



# CONTRIBUIÇÃO A AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOINDICADOR DE IPOMOEA NIL CV. SCARLET O'HARA PARA OZÔNIO TROPOSFÉRICO DA CIDADE DE SÃO PAULO - SP

M.L. Ferreira<sup>1,2</sup>

S.R. Souza<sup>1</sup>; M. Domingos<sup>1</sup>

1 - Instituto de Botânica, Seção de Ecologia, Caixa Postal 3005, 01061 - 970, São Paulo/SP, Brasil. 2 - Universidade Nove de Julho, Faculdade de Biologia, Diretoria de Saúde, Av. Adolfo Pinto, 109, Barra Funda, 01156 - 050, São Paulo/SP, Brasil

## INTRODUÇÃO

O ozônio troposférico tem causado preocupações devido à sua alta toxicidade e tendência de aumento em suas concentrações no futuro, além de ser indubitavelmente um dos poluentes mais tóxicos presentes na atmosfera (Iriti & Faoro, 2008). Ao entrar nas folhas pela via estomática, o ozônio intensifica a formação de espécies ativas de oxigênio, tais como, radical hidroxila e radical superóxido, no tecido vegetal, que reagem indiscriminadamente com biomoléculas, alterando a estrutura e funcionamento celulares (Ferreira *et al.*, 2007), com reflexos nos níveis mais altos da organização biológica, como o surgimento de necroses e cloroses foliares (Esposito *et al.*, 2009). Plantas sensíveis ao ozônio como *N. tabacum* Bel W3, por mostrarem injúrias foliares visíveis características, têm sido utilizadas para biomonitoramento de qualidade do ar, especialmente em países do hemisfério norte (Klumpp *et al.*, 2006, Iriti & Faoro 2008). O biomonitoramento de poluentes atmosféricos é uma ferramenta importante para o diagnóstico da saúde ambiental (Domingos *et al.*, 2002), principalmente em regiões industrializadas com um contingente populacional numeroso como o Estado de São Paulo, pois auxilia a detecção de altas concentrações onde aparelhos eletrônicos são inviáveis, geralmente nas localidades onde os poluentes são também prejudiciais, como florestas e campos de agricultura. Na cidade de São Paulo, terceiro maior conglomerado urbano do mundo, com uma população superior a 17 milhões de habitantes, uma frota veicular composta por mais de 7,4 milhões de carros e caminhões e com cerca de 2000 indústrias com alto potencial poluidor dos precursores do ozônio, o padrão de qualidade do ar (160  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  para uma hora) e o nível de atenção (200  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  para uma hora) para esse poluente são comumente ultrapassados em alguns pontos da cidade (CETESB 2007). Sendo assim, o ozônio pode alcançar concentrações suficientemente altas na região para induzir alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas em diferentes espécies vegetais, ao longo de seu crescimento em ambiente contaminado. Tais respostas em plantas sensíveis ao ozônio e bem adaptadas

às condições ambientais locais, se forem características, reprodutíveis e mensuráveis, podem vir a ser utilizadas, inclusive, para biomonitoramento, o que teoricamente permitiria a ampliação da área de abrangência do monitoramento de qualidade do ar em escala regional.

Tendo em vista que *Ipomoea nil* é uma espécie nativa do continente americano, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina (Kissmann & Groth 1999) e que plantas da cultivar 'Scarlet O'Hara' segundo Nouchi & Aoki (1979), desenvolveram sintomas foliares típicos (pontos cloróticos e necroses intervenais na superfície adaxial) quando expostas ao ozônio sob condições experimentais, levantou-se a hipótese de que tal cultivar pode ser utilizada em programas de biomonitoramento de ozônio na cidade de São Paulo, ou ainda em outras regiões de clima subtropical.

## OBJETIVOS

Objetivou-se neste estudo avaliar o potencial bioindicador de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara para o ozônio, primeiramente por meio da avaliação da intensidade de injúrias foliares em relação às oscilações nas condições ambientais e nas respostas antioxidativas (concentrações totais e ácido ascórbico e atividade de superóxido dismutase e de peroxidases totais), ao longo de seu desenvolvimento em um local da cidade de São Paulo predominantemente poluído por ozônio, nas quatro estações do ano.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local de exposição

Neste experimento foram realizadas quatro campanhas no parque do Ibirapuera, que é uma área pública arborizada, situada na região centro - sul da cidade de São Paulo, SE Brazil (23° 34'55" S de latitude; 46°39'25" W de longitude e 750 metros em relação ao nível do mar). O parque está

situado entre avenidas com intenso tráfego veicular e historicamente afetado por altos e crescentes índices de ozônio, especialmente nas estações de primavera e verão (CETESB 2007). O clima na região é subtropical, com temperatura média anual de 18,3 C, com invernos suaves e verões com temperaturas moderadamente altas, aumentadas pelo efeito da poluição e pela altíssima concentração de edifícios. A umidade tem índices considerados aceitáveis durante todo o ano (geralmente acima de 60%). A precipitação anual média é de 1317 mm, concentrados principalmente no verão (CETESB 2007).

## 2.2. Plantio e exposição

Sementes de plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara foram adquiridas de um mesmo fornecedor comercial (CN Seeds LTD, www.cnseeds.co.uk) e oriundas de um mesmo lote. Estas foram germinadas em caixa plástica transparente (gerbox) com 100 cm<sup>2</sup>. O substrato utilizado para a germinação foi composto por uma mistura de produto comercial produzido a base de casca de *Pinus* (Plantimax - Eucatex) e de vermiculita fina, na proporção de 3:1, respectivamente. As plântulas se desenvolveram nessas caixas até o surgimento da segunda folha cotiledonar, sendo, então, transplantadas para vasos plásticos com a mesma mistura de substrato utilizada na germinação das sementes. Foram realizadas quatro campanhas de exposição de plantas no local escolhido, com duração de 28 dias cada, uma em cada estação do ano. Assim, as campanhas de verão, outono, inverno e primavera foram realizadas respectivamente em fevereiro/março, maio/junho, agosto/setembro e novembro/dezembro de 2006. Cada campanha experimental foi iniciada com um lote de quarenta e cinco plantas de *I. nil*, quando elas já apresentavam a sétima folha expandida, incluindo as folhas cotiledonares. As plantas foram expostas sob sombreamento de 50%, em aparato similar ao proposto pelo VDI (2003) instalado ao lado da estação de monitoramento da qualidade do ar da Companhia Estadual de Saneamento Ambiental-CETESB. Este órgão forneceu os valores horários de temperatura, umidade relativa do ar, radiação global, velocidade de vento, ozônio, material particulado e dióxido de nitrogênio para cada campanha (www.cetesb.sp.gov.br). Essas plantas tiveram a irrigação adequada garantida por capilaridade, por intermédio de cordões de náilon inseridos na base dos vasos, seguindo modelo proposto por VDI(2003). Semanalmente, a partir do transplante, todas as plantas receberam 100 ml de solução nutritiva 'hoagland' descrita em Epstein (1975).

## 2.3. Análise dos antioxidantes

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

A determinação de ácido ascórbico nas folhas frescas de *I. nil* foi baseada em Keller & Schwager (1977). Alíquotas do limbo de folhas frescas (0,5 g) foram utilizadas para extração do AA. O restante da folha teve sua massa fresca e seca determinadas, para se obter a concentração do antioxidante em base de matéria seca. O extrato resultante da homogeneização foi centrifugado e submetido à análise em espectrofotômetro. Para análise de SOD, 0,1g de limbo

foliar foi triturado com 12 mL de solução tampão fosfato (50nM), pH 7,5 (contendo 1nM tritriplex III EDTA - NA2, 50nM NaCl e 1 mM AA) e PVPP (polivinilpolipirrolidona). Após centrifugação as amostras foram analisadas de acordo com Osswald *et al.*, (1992). Foi medida a absorvância em espectrofotômetro (560nm) e posteriormente foi calculada a atividade da enzima. Para medir a atividade de POD, foram retirados 0,35g do limbo foliar de cada folha e posteriormente esse material foi homogeneizado com 12 mL solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 e PVPP. Em seguida, esse material foi centrifugado e analisado em espectrofotômetro seguindo a metodologia descrita por Klumpp *et al.*, 1989.

## 2.4. Análise de injúrias foliares

Em cada campanha experimental, a cada três ou quatro dias, as 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> folhas mais velhas do ramo principal de cinco plantas foram analisadas quanto à porcentagem de área foliar afetada por injúrias visíveis, que foi baseada no procedimento proposto pela VDI (2003) para *Nicotiana tabacum* Bel W3.

## 2.5. Análise estatística

Realizaram - se análises exploratórias de correlação de Pearson com o objetivo de selecionar quais fatores, entre os meteorológicos ou os de poluição no parque do Ibirapuera, ou as respostas antioxidativas poderiam ter influenciado as a porcentagem de injúrias foliares. Para tanto, montaram - se matrizes de correlação entre a variável injúria foliar medida em cada dia de análise por estação do ano e os valores médios para os fatores abióticos e para as respostas antioxidativas no próprio dia de análise e nos 10 dias que antecederam a amostragem. A obtenção de coeficientes de correlação mais altos e significativos serviu como referência para as análises multivariadas realizadas em seqüência.

Finalmente, realizou - se análise de regressão multivariada para avaliar o quanto da variabilidade na porcentagem de área foliar afetada por injúrias visíveis (variável dependente) pôde ser explicado pelas defesas antioxidativas e pelos fatores abióticos (variáveis independentes). Essas análises multivariadas foram realizadas pelo método stepwise (passo a passo). O procedimento de ajuste de cada regressão iniciou com um modelo saturado, com todas as variáveis presentes, removendo aquelas de menor participação para explicar as variações nos antioxidantes e novos ajustes foram feitos. Ao final, permaneceram somente as variáveis que contribuíram significativamente para explicar as variações nas variáveis biológicas. Quando necessários, os dados foram transformados para alcançar normalidade.

## RESULTADOS

Os valores médios de temperatura e de radiação global foram menores no outono e maiores no verão. A radiação global, durante o inverno, foi alta e atípica para a região. A umidade relativa variou pouco entre as estações. A velocidade dos ventos foi mais baixa no outono e mais alta no inverno. As concentrações médias de PM10 tenderam a ser menores na campanha da primavera e maiores na de outono. Enquanto os níveis médios de O3 foram mais baixos no inverno e mais altos no verão, o inverso ocorreu para NO2. Os maiores picos horários nas concentrações de O3

resultaram na maior AOT40 no verão, entre os períodos estudados. Em oposição, a menor AOT40 foi observada no outono. As condições meteorológicas registradas em 2006 foram atípicas para o local de exposição. Observou-se, por exemplo, maior radiação na campanha de inverno do que na de primavera, em decorrência da alta nebulosidade ocorrida no início da segunda semana desta campanha. Estas condições meteorológicas atípicas se refletiram nas concentrações de ozônio. Estas foram mais baixas do que as médias históricas observadas no local (CETESB 2007). O conteúdo médio de ácido ascórbico por planta na campanha de verão variou significativamente ao longo dos dias de amostragem em cada campanha experimental, havendo um pico de concentração após 7 dias de exposição no Parque do Ibirapuera, e um decréscimo até o final do período de 28 dias. A atividade de superóxido dismutase foi significativamente maior nas folhas de plantas amostradas aos 7 e 21 dias de exposição do que nos demais dias de amostragem. A enzima peroxidases apresentou pouca variação na campanha de outono, fato completamente diferente quando comparado à campanha de inverno e primavera. Em média, os antioxidantes foram mais expressivos nas plantas expostas na campanha da primavera. A concentração foliar média de AA, por sua vez, foi menor no verão e no inverno, SOD foi menos ativa no verão e POD no outono. As menores concentrações de AA e atividade de SOD, nas plantas expostas no ambiente poluído durante o verão, pode ser um reflexo, pelo menos parcialmente, de menor condutividade estomática, em resposta à maior intensidade de radiação e a temperaturas do ar mais altas no período. Tal efeito tanto pode restringir o fluxo de ozônio para dentro da planta, como restringir a própria fotossíntese, processo pelo qual as espécies ativas de oxigênio são naturalmente formadas (Moraes *et al.*, 2006). Porém, ao contrário do que observaram Verge *et al.*, (2002) em plantas de *Nicotiana tabacum* Bel - W3, a possível diminuição da condutância estomática e, consequente diminuição do fluxo de ozônio para o interior da folha, não chegou a impedir a ocorrência de injúrias foliares no verão, que, inclusive, foram as mais extensas observadas neste estudo. Por outro lado, na campanha de primavera, houve evidente intensificação das defesas antioxidativas nas plantas de I. nil expostas no parque do Ibirapuera, o que pode ter sido uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo de natureza crônica observado no período, quando se verificaram condições meteorológicas e de contaminação mais amenas do que no verão. De fato, segundo Raychaudhuri & Deng (2000), o aumento da atividade de SOD pode resultar de tal resposta adaptativa, dependendo da espécie, do estágio de desenvolvimento ou do nível do estresse. Um aumento na atividade de SOD gera como consequência, maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que, em uma situação de equilíbrio, deverá ser inativado por maior atividade de POD (ascorbato peroxidase, em particular) e mais AA como substrato (Bray *et al.*, 2000). Assim, a maior atividade de SOD e de POD e maior concentração de AA podem indicar maior eficiência de plantas de I. nil 'Scarlet O'Hara' expostas no Ibirapuera durante a primavera em manter o equilíbrio pró - oxidante - antioxidante. Em todas as campanhas, as injúrias foliares sempre surgiram após a primeira semana de exposição, entre o sétimo e o décimo quarto dia de exposição. Expressando

os dados como médias por planta, observa-se que a área foliar afetada por injúrias foi maior na campanha de verão, alcançando valores superiores a 30% no final da exposição. No outono, estimou-se baixa porcentagem média de área foliar coberta por injúrias foliares (< 5%). Nas campanhas de inverno e primavera, pôde-se observar em torno de 10% de área afetada por injúrias. *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara mostrou-se sensível ao ozônio nas condições de exposição na cidade de São Paulo, uma vez que, injúrias visíveis, semelhantes às observadas por Nouchi & Aoki (1979) em estudo realizado em câmaras de fumigação, surgiram nas folhas de plantas expostas em todas as campanhas. Qualitativamente, a intensidade dos danos refletiu o nível de contaminação do ambiente por ozônio, observando-se as maiores porcentagens de injúrias foliares durante a campanha de verão, quando a dose acumulada de ozônio (AOT40) foi mais alta e menor intensidade de injúrias no outono, refletindo a baixa perturbação do ambiente por ozônio. A porcentagem média de injúrias foliares (IF) para todas as plantas amostradas em cada dia de amostragem (dados de todas as campanhas tratados conjuntamente) foi em grande parte ( $R^2=0,97$ ;  $p < 0,01$ ) função dos níveis médios de AA e da atividade da POD em plantas amostradas cinco a seis dias antes do dia de estimativa das injúrias foliares e dos valores médios diários de temperatura (T), radiação global (RG) e material particulado (MP10) 10 dias antes desse mesmo dia de estimativa de injúrias, de acordo com a equação preditiva:  $IF=[C]-AA-POD-MP10+T+RG$ . A porcentagem de injúrias visíveis aumentou na medida em que a atividade da SOD, a temperatura do ar e a radiação global aumentaram e foi restringida (relação negativa), pelo aumento da concentração de ácido ascórbico e da atividade da peroxidase, assim como da concentração de material particulado. Entre os antioxidantes analisados, a AA e POD pareceram ter importante papel na defesa das plantas de I. nil 'Scarlet O'Hara', visto que se observou relação negativa entre estes e porcentagem de área foliar afetada por necroses. Os resultados obtidos neste estudo indicam ter havido uma defasagem de dias entre mudanças ambientais indutoras do estresse oxidativo e respostas antioxidativas e entre estas e o surgimento de injúrias visíveis nas plantas de I. nil 'Scarlet O'Hara' expostas no ambiente contaminado por ozônio.

## CONCLUSÃO

Baseado nestes resultados sugere-se que dependendo da severidade das respostas de defesa contra o estresse oxidativo imposto pelas condições meteorológicas ou pela contaminação atmosférica por ozônio, pode ocorrer atraso na manifestação de injúrias foliares ou restringir sua progressão ao longo dos dias de exposição das plantas de I. nil 'Scarlet O'Hara', podendo comprometer sua eficiência como bioindicadora de ozônio na cidade de São Paulo, com base na análise da porcentagem de área foliar ocupada por injúrias.

## REFERÊNCIAS

- Bray EA, Bailey - Serres J & Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan BB, Gruissen W & Jones RL, eds.). American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158 - 1203.
- CETESB. 200. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo-2004. Série Relatórios.
- Domingos M, Bourotte C, Klumpp A, Klumpp G. & Forti MC. 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In *Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo* (Bicudo DC, Forti MC & Bicudo CEM, orgs.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 221 - 249.
- Epstein E. 1975. *Nutrição mineral das plantas. Princípios e perspectivas.* Editora da Universidade de São Paulo/Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, RJ, 341 p.
- Esposito M.P., Ferreira M.L., Santa'anna S.M.R., Domingos M., Souza S.R. 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* 'Bel - W3' under environmental conditions in São Paulo, SE-Brazil. *Atmospheric Environment* 43: 619 - 623.
- Ferreira M.L., Nobre J.B., Souza S.R., Domingos M. 2007. O Papel do Ácido ascórbico na Defesa de *Ipomoea nil* (L.) Roth cv. Scarlet O'Hara sob o Efeito da Poluição Aérea. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5: 312 - 314.
- Iriti M. & Faoro F. 2008. Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water, Air and Soil Pollution* 187: 295 - 301.
- Keller T, Schwager H. 1977. Air pollution and ascorbate. *Eur. J. Forest Pathol.* 7: 338 - 350.
- Kissmann K. G., Groth D. 1999. Plantas infestantes e nocivas. BASF Brasileira. Vol. 2: 978
- Klumpp A., Ansel W., Klumpp G., Vergne P., Sifakis N., Sanz M.J., Rasmussen S., Ro - Poulsen H., Ribas A., Peñuelas J., Kambezidis H., He S., Garrec J.P., Calatayud V. 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone - induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* 40: 7437 - 7448.
- Klumpp G, Guderian R, Küpers K. 1989. Peroxidase - und superoxiddismutase - aktivität sowie moProlingehalte von fichtenna - deln nach belastung mit O3 , SO2 und NO2. *Eur. J. Forest Pathol.* 19: 84 - 97.
- Moraes R M, Bulbovas P, Furlan C M, Domingos M, Meireles S, Delitti W B C, Sanz M J. 2006. Physiological responses of saplings of *Caesalpinia echinata* Lam., a brazilian tree species, under ozone fumigation. *Ecotoxicology and environmental safety* 63: 306 - 312.
- Nouchi I & Aoki K. 1979. Morning glory as a photochemical oxidant indicator. *Environmental Pollution* 18: 289 - 303.
- Osswald W F, Kraus R, Hipelli S, Bens B, Volpert R, Elstner E F. 1992. Comparasion of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid redutase, glutathione redutase, Catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant physiology* 139: 742 - 748.
- Raychaudhuri S S, Deng X W. 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The botanical review* 66: 89 - 98.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.
- Vergé X, Chapuis A, Delpoux M. 2002. Bioindicator reliability: the exemplo of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental pollution* 118: 337 - 349.