia Plantarum* **130**, 112-121.

Faoro, F. & Iriti, M. (2005) Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biologia Plantarum* **49**, (4): 585 – 592.

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.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2007) Free Radicals in biology and medicine. *Oxford University Press* **4**, 1 – 851.

Hassan, I.A. (2006) Effects of water stress and high temperature on gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Triticum aestivum* L. *Photosynthetica* **44**, (2) 312 – 315.

Iriti, M. & Faoro, F. (2008) Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water Air Soil Pollution* **187**, 285 – 301.

Jones, D. P. (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**, 1865 – 1879.

Karlsson, G.P., Karlsson, P.E., Soja, G., Vandermeiren, K. & Pleijel, H. (2004) Test of the short-term critical levels for acute ozone injury on plants – improvements by ozone uptake modelling and the use of an effect threshold. *Atmospheric Environment* **38**, 2237 – 2245.

Keller, T.A. & Schwager, H. (1977) Air pollution and ascorbic acid. *European Journal of Forest Pathology* **7**, 338-350.

Klumpp, G., Guderian, R. & Kupers, K. (1989) Peroxidase-und superoxiddismutase-aktivitat sowie Prolingehalte von fichtenna-deln nach belastung mit O₃, SO₂ und NO₂. *European Journal Forest Pathology* **19**, 84-97.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ribas, H., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P. & Calatayud, V. (2006) Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* **40**, (38): 7437 – 7448.

Kuk, Y. I, Shin, J. S., Burgos, N. R., Hwang, T. E., Han, O., Cho, B.H., Jung, S.Y. & Guh, J. O. (2003) Antioxidative enzyme offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science* **43**, (96): 2109-2117.

Molina, M.J. & Molina, L.T. (2004) Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association* **54**, 644 – 680.

Monteiro, L., Vasconcellos, P.C., Souza, S.R., Pires, M.A.F., Sanchez-Ccoyllo, O.R., Andrade, M.F. & Carvalho, L.R.F. (2002) Measurements of atmospheric carboxylic acids and carbonyl compounds in São Paulo City, Brazil. *Environmental Science Technology* **35**, 3071-3081.

Osswald, W.F., Kraus, R., Hipelli, S., Bens, 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 damage spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Physiology* **139**, 742-748.

Pastori, G.M., Kiddle, G., Antoniow, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P.J., Noctor, G. & Foyer, C.H. (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defence transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell* **15**, 939 – 951.

Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniow, J., Alvarez, M.E. & Foyer, C.H. (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**, 1291-1303.

Payton P., Webb R., Kornyejev D., Allen R. & Holaday A.S. (2001) Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2345-2354.

Puckette, M.C., Weng, H. & Mahalingam, R. (2007) Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 70 – 79.

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

Sant'Anna, S.M.R., Esposito, M.P., Domingos, M. & Souza, S.R. (2008) Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* **151**, 389-394.

Scebba, F., Soldatini, G. & Ranieri, A. (2003) Ozone differentially affects physiological and biochemical responses of two clover species, *Trifolium repens* and *Trifolium pretense*. *Environmental Pollution* **123**, 209 – 216.

Souza, S.R., Korn, M., Tavares, M.F., Carvalho, L.R.F. & Korn, M.G.A. (1998) Multi parametric evaluation of the chemical ultrasonic irradiation effects in a heterogeneous metal-water system. *Ultrasonics* **36**, 595-602.

Souza, S. R. & Carvalho, L. R. F. (2001) Seasonality Influence in the distribution of formic and acid in the urban atmosphere of São Paulo City, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **12**, 755-762.

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 3957/3. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

Veljovic-Jovanic, S.D., Pignocchi, C., Noctor, G. & Foyer, C.H. (2001) Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology* **127**, 426 – 435.

Vergé, X., Chapuis, A. & Delpoux, M. (2002) Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental Pollution* **118**, 337 – 349.

Yuska, D.E., Skelly, J.M., Ferdinand, J.A., Stevenson, R.E., Savage, J.E., Mulik, J.D. & Hines, A. (2003) Use of bioindicators and passive sampling devices to evaluate ambient ozone concentrations in north central Pennsylvania. *Environmental Pollution* **125**, 71 – 80.

Figures and tables

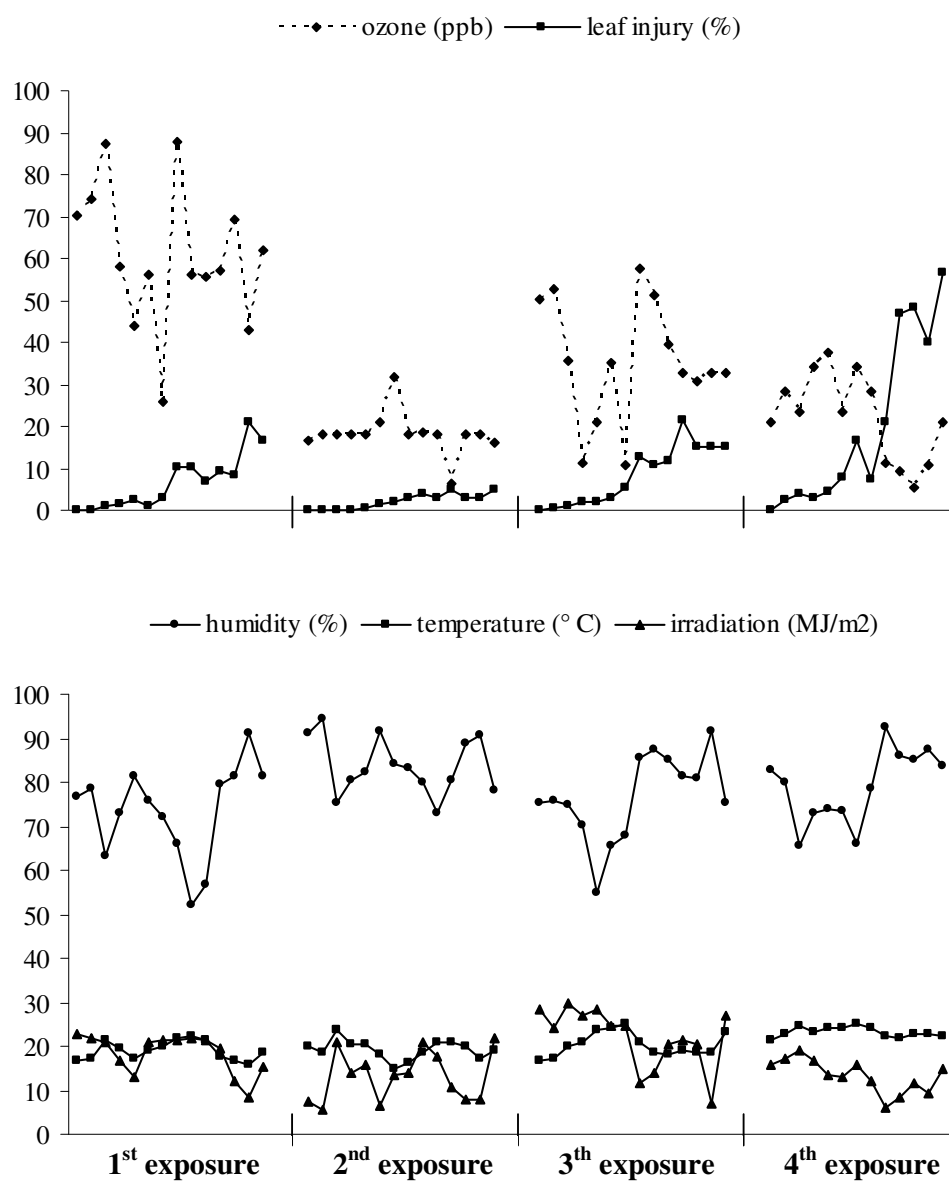


Figure 1. Daily average values of leaf injury, ozone concentration, relative humidity, temperature and irradiation during the four exposure experiments with *N. tabacum* Bel W3.

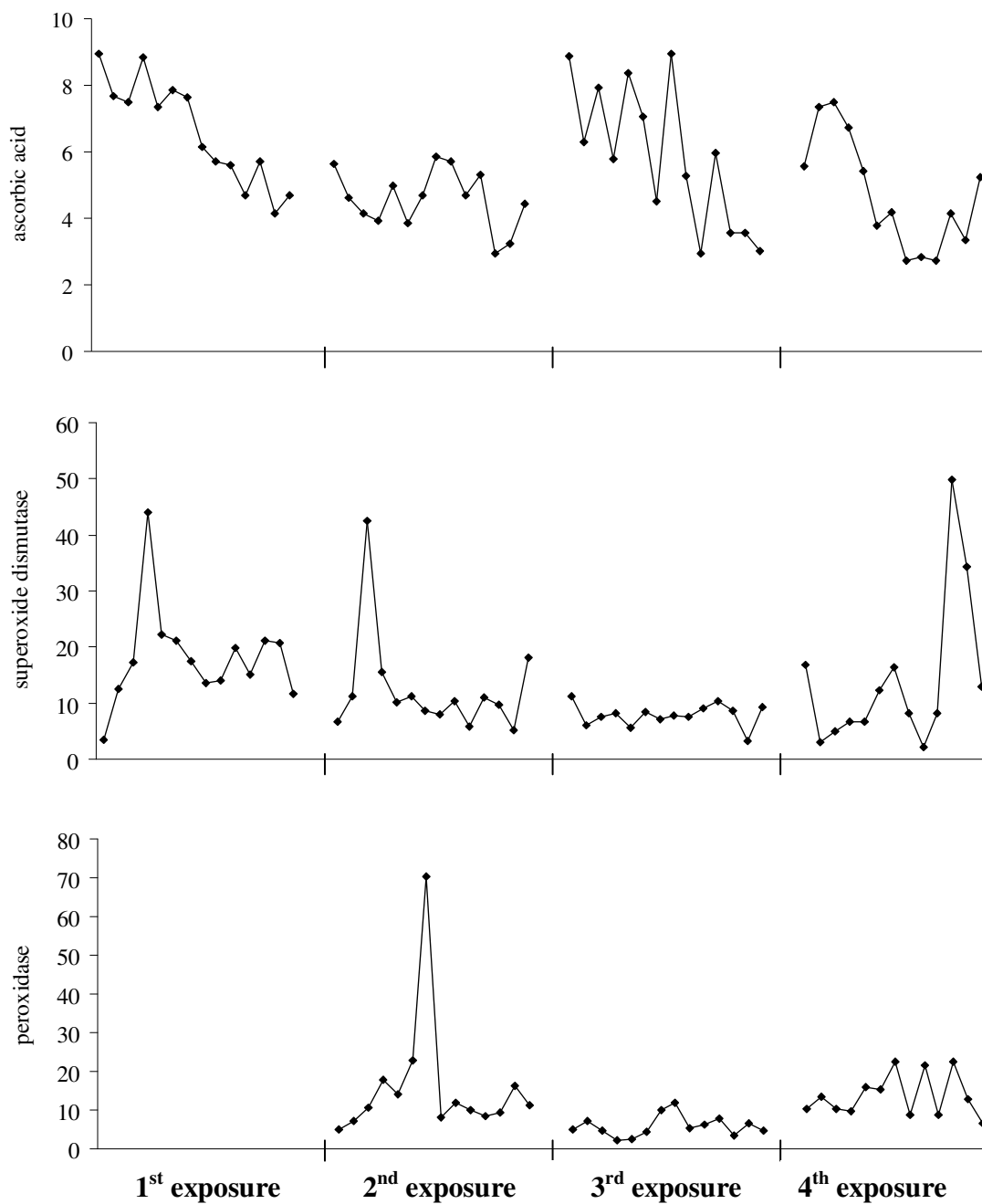


Figure 2. Daily profile of ascorbic acid [mg g^{-1} (DM)], superoxide dismutase [10^2 Uni g^{-1} (DM)] and peroxidase [10^2 $\Delta\text{E min}^{-1}$ (DM)] in leaves of *N. tabacum* Bel W3 during the four exposure experiments.

Table 1. Average values $\pm$ standard deviations of environmental factors and of biological parameters measured in plants of *N. tabacum* Bel W3, during the four periods of plant exposure. Different letters show significant differences among exposure experiments for each parameter analyzed ($p < 0.05$).

Variables	1 st exposure	2 nd exposure	3 rd exposure	4 th exposure
<i>Environmental factors</i>				
Ozone (ppb)	60.5 $\pm$ 12.5 a	21.1 $\pm$ 2.3 b	35.0 $\pm$ 11.7 a	21.2 $\pm$ 9.3 b
Relative humidity (%)	73.6 $\pm$ 25.1 b	83.9 $\pm$ 15.8 a	76.6 $\pm$ 19.5 b	79.1 $\pm$ 19.9 a
Temperature (°C)	19.0 $\pm$ 6.3 b	19.2 $\pm$ 5.6 b	20.4 $\pm$ 5.4 b	23.3 $\pm$ 4.7 a
Irradiation (MJ/m ²)	18.4 $\pm$ 4.5 a	13.1 $\pm$ 5.6 a	22.1 $\pm$ 6.9 a	13.2 $\pm$ 3.7 a
<i>Biological parameters</i>				
Leaf necroses (%)	6.0 $\pm$ 10.0 a	2.0 $\pm$ 3.0 a	7.0 $\pm$ 10.0 a	18.8 $\pm$ 23.0 a
AA (mg g ⁻¹ DM)	6.6 $\pm$ 2.1 a	4.6 $\pm$ 1.8 b	5.9 $\pm$ 2.9 a	4.9 $\pm$ 2.3 b
SOD (10 ² U g ⁻¹ DM)	18.2 $\pm$ 10.5 a	12.5 $\pm$ 18.8 a	7.8 $\pm$ 3.6 a	14.4 $\pm$ 20.8 a
POD (10 ² Δ E min ⁻¹ DM)	/	15.9 $\pm$ 17.1 a	5.8 $\pm$ 4.2 b	14.1 $\pm$ 8.0 a

/ - Data not available.

Distinct letters indicate significant differences among exposure periods for each variable ($p < 0.05$).

Table 2. Predictive variables of leaf necroses ($\log_{10}$ transformed) in plants of *N. tabacum* Bel W3 during 14 days of exposure to the environmental conditions of the study site, in the city of São Paulo.

Variables	Coefficient	P
Ozone *	0.016	0.011
Temperature *	0.132	< 0.001
Ascorbic acid **	0.148	0.006
Superoxide dismutase **	0.0002	0.009
Constant = -1,245; $R^2 = 0.63$ ($p < 0.001$)		

* Four days before necrosis evaluation.

** In the same day of necrosis evaluation.

Suitability of *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ for biomonitoring ozone in

São Paulo, Brazil

Environmental Pollution 151 (2008) 389-394

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. Materials 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 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 bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental 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.

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 ^e	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

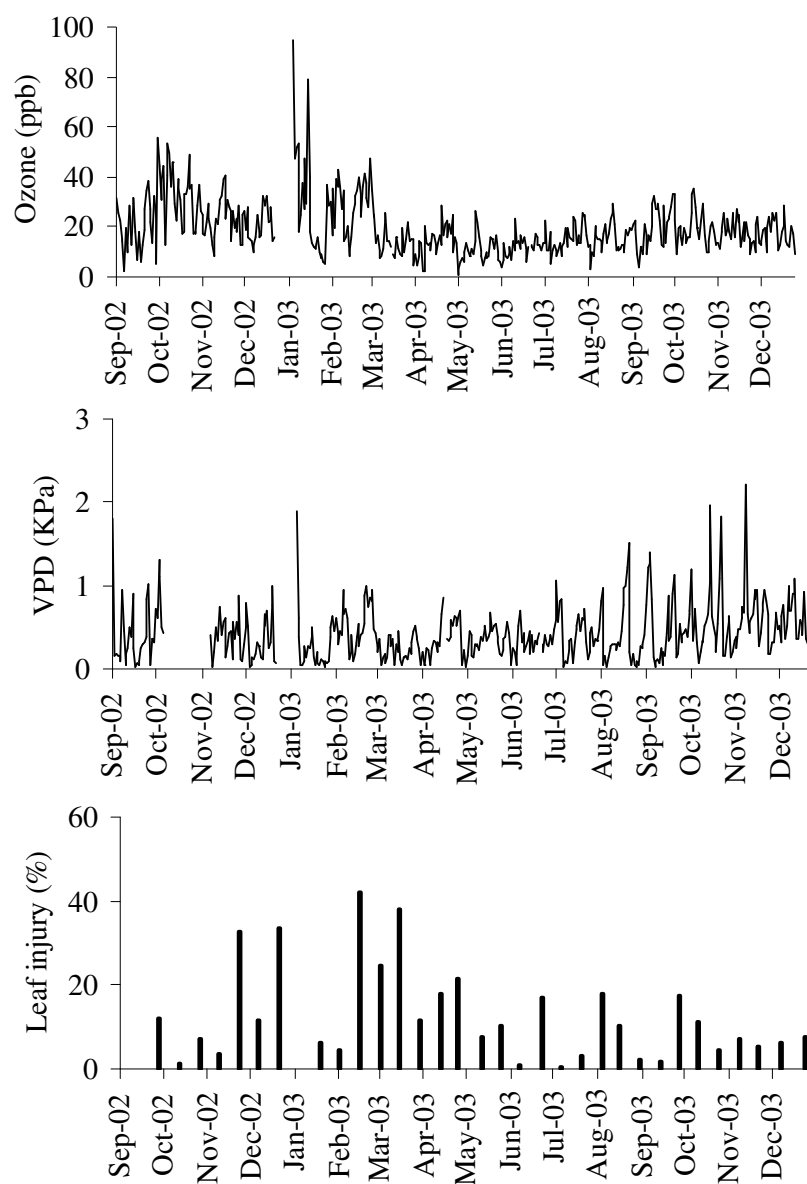


Fig.1: Mean values of daily ozone concentrations, daily vapor pressure deficit (VPD) and percentage of leaf injury in plants of *N. tabacum* 'Bel W3' successively exposed for fourteen days during the field study. Mean values were calculated based on the results obtained at all four exposure sites.

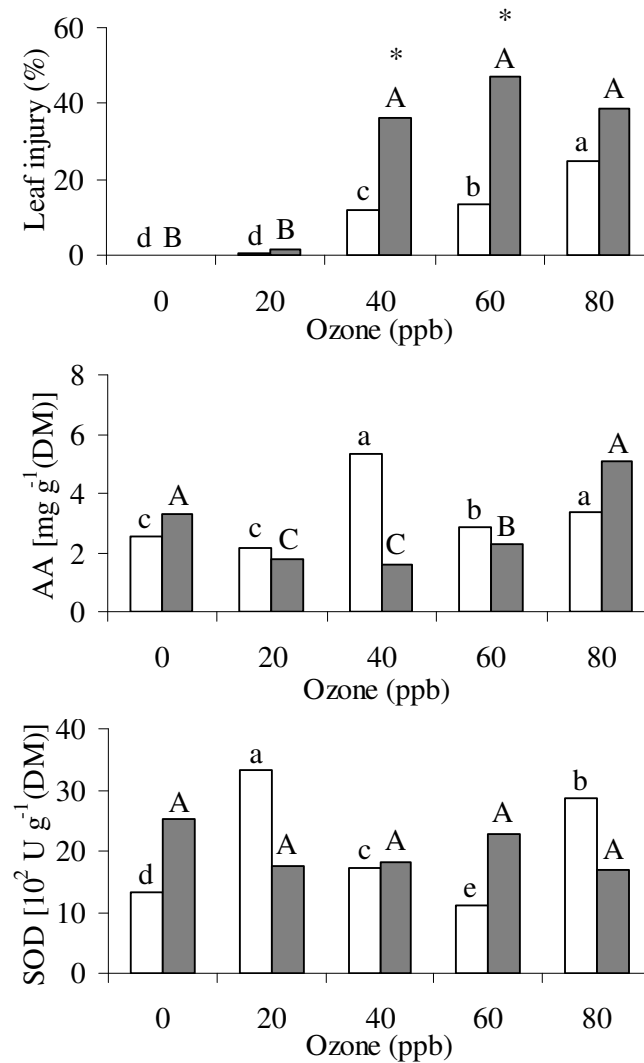


Fig.2: Mean values of percentage of leaf injury, the amount of total ascorbic acid (AA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in plants of *N. tabacum* 'Bel W3' fumigated with different ozone concentrations for two (□) and four (■) days. Lowercase and capital letters indicate significant differences 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 ($n = 9$).

