



# CAPACIDADE DE OXI - REDUÇÃO DE PLANTAS DE *IPOMOEA NIL* 'SCARLET O'HARA' EM ÁREA CONTAMINADA POR OZÔNIO, NA CIDADE DE SÃO PAULO

Marcelle Dafré

Ricardo Keiichi Nakazato; Ana Paula Souza Dias; Mirian Cilene Spasiani Rinaldi; Clarice Sun Duk Kin; Sandra R. A. S. Viola; Regina Maria de Moraes; Marisa Domingos

Instituto de Botânica, Seção de Ecologia, Av. Miguel Stéfano, nº 3687, 04301 - 902, Água Funda, São Paulo, Brasil.

Tel. (11) 5073 - 6300, ramal. 297 marcelledafré@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

O interesse pela poluição por ozônio troposférico ( $O_3$ ) vem crescendo substancialmente, visto que suas concentrações podem crescer nas próximas décadas, inclusive nos países em desenvolvimento (Emberson *et al.*, 001). O  $O_3$  é um dos mais importantes poluentes fitotóxicos (Ball *et al.*, 1998, Guderian 1985).

O  $O_3$  é um componente da mistura de oxidantes fotoquímicos formados na atmosfera pela reação de hidrocarbonetos e óxidos de nitrogênio na presença de luz solar (Krupa 1997). Por isso, o incremento de compostos orgânicos voláteis (COVs) e óxidos de nitrogênio provenientes de emissões veiculares preocupam as agências de controle de qualidade do ar, por serem estes os precursores do ozônio, além de outros compostos do smog fotoquímico (Sawer *et al.*, 2000).

Uma vez absorvido pelas plantas, o ozônio reage com água e produz espécies ativas de oxigênio (EAOs), incluindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ), oxigênio singleto ( $^1O_2^*$ ) e radical hidroxila ( $\bullet OH$ ). Essas EAOs podem reagir com a membrana plasmática, promovendo a peroxidação lipídica, desencadeando uma série de reações que produzem radicais livres. Esses radicais livres e seus produtos reagem também com proteínas, DNA e lipídios nos diferentes compartimentos celulares (Sharma & Davis 1997). Assim, os efeitos da ação tóxica das EAOs são verificados em vários níveis da organização biológica, como: desarranjo de organelas e de paredes celulares; alterações estruturais; redução da fotossíntese; necroses e cloroses em folhas; aceleração da senescência foliar; diminuição do crescimento, da safra de produtos agrícolas e da vegetação natural (Krupa & Manning 1988, Hogsett *et al.*, 1997, Krupa 1997, Gravano *et al.*, 2003, entre outros).

Cabe lembrar, no entanto, que, mesmo na ausência de fatores de estresse oxidativo, EAOs são naturalmente produzidas em processos fisiológicos como fotossíntese e respiração. Por isso, existe nas células vegetais um sistema antioxidante

eficiente, formado por diversos compostos não enzimáticos como ácido ascórbico e glutatona e por enzimas como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR), que neutralizam substâncias oxidativas e impedem danos celulares como os descritos. Nessas condições, há um equilíbrio pró - oxidante/antioxidante, que é especialmente mantido por reações de oxi - redução envolvendo ácido ascórbico e glutatona. O radical superóxido ( $O_2^-$ ) se converte em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em reação catalisada pela SOD. Por meio da oxidação do ácido ascórbico a ácido monodeidroascórbico, catalisada pela enzima APX, o  $H_2O_2$  é convertido em água. A oxidação da glutatona (GSH) também permite a remoção de  $H_2O_2$  e ainda previne a peroxidação dos lipídios e elimina  $OH\bullet$  e  $O_2^-$ . A redução do ácido monodeidroascórbico a ácido ascórbico ocorre por redução enzimática nos cloroplastos ou por sua dismutação espontânea a ácido deidroascórbico, que reage com GSH, produzindo ácido ascórbico e glutatona oxidada (GSSH). Esta última, por sua vez, é reduzida pela GR, retornando a sua condição original. Em estados reduzidos, ácido ascórbico e glutatona podem ser novamente utilizados, caracterizando o ciclo ascorbato - glutatona (Sharma & Davis *et al.*, 1997). A capacidade de oxi - redução demonstrada por plantas, assim, está estreitamente relacionada à sua capacidade de tolerar a ação de fatores de estresse oxidativo no ambiente em que está crescendo.

Em espécies vegetais sensíveis ao ozônio, supõe - se que a capacidade de oxi - redução é pequena, de modo que o referido equilíbrio é rapidamente rompido, surgindo os sintomas foliares visíveis típicos (Muggli 1993). Plantas com tais características, inclusive, podem ser muito apropriadas para o monitoramento da presença de ozônio na atmosfera (Arndt & Schweiser 1991, Krupa & Manning 1988).

A *Ipomoea nil*, também conhecida por corda - de - viola, é uma planta nativa do continente americano, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina. No Brasil, tem vasta e expressiva ocorrência, sendo um das ipomoeas

mais freqüentes (Kissmann & Groth 1999). Nouchi & Aoki (1979) mostraram, em seu trabalho, que plantas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' expostas ao ozônio, sob condições experimentais, desenvolveram sintomas foliares típicos, como pontos cloróticos e necroses intervenais, indicando a possibilidade do uso dessa cultivar para o biomonitoramento.

É possível supor que injúrias podem surgir em plantas expostas em campo aos mesmos níveis dos poluentes do smog fotoquímico, a depender das condições ambientais como um todo, especialmente da incidência ou não de outros fatores ambientais extremos, como seca, alta intensidade luminosa, calor e frio. Estes, por contribuírem para a formação de EAOs (Bray *et al.*, 2000), podem estimular as defesas antioxidativas e interferir, em consequência, na relação entre intensidade de necroses e concentrações de poluentes na atmosfera.

Ferreira (2007) já mostrou que, em determinadas épocas do ano, como na primavera, respostas antioxidativas mais intensas, como aumento na concentração de ácido ascórbico total, pode restringir a progressão de danos foliares em *I. nil* 'Scalet O'Hara'. Contudo, permanece, ainda, desconhecido se ocorrem variações na capacidade de oxidação de plantas desta cultivar, quando expostas a um gradiente de condições ambientais de uma região contaminada por ozônio, e se estas podem modular sua eficiência para biomonitoramento em regiões urbanas brasileiras. Como comentado anteriormente, os antioxidantes desempenham papel importante nesse processo.

## OBJETIVOS

Verificar se a atividade de APX, GR e SOD e as concentrações de GSH, em suas formas reduzida e total em plantas de *Ipomoea nil* 'Scarlet O' Hara' mantidas em ambiente contaminado por compostos do smog fotoquímico, variam ao longo de um gradiente de condições ambientais, tanto no que diz respeito à contaminação atmosférica quanto às condições meteorológicas.

Identificar quais fatores ambientais determinam preponderantemente as variações na atividade de APX, GR, SOD e concentrações de GSH.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *I. nil* 'Scarlet O'Hara' foram germinadas em caixa plástica (gerbox) dentro de Casa de Vegetação. Após o aparecimento das folhas cotiledonares, cada plântula foi transplantada em vaso plástico com terra onde foram mantidas com irrigação por capilaridade, através de três cordões de nylon submersos em água de torneira em caixas plásticas cobertas por tela de arame, segundo modelo proposto pelo VDI (2003). As plantas foram adubadas semanalmente com solução de Peters (N:P:K)..

Após o aparecimento das folhas 6 e 7, considerando a folha número um como a mais velha, as plantas foram colocadas para fora da casa de vegetação, em um ambiente caracteristicamente contaminado por O<sub>3</sub> (PEFI; Instituto de Botânica), em estantes apropriadamente cobertas com sombrite de acordo com o VDI, onde ficaram expostas por

28 dias. No verão foram realizadas duas exposições, enquanto que nas outras estações do ano de 2008, foram realizadas 3 exposições, sendo cada uma iniciada com 36 plantas previamente numeradas. Ao longo de cada exposição, em seis dias sorteados, foram retiradas seis plantas igualmente sorteadas. Nas folhas 6 e 7 dessas plantas, foram realizadas análises das concentrações de glutatona e das atividades das enzimas SOD, APX e GR.

Durante todo esse período, as injúrias foliares visíveis e os fatores ambientais mais importantes foram monitorados por outros pesquisadores do mesmo projeto a qual este se insere.

### Métodos Analíticos

Atividade da glutatona redutase (GR)-Para a extração da enzima glutatona redutase (GR), o material vegetal foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio e logo após centrifugado. A atividade da enzima foi medida em uma mistura de reação contendo o extrato foliar, tampão fosfato, DTNB, NADPH e glutatona oxidada (GSSG) a 30°C (Ramachandra Reddy *et al.*, 2004). A reação foi iniciada a partir da adição de NADPH que permite a redução da GSSG pela enzima GR e a atividade da enzima foi medida em espectrofotômetro a 412nm, pela formação de composto formado pelo DTNB na presença de GSSG.

Atividade da superóxido dismutase (SOD)-A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada por método proposto por Oswald *et al.*, (1992), com modificações. O material vegetal foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio, ácido ascórbico e depois centrifugado. O extrato obtido foi dividido em duas alíquotas, pois este foi também utilizado para avaliar a atividade da enzima ascorbato peroxidase. A atividade da enzima SOD foi medida em uma mistura de reação contendo nitro blue tetrazolium (NBT), metionina, EDTA, tampão fosfato, riboflavina e o extrato vegetal. Após 15 minutos de exposição à luz fluorescente, mediu-se a absorbância da mistura a 560nm. Os controles de cada amostra foram protegidos da luz. A atividade da enzima foi determinada pela inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido.

Atividade da ascorbato peroxidase (APX)-Para determinação da atividade da enzima APX, foi utilizada a metodologia proposta por Asada (1984), com modificações. A mistura de reação consistiu de tampão fosfato, 1mM de EDTA, ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 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 290nm, por 2 minutos, por meio da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Concentrações de glutatona-Uma parcela das folhas foi triturada em solução extração (a base de ácido sulfosalicílico) e depois de centrifugadas, as alíquotas foram misturadas em solução tampão fosfato e DTNB, após 5 minutos de reação foi feita a leitura em espectrofotômetro a 412nm. Assim determinou-se a glutatona reduzida (GSH). Para determinar a glutatona total (Gtot), na mistura utilizada anteriormente foram acrescidos NADPH e glutatona redutase e, após 20 minutos de reação, foi feita uma nova leitura em espectrofotômetro a 412nm (Israr *et al.*, 006).

### Análise estatística

As diferenças na atividade das enzimas entre exposições, em cada estação climática e entre os dias de amostragem, na

mesma exposição foram verificadas por análises de variância não paramétrica (teste de Kruskal - Wallis), seguidas de teste de comparações múltiplas (teste de Dunn).

## RESULTADOS

Houve variações nos níveis de antioxidantes entre as exposições de uma mesma estação do ano. No verão, somente a APX mostrou variação entre exposições, tendo atividades mais altas durante a primeira. Durante o outono, a atividade de APX e a concentração de GSH foram menores na primeira exposição enquanto que a atividade de SOD foi menor na segunda exposição. No inverno, as menores atividades de APX ocorreram na primeira e segunda exposição e a de SOD na terceira exposição; as menores concentrações de GSH ocorreram na segunda exposição. Na primavera, a atividade de APX e a concentração de GSH foram menores na terceira exposição. A atividade de GR e a GSH/Gtot variaram apenas entre as exposições da primavera. A atividade da GR foi menor na primeira e segunda exposição e a razão GSH por Gtot foi menor na terceira exposição.

Houve também oscilações nos antioxidantes entre as estações do ano, com exceção da atividade de GR. A atividade de APX e a razão de GSH/Gtot foram menores no outono e maiores na primavera. As concentrações de GSH foram menores no verão e no outono. A atividade de SOD foi menor no inverno.

Nouchi & Aoki (1979), ao fumigar *I. nil* 'Scarlet O'Hara' com 300ppb do ozônio por uma hora observou injúrias foliares intensas, no entanto quando expôs as plantas a 75ppb por quatro horas não verificou nenhuma injúria foliar. Assim, as máximas concentrações de ozônio parecem afetar mais essa planta do que a concentração acumulada. No presente estudo, durante a exposição de outono, a menor atividade da APX e as menores concentrações de GSH, do mesmo modo, pareceram estar relacionadas com os picos horários na concentração de ozônio que ocorreram no período. Nessa estação, verificou - se a concentração máxima horária de ozônio (441 ppb) do ano de 2008, o que pode ter contribuído com a maior ocorrência de injúrias foliares durante o período do experimento.

A atividade da enzima SOD pareceu estar mais relacionada com as variações de outros fatores ambientais, como a temperatura, já que suas menores atividades ocorreram no inverno, oscilando no outono e as maiores atividades ocorreram no verão e na primavera, como visto por Bulbovas *et al.*, (2005).

A concentração de ozônio durante a estação da primavera variou pouco, as máximas horárias não passaram de 78ppb, refletindo na baixa variação de injúrias foliares visíveis, o que possivelmente está relacionada a alta atividade de APX e a alta razão de GSH por Gtot. Esse fato demonstra uma alta capacidade redox nas plantas dessa estação.

## CONCLUSÃO

A capacidade de oxi - redução dos antioxidantes dessa planta não foi suficiente para evitar as injúrias foliares. No entanto os resultados obtidos neste estudo mostraram que

a concentração de glutatona e as atividades das enzimas APX, GR e SOD, que fazem parte do ciclo ascorbato - glutatona variaram entre as exposições de cada estação e entre as estações, afetando a ocorrência dessas injúrias visíveis. Análises estatísticas das variáveis ambientais ainda serão realizadas para determinar a relação com os resultados obtidos dos antioxidantes.

(Agradecemos Fapesp - 05/511695, Cnpq e Capes)

## 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.*, eds.). Vieweg, Eschborn, pp. 199 - 298.
- Asada K. Assay of ascorbate - specific peroxidase. 1984. Methods Enzymological, v.105, pp.427 - 429.
- Ball GR, Benton J, Palmer - Brown D, Fuhrer D, Skaerby L, Gimeno BS. 1998. Identifying factors which modify the effects of ambient ozone on white clover (*Trifolium repens*) in Europe. Environmental Pollution.103:7 - 16.
- Bray EA, Bailey - Serres J & Werentilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants (Buchanan BB, Gruisen W & Jones RL, eds.) American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158 - 1203.
- Bulbovas P, Rinaldi MCS, Delitti WBC, Domingos M. 2005. Variação sazonal em folhas de plantas jovens de *Ceasalpinia echinata* Lam. (pau - brasil). Revista Brasileira de Botânica, v.28, pp. 687 - 696.
- Emberson LD, Ashmore MR, Murray F, Kuylenstierna JCI, Percy KE, Izuta T, Zheng Y, Shimizu H, Sheu BH, Liu CP, Agrawal M, Wahid A, Abdel - Latif NM, Van Tienhoven M, Bauer LI & Domingos M. 2001. Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. Water, Air and Soil Pollution 130 (1/4): 107 - 118.
- Epstein E.1975. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Tradução e notas de E. Malvolta. Livros técnicos e científicos. Editora Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ferreira ML. 2007. Relação entre antioxidantes e sintomas visíveis bioindicadores de ozônio em *Ipomoea nil* Roth cv. Scarlet O' Hara sob efeito da poluição aérea urbana de São paulo. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Gravano E, Giulietti V, Desotgiu R, *et al.*, 2003. Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone - pollution. Environmental Pollution 101: 137 - 146.
- Guderian, R. 1985. Air Pollution by photochemical oxidants: formation, control and effects on plants. Springer Verlag, Berlin.
- Hogsett WE, Weber JE, Tingey DT, Herstrom AA, Lee EH, Laurence JA.1997. An approach for haracterizing tropospheric ozone risk to forests. Environmental Management 21: 105-120.
- Israr M, Sashi S, Datta R, Sarkar D. 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sebania drummondii*. Chemosphere 65: 591 - 598.

- Krupa SV 1997. Air pollution, people and plants: an introduction. APS Press, Minnesota.
- Krupa SV, Manning WJ. 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environ Pollution*. 50(1 - 2):101 - 37.
- 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.
- Nouchi I & Aoki K. 1979. Morning glory as a photochemical oxidant indicator. *Environmental Pollution* 18: 289 - 303.
- Oswald, WF, Kraus R, Hippeli S, Benz B, Volpert R, Elstner EF. 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*, v.139, p.742 - 748.
- Rachamandra RA, Chaitanya KV, Jutur PP, Sumithra K. 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*.
- Sawyer FR, Harley RA, Cadle SH, Norbeck JM, Slott R & Bravo HA. 2000. Mobile sources critical review: 1998 NRSTO assessment. *Atmospheric Environment* 34: 2161 - 2181.
- Sharma YK, Davis KR. 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology & Medicine* 23: 480 - 488.
- 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 phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol.1 Beuth, Berlin.