



CAPACIDADE DE OXI - REDUÇÃO DE PLANTAS DE *NICOTIANA TABACUM* 'BEL W3' EXPOSTAS EM REGIÃO CONTAMINADA POR OZÔNIO.

A.P.S. Dias

D.T. Silva; M.D. Martinelli; R.K. Nakazato; M.C.S. Rinaldi;
R.M. Moraes; M. Domingos.

Instituto de Botânica, Seção de Ecologia, Av. Miguel Stéfano, 3687, 04301 - 902, São Paulo, Brasil. Tel. 55 11 505073 - 6300 (ramal 297)-321ana@gmail.com

INTRODUÇÃO

Na atualidade, o principal poluente com ação fitotóxica é, sem dúvida, o ozônio (O₃), existindo diversos relatos de intenso declínio de florestas e perdas agrícolas em países da América do Norte e da Europa causados por esse poluente (Emberson *et al.*, 2003). A toxicidade do O₃ aos organismos vivos em geral deve - se a seu alto poder oxidativo, gerando um quadro de estresse devido à formação excessiva de espécies ativas de oxigênio (EAO), a partir do momento em que o poluente reagir com água. No caso das plantas, esta reação já acontece no apoplasto, logo após a absorção do ozônio via estômatos. Porém cabe lembrar que a formação destas EAOs é um fenômeno natural, resultante do metabolismo do oxigênio, durante os processos de fotossíntese e respiração. A ocorrência de vida no ambiente aéreo, só foi possível devido à evolução de um sistema de defesas antioxidativas, que envolve reações de oxi - redução, formado por diversos compostos, entre os quais a glutathione e as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR). Estes, em conjunto, participam de um ciclo muito estudado denominado Ascorbato - Glutathione que resulta na neutralização de substâncias oxidativas e impedem danos celulares. (Bray *et al.*, 2000, Burkey *et al.*, 2006, Muggli 1993).

Plantas que possuem conteúdos altos e/ou alta capacidade de oxi - redução são mais tolerantes à poluição aérea. Em espécies vegetais sensíveis ao ozônio por outro lado, os efeitos oxidativos em nível celular rapidamente se propagam nos tecidos vegetais gerando sintomas foliares visíveis típicos. Estes são reações indicadoras efetivas do potencial de toxicidade do poluente no ar e, por isso, são muito utilizados em programas de biomonitoramento de qualidade do ar. *Nicotiana tabacum* 'Bel W3', planta bioindicadora sensível padronizada, vem sendo empregada para a qualificação dos níveis tóxicos de ozônio há várias décadas na Europa (Arndt & Schweiser 1991, Krupa & Manning 1988, VDI 1999, 2003).

Contudo, as respostas antioxidativas também podem atuar

na intensidade de danos às plantas, quando considerada a sua capacidade de oxi - redução e a eficiência do sistema celular antioxidativo em manter o equilíbrio oxidante - antioxidante. Assim estudos que visam avaliar o estado redox de plantas expostas ao poluente ozônio podem auxiliar na confecção de programas padronizados de biomonitoramento com plantas indicadoras sensíveis, em caráter regional (Klumpp *et al.*, 2006).

OBJETIVOS

Verificar se há variações na capacidade de oxi - redução em plantas de *N. tabacum* 'Bel - W3', expostas em ambiente contaminado por ozônio e verificar se estas variações interferem no surgimento e na intensidade de necroses foliares nas plantas expostas no ambiente contaminado e, assim, na eficiência da cultivar para biomonitoramento de ozônio em áreas urbanas brasileiras.

MATERIAL E MÉTODOS

1-Cultivo e Exposição das Plantas

As plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' foram cultivadas a partir de sementes, em vasos plásticos contendo substrato comercial Plantimax (Eucatex) e vermiculita fina, misturados na proporção de 3:1, respectivamente. Durante o cultivo, as plantas permaneciam em casa de vegetação sob ar filtrado e sob condições climáticas favoráveis ao seu crescimento e recebiam, semanalmente, 100 ml da solução nutritiva recomendada por Epstein (1975).

A exposição das plantas foi realizada no Instituto de Botânica durante o ano de 2008. Situado na zona sul da cidade de São Paulo, o local é intensamente afetado pelo smog fotoquímico (Klumpp *et al.*, 1994, Domingos *et al.*, 2002; Sant'Anna 2008). As plantas foram mantidas, sob sombreamento de 50%, em suportes construídos segundo o modelo proposto por Arndt & Schweizer (1991) e por

VDI (2003). Em cada estação do ano, foram realizadas exposições consecutivas de plantas, com duração de 14 dias cada. A exposição foi sempre iniciada com 18 plantas previamente numeradas e, ao longo de cada exposição, em três dias sorteados, eram retiradas seis plantas igualmente sorteadas. Para cada dia de amostragem, nas folhas 6 e 7 das plantas sorteadas (considerando a folha número 1 como a mais velha), foram realizadas as análises descritas a seguir.

2 - Variáveis Estudadas

Injúrias foliares visíveis

A porcentagem de área foliar afetada por injúrias visíveis foi estimada visualmente, seguindo as recomendações de VDI (2003) e conforme adotado em vários estudos similares realizados nos continentes europeu e americano (Heggstad 1991, Klumpp *et al.*, 2001, Vergé *et al.*, 2002). Os resultados foram expressos em classes de 5 em 5% de área foliar danificada (média de danos nas folhas analisadas por planta). Nas medidas diárias, foi estimada a porcentagem acumulada de área foliar afetada por sintomas visíveis.

Antioxidantes

O conteúdo de glutatona reduzida (GSH) e de glutatona oxidada (GSSG) foi obtido a partir de 1,0g folhas que foram trituradas em solução extração (solução de ácido sulfosalicílico 0,1%) e os extratos obtidos foram centrifugados por 20 minutos a 11.000 rpm sob temperatura de 4,0°C. Ao sobrenadante obtido foi adicionado 1,75 mL tampão fosfato 0,1 M acrescido de EDTA 0,5mM e DTNB 3,0mM. Após cinco minutos foi feita a leitura do conteúdo de GSH em espectrofotômetro a 412nm. Na mesma mistura anterior foi adicionado 0,1mL NADPH 0,4mM, e 2 µL de glutatona redutase e, após 20 minutos, foi feita a segunda leitura com mesma absorbância resultando desta reação o conteúdo de glutatona total (GSH + GSSG) (ISRAR *et al.*, 2006).

Para obtenção das atividades enzimáticas de APX e SOD, o material vegetal foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, Triton 0,05%, polivinilpolipirrolidona (PVPP) 10% e 1 mM ácido ascórbico e depois centrifugado por 10 min, a 10000 rpm. A atividade da SOD foi determinada através do método proposto por Oswald *et al.*, (1992), com modificações. Esta foi medida em uma mistura de reação contendo nitro blue tetrazolium (NBT), metionina, EDTA, tampão fosfato 100mM pH 7,0, riboflavina e o extrato vegetal. Após 15 minutos de exposição à luz fluorescente (80W), mediu-se a absorbância da mistura, a 560 nm. Os controles de cada amostra eram protegidos da luz. A atividade da enzima foi determinada pela inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido.

Para determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX), foi utilizada a metodologia proposta por ASADA (1984), com modificações. A mistura de reação consistiu de tampão fosfato 80 mM, pH 7,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de ácido ascórbico(AA) e 2 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A reação foi iniciada com a adição do extrato vegetal, descrito anteriormente, à mistura. A atividade da APX foi medida em um espectrofotômetro UV/VIS a 290 nm, por 2 minutos, onde observou-se o consumo de AA utilizado pela enzima para decompor o H₂O₂ em água. Finalmente, para a extração da enzima glutatona redutase (GR), o material vegetal foi homogeneizado com tampão

fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, 5 mM de ácido ascórbico, 5mM de EDTA e PVPP (10%), logo após centrifugado por 10 min, a 10000 rpm e congelado à - 80°C. A atividade da enzima foi medida em uma mistura de reação contendo o extrato foliar, tampão fosfato 100 mM, pH 7,5, 1 mM de DTNB, 0,1 mM de NADPH e 1 mM de glutatona oxidada (GSSG), a 30 °C (Ramachandra Reddy *et al.*, 2004). A reação era iniciada a partir da adição do extrato contendo a enzima GR que realizava a redução da GSSG à GSH na presença de NADPH, e a atividade da enzima é medida em espectrofotômetro a 412 nm, pela formação de composto formado pelo DTNB na presença de GSH.

Análises estatísticas

Para discussão dos resultados foram realizadas análises de variância e testes de comparações múltiplas, para localizar diferenças entre exposições

RESULTADOS

A exposição de plantas de *N. tabacum* 'Bel W3' por 4 horas a 200ppb de O₃ já é suficiente para gerar injúrias foliares visíveis características, que se iniciam como pontos brilhantes nos espaços intervenais da superfície adaxial das folhas, progredindo para pontos necróticos acinzentados ou amarronzados (DOMINGOS, *et al.*, 002; VDI, 2003). Estas injúrias aparecem inicialmente nas folhas mais velhas, progredindo para as mais jovens com a exposição ao O₃ e podem levar ao amarelecimento total da folha, acelerando a senescência e a abscisão (SANZ *et al.*, 002). Esse padrão foi verificado no presente estudo em todas as estações do ano. Ao longo do mês de março, período correspondente ao verão, sintomas foliares visíveis nas folhas 6 e 7 foram observados em um único dia de amostragem. Durante o outono, a ocorrência de sintomas foliares foi maior que no verão, porém, menor que no inverno. A porcentagem da superfície foliar coberta por injúrias variou entre 0 e 70%, ao longo do estudo. O inverno foi o período em que os sintomas foliares visíveis ocorreram em maior intensidade, chegando a ocupar 90% da área foliar, já a primavera foi o período de maior porcentagem de plantas afetadas por danos foliares. Esta maior frequência de injúrias na primavera pode ser decorrente do maior fluxo de ozônio para o interior da folha observado no período (dados não publicados).

Todos os antioxidantes estudados demonstraram diferenças (P <0,001) entre as estações do ano. As três enzimas analisadas (SOD, APX e GR) apresentaram tendências semelhantes. Este padrão foi o inverso ao analisar a razão de concentração de glutatona (forma reduzida (GSH) dividida pela quantidade de glutatona total, ou seja, a forma reduzida somada à forma oxidada (GSH + GSSG)). Este cálculo foi utilizado por Baccio *et al.* (2008) para demonstrar o estado redox desde composto. Sendo assim, quanto maior for o número obtido nesta razão maior será a quantidade de glutatona na forma reduzida e melhor será a eficiência do composto como antioxidante.

A atividade mediana da enzima SOD durante o verão foi de 1830 Unid SOD/gs, a qual foi significativamente maior do que nas estações outono, inverno e primavera (respectivamente medianas de 1163, 847 e 1037 Unid SOD/gs). A atividade da enzima APX também foi maior durante o

verão e outono, apresentando respectivamente medianas de 43,7 e 44,6 dA/min/gs, enquanto que o inverno e primavera apresentaram valores mais baixos, com medianas de 25,4 e 33,87 dA/min/gs. Finalmente, a atividade da enzima GR foi maior durante o verão, com mediana de 3350 dA/min/gs e menor no outono e no inverno, com medianas de 1233 e 1890 dA/min/gs respectivamente. Para esta enzima, a menor atividade observada ocorreu na primavera, tendo sido obtida uma mediana de 1030 dA/min/gs nessa estação.

As razões de concentração do composto antioxidante glutathiona, durante o verão (0,45) e outono (0,46), foram as menores quando comparadas as estimadas para o verão (0,94) e primavera (0,93). Isto indica um maior consumo da sua forma reduzida nas duas primeiras estações. Considerando que houve maior atividade da enzima GR, que catalisa o retorno da GSSG em GSH, este resultado se apresentou como esperado. Da mesma forma, durante os períodos em que a atividade da enzima apresentou - se menor, estimaram - se razões mais altas entre GSH e GSSG, assim evidenciando que a baixa atividade dessa enzima resultou em conteúdos de glutathiona oxidada mais altos.

Plantas sensíveis ao poluente ozônio geralmente apresentam baixa capacidade antioxidativa, com deficiências no ciclo ascorbato - glutathiona que levam a neutralizar poucas EAO deixando - as na sua forma reativa levando ao surgimento de danos foliares (Burkey et. al. 2002 e 2006, Di Baccio et al., 2008). No presente estudo, verificou - se que a capacidade antioxidativa, em plantas de *N. tabacum* variou sazonalmente e pareceu influenciar a intensidade de danos foliares. Desse modo, na primavera, a menor eficiência antioxidativa poderia explicar a maior ocorrência de injúrias nesse período.

CONCLUSÃO

Em síntese, até o momento, é possível verificar que as plantas de tabaco estiveram sob estresse oxidativo durante o período da primavera 2008, evidenciando alterações no ciclo ascorbato - glutathiona que podem estar relacionadas ao aumento de O₃ do no local de estudo. Isto pode ser verificado pelas menores atividades das enzimas e maiores concentrações de glutathiona mantida na sua forma reduzida, resultados que sugerem uma diminuição na defesa das plantas em estudo.

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio ao projeto (Proc. FAPESP 06/61024 - 0) e pela bolsa a D.T. Silva e à CAPES pelas bolsas de mestrado a A.P.S. Dias e doutorado a A.N.V. Pedroso.

REFERÊNCIAS

Arndt U & Schweiger B. 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Biological monitoring. Signals from the environment (Ellenberg et al., ds.). *Vieweg, Eschborn*, pp. 199 - 298.

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

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

Burkey KO, Neufeld HS, Souza L, Chappelka AH, Davison AW. 2006. Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone - sensitive wildflowers. *Environmental Pollution* 143:427 - 434.

Burkey, K.O., Eason G. 2002. Ozone tolerance in snap bean is associated with elevated ascorbic acid in the leaf apoplasto. *Physiologia Plantarum* 114: 387-394.

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

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.

Emberson L, Kuylenstierna J, Ashmore M. 2003. Assessing the extent of air pollution impacts in developing country regions. In: *Air pollution impacts on crops and forests. A global assessment. Imperial College Press.* (Emberson et al., eds.). London. pp. 309 - 335.

Epstein E. 1975. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. *Tradução e notas de E. Malvolta.* Livros técnicos e científicos. *Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.*

Heggestad HE. 1991. Origin of Bel - W3, Bel - C, and Bel - B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264 - 291.

Israr M, Sahi S, Datta R, Sarkar D. 2006. Bioaccumulation and physiological effects of Mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* 63: 519 - 598.

Klumpp A, Ansel W, Klumpp G, Vergne P, Sifakis N, Sanz MJ, Rasmussen S, Ribas H, Peñuelas J, Kambezidis H, He S, Garrec JP, Calatayud V. 2006. Ozone pollution and ozone biomonitring 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. Active biomonitring at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85: 109 - 16.

Krupa SV & Manning WJ. 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101 - 137.

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.*

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.

Ramachandra Reddy A, Chaitanya KV, Jutur PP & Sumithra K. 2004. Diferencial antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*.

Sant'Anna SM, Esposito MP, Domingos M & Souza SR. 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring photochemical compounds in São Paulo, Southeast Brazil. *Environmental Pollution* 151: 389 - 394.

Sanz, M.J., Sánchez, G., Calatayud, V., Minaya, M.A. & Cerveró, J. 2002. La contaminación atmosférica en los bosques: guía para la identificación de daños visibles por ozono. 1ª ed. *Artegraf S.A, Madrid*.

VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 1999. Biological measuring techniques for the determination and evaluation

of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/1. *VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin*.

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

Vergé X, Chapuis A & Delpoux M. 2002. Bioindicator reliability: the example of 'Bel W3' tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental Pollution* 85: 337 - 349.