

## USO DE VARIÁVEIS DUMMIES EM ESTUDO ECOLÓGICO: RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS DE *Ipomoea nil* X SAZONALIDADE

**Maurício Lamano Ferreira<sup>1</sup>, Luiz Augusto F. F. Maluf<sup>1</sup>, Ana Paula Branco do Nascimento<sup>1</sup>, Marisa Domingos<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Uninove, Av. Adolfo Pinto, 109, Barra Funda, 01156-050, São Paulo, SP, Brasil, laffmaluf@gmail.com

<sup>2</sup> Instituto de Botânica/ SMA, Caixa Postal 3005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil, mmingos@gmail.com

**Resumo-** O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil sazonal de três espécies antioxidativas em *I. nil* ao longo das quatro estações do ano e verificar se tais variações são relacionadas às oscilações nos fatores meteorológicos dentro de uma casa de vegetação. Foram determinadas a concentração de ácido ascórbico, atividade de superóxido dismutase e peroxidases em folhas de *I. nil*. As respostas antioxidativas oscilaram ao longo do ano. Os valores mais altos foram encontrados durante a primavera. Essa sazonalidade no perfil antioxidativo foi associada a variações em temperatura, umidade relativa e radiação global. Através desses resultados pode-se dizer que plantas dessa cultivar podem tolerar o estresse oxidativo imposto naturalmente pelas condições meteorológicas.

**Palavras-chave:** ácido ascórbico, superóxido dismutase, peroxidases, *Ipomoea nil*

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

### Introdução

É bem conhecido que algumas espécies antioxidantes do ciclo ascorbato-glutationa desempenham um papel importante na desintoxicação de espécies ativas de oxigênio (EAO) produzidas durante atividades metabólicas normais, como por exemplo, a redução fotoquímica do O<sub>2</sub> no tilacóide (Chernikova *et al.* 2000) ou mesmo por razões exógenas, como a entrada do ozônio à planta (Scandalios 1993).

Tais antioxidantes podem sofrer uma sazonalidade em sua formação e atividade em função de fatores exógenos, como por exemplo, condições meteorológicas, mesmo na ausência de fatores de estresse de origem antrópica (Larcher 2000). Outros fatores importantes que interferem na intensidade de ação dos antioxidantes são a temperatura e a umidade relativa do ar, que além de influenciarem na abertura estomáca, regulando o processo da fotossíntese e, assim, o nível de EAO produzidas, também podem atuar como agentes de estresse para as plantas (Lee *et al.* 2004; Takac 2004; Bulbovas *et al.* 2005).

Há de se considerar, ainda, que ao longo dos diferentes estágios de vida das plantas, variações nos níveis dos antioxidantes podem ocorrer, promovendo assim uma flutuação normal na produção dessas espécies (Klumpp *et al.* 2000). A intensidade de ação dos antioxidantes varia, também, em função da idade da folha (Musselman & Massman 1998). Durante o processo de senescência, último estágio de desenvolvimento

da folha, as atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase tendem a diminuir (Iqbal *et al.* 1996). Tal fato ocorre concomitantemente com uma maior degradação de proteínas, ácido nucléico, além da perda de clorofila.

Portanto, é de se esperar que haja variações no sistema de defesas ao longo do ciclo de vida de uma planta, tornando-a mais suscetível aos diversos fatores de estresse, sejam eles endógenos ou exógenos, e que a sazonalidade nas condições climáticas possam interferir em tais variações, tornando-a mais ou menos vulnerável ao longo das estações do ano. Neste trabalho pretende-se aplicar um modelo estatístico pouco utilizado em estudos de ecologia, mas que mostrou uma boa aplicabilidade no conjunto de dados aqui presentes.

Assim, objetivou-se, neste trabalho: 1) verificar por meio de variáveis dummy se ocorrem variações em três espécies antioxidativas em folhas de plantas de *Ipomoea nil*, ao longo de seu desenvolvimento e, nas quatro estações do ano, quando expostas em casa de vegetação, às oscilações naturais em fatores climáticos de São Paulo; 2) verificar se tais variações estão relacionadas às oscilações de temperatura e de umidade relativa do ar observadas ao longo das estações do ano.

### Metodologia

*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).

#### 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).

#### 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. O primeiro dia de coleta foi chamado de T1, o segundo de T2 e assim sucessivamente até o nono dia de coleta que foi chamado de T9. 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 absorbância em espectrofotômetro (560nm) e posteriormente foi calculada a atividade da enzima.

#### Análise estatística

Foram pesquisadas diferenças nos dados obtidos a partir da análise de antioxidantes referentes as folhas em cada dia de amostragem por meio de análise de variância. Para o tratamento dos dados foi utilizado análise de regressão calculada com variáveis dummies. Foram analisados os efeitos da exposição local de plantas (Casa de Vegetação e Parque do Ibirapuera) e sazonalidade (estações) sobre a concentração de AA e a atividade da SOD nas plantas, e o perfil do aumento da concentração de AA e atividade de SOD nas plantas, entre o terceiro e oitavo dia de análise. Realizaram-se, finalmente, correlações de Pearson para determinar as relações entre oscilações em fatores meteorológicos no interior da casa de vegetação em cada campanha experimental e entre as respostas antioxidativas foliares durante todo o período experimental

#### Resultados

Na maioria dos casos, não houve diferenças significativas nas respostas antioxidativas encontradas nas folhas analisadas

em cada dia de amostragem no decurso de cada campanha experimental. Assim, os dados foram tratados como média de antioxidantes por planta, por apresentarem concentrações semelhantes e atividades entre as três folhas analisadas. Tais antioxidantes apresentaram uma variação de seus níveis ao longo do ano. Nos dados analisados não foi observada diferença significativa na concentração de ácido ascórbico e atividade de SOD na folhas das plantas expostas nos diferentes locais (Casa de vegetação e parque do Ibirapuera), assim, a variável “local de exposição” foi retirada do modelo e os dados trabalhados.

O teor de ácido ascórbico nas plantas expostas durante a campanha de verão apresentou uma variação ao longo dos 28 dias. A concentração de AA no primeiro dia de análise foi a menor registrada na campanha, então pode ser observado um aumento durante o envelhecimento da planta. Próximo ao final da exposição, a concentração de AA tendeu a abaixar novamente. Durante a campanha de outono, a concentração de AA permaneceu praticamente constante, conforme as plantas foram ficando mais velhas, com exceção de três dias, que apresentou uma concentração significativamente mais elevada quando comparada com os outros dias. A campanha de inverno foi caracterizada pela alta concentração do AA no último dia de amostragem, fato que foi significativo. Na campanha de primavera AA apresentou algumas oscilações ao longo do período experimental, no entanto, observou-se que ele sempre se manteve elevado na planta, desde a primeira até à última amostragem. O meio da campanha foi caracterizado pelas concentrações significativamente mais elevadas do antioxidante. Comparando a concentração de AA nas plantas de *I. nil* durante as quatro estações do ano, observou-se que as plantas expostas na campanha de primavera foram as que apresentaram os valores mais elevados de antioxidantes, seguido pelo verão, inverno e outono.

Os dados das amostras foram utilizados para o cálculo de regressões com variáveis “dummie” (Gujarati, 2002). Os resultados das análises mostraram que, tomando-se a primavera como referencial, para o terceiro dia de análise, ou seja, o T3, a concentração de AA no verão foi em média 0,62% maior, sendo ainda 0,41% menor na campanha de outono e em média 0,22% menor na campanha de inverno. Já para o oitavo dia de análise, ou seja, o T8 a presença de AA foi em média 0,53% menor no verão, 0,38% maior no inverno.

Em termos da taxa percentual de crescimento de AA entre T3 e T9, detectou-se que

a taxa de crescimento média da concentração de AA na primavera foi de aproximadamente -0,16%, com aproximadamente 16% de significância. Utilizando-se essa campanha como referência, notou-se que no verão, a taxa de crescimento média da substância foi aproximadamente 1,21 ponto percentual menor, com significância próxima de zero e no outono, a taxa de crescimento média da substância foi aproximadamente 0,32 ponto percentual maior, com significância próxima de zero. No inverno, a taxa de crescimento média da substância foi aproximadamente 0,55 ponto percentual maior do que na primavera, com significância próxima de zero.

A enzima superóxido dismutase mostrou um perfil oscilatório durante a campanha de verão, com atividades significativamente maiores no meio e no final da campanha. Durante o outono, a SOD manteve uma atividade relativamente constante nas plantas.

Semelhante ao AA, superóxido dismutase apresentou um aumento significativo em sua atividade no último dia de amostragem, apresentando no meio da campanha os menores valores de SOD nas plantas de *Ipomoea nil*. A campanha de verão foi marcada por um aumento significativo da atividade da enzima nos últimos dias de amostragem. Em geral, a campanha de primavera foi o que registrou os maiores valores de SOD nas plantas analisadas. A atividade média da SOD foi aumentando na seqüência do verão, outono, inverno e primavera (Tabela 1). Os resultados sintetizados na tabela mostram claramente que as concentrações de ácido ascórbico e a atividade da SOD mostraram-se superior na primavera (Fig. 2).

Tabela 1. Os valores médios de AA e SOD em plantas de *I. nil* ao longo de 28 dias de cada campanha experimental. Letras maiúsculas indicam diferenças entre o conteúdo e a atividade de antioxidantes em diferentes estações do ano.

Campaign	AA (µg/g ms)	SOD (Unid/g ms)
Summer	7,9 A	332,6 B
Autum	6,3 A	370,5 B
Winter	6,9 A	384,0 B
Spring	8,6 A	619,8 A

Para a atividade de SOD nas folhas de *Ipomoea nil* não foi observada diferença estatística entre as estações de outono e inverno. Para o

terceiro dia de análise, ou seja, o T3, observou-se que a presença de SOD foi em média 0,38% maior no verão do que na primavera. Para o oitavo dia de análise, ou seja, o T8, notou-se que a atividade da SOD foi em média 1,08 ponto percentual menor na campanha de verão do que na primavera, tendo também se mostrado 1,53 ponto percentual menor na campanha de outono, comparando-se ainda à campanha de primavera.

Em termos de taxa percentual de crescimento da atividade da SOD entre T3 e T8, notou-se que a taxa de crescimento média da atividade de SOD na primavera foi de aproximadamente 0,55%, com significância próxima de zero. Tendo-se essa estação como referência, a campanha de verão apresentou uma taxa de crescimento médio da atividade de SOD de aproximadamente 1,22 ponto percentual menor, com significância próxima de zero. Na estação de outono, observou-se uma taxa de crescimento média da atividade de SOD de aproximadamente 1,10 ponto percentual menor do que na campanha de primavera, com significância próxima de zero.

As análises de correlação de Pearson indicaram que as variações nos antioxidantes foram estimulados pelas oscilações diárias nos fatores climáticos como temperatura e umidade durante as diferentes estações do ano (Tabela 2). Matrizes de correlação entre os níveis de antioxidantes em cada dia de análise e os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar durante o dia apropriado de análise e nos 10 dias que antecederam a colheita (dados não mostrados) apontaram que estímulos como foram, em geral, observada entre os quinto e sexto dias de análises anteriores (indicado para maiores e os coeficientes de correlação significativos). Conforme indicado na Tabela 2, observou-se que AA foi influenciada pela temperatura durante as estações do ano. Percebe-se que as relações mais fortes ocorreram durante o verão e as campanhas de inverno, fato que coincide com as estações que apresentaram maior radiação global (dados não mostrados). Por outro lado, SOD não apresentou tão influenciada por estas variáveis climáticas, sendo SOD influenciada pela temperatura apenas durante as campanhas de outono e inverno.

Tabela 2. Análise da Correlação de Pearson entre os níveis de antioxidantes no dia de análise e os valores da temperatura ambiente (T em °C) e umidade (ER%) cinco dias antes. (\*) Estatisticamente significativo p < 0,05.

		AA	SOD
Verão	T	0,69*	0,40
	UR	0,08	0,54

Outono	T	-0,47*	-0,50*
	UR	-0,004	0,12
Inverno	T	0,53*	-0,86*
	UR	0,47*	-0,28
Primavera	T	-0,06	0,25
	UR	-0,50*	0,61*

As análises de correlação de Pearson mostraram que os antioxidantes nas quatro campanhas, em geral, apresentaram significativa correlação: AA x SOD (r = 0,37, p = 0,03); AA x POD (r = 0,44, p = 0,02) e SOD POD x (r = 0,44 e p = 0,02) (Figura 1).

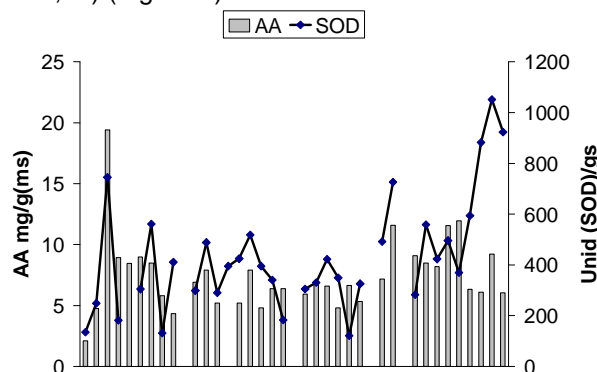


Figura 1. Sobreposição de perfis de antioxidantes em folhas de *I. nil* 'Scarlat O' Hara, em nove dias de análise, ao longo de 28 dias de cada campanha experimental. Barras: ácido ascórbico; linha: superóxido dismutase.

### Discussão

A resistência de plantas para os mais variados tipos de fatores ambientais que causam o estresse oxidativo é determinada, entre outros aspectos, pela eficiência de seu sistema de defesa antioxidativo. As análises de dummy mostram que esta eficiência é mutável no decorrer do desenvolvimento da planta, como se observa, por exemplo, o ácido ascórbico nas plantas utilizadas durante a campanha de verão. Normalmente, espera-se que as folhas mais jovens apresentem maior capacidade de defesa do que as folhas mais velhas na mesma planta. Ohe et al. (2005) observaram que sob condições de estresse oxidativo folhas mais velhas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi apresentaram menor teor de AA e menor atividade da ascorbato-peroxidase nos cloroplastos, quando comparado com as folhas mais jovens. Além disso, as folhas mais jovens apresentaram em média um elevado ritmo metabólico, devido ao seu estágio de desenvolvimento, que intensificam a formação de espécies reativas de oxigênio e exige uma maior eficiência do sistema antioxidativo.

No entanto, a variação nos níveis de antioxidantes em diferentes períodos da vida da planta, como evidenciado na análise de Dummy, não foi tão evidente como nas diferentes estações

do ano. Os valores mais elevados de antioxidantes encontrados nas campanhas de verão e na primavera, provavelmente, refletem uma condição típica do ambiente neste período do ano. Este é o momento de maior radiação solar e temperaturas mais altas, logo, este período apresenta uma maior taxa de fotossíntese nas plantas e, conseqüentemente, ocorre uma maior formação de ERO, que exige um aumento das defesas das plantas. Segundo Larcher (2000), quantidades extremas de radiação e um aumento da absorção de radiação UV produzir uma situação de estresse, sendo o centro de reação do fotossistema II, o primeiro lugar a ser atingido. Outros autores também já observaram o efeito da sazonalidade em antioxidante e os associaram às características meteorológicas de cada época do ano. Este foi o caso de Gilham & Dodge (1987), que mostrou variação sazonal nos níveis de ácido ascórbico, ascorbato peroxidase e glutathione redutase em folhas de *Satium sativum* (L.). Neste experimento o inverno foi marcado pela baixa atividade e concentração de antioxidantes e o verão por elevados valores em seus níveis. Os autores relacionaram esses resultados à densidade de fluxo de luz, que é menor no inverno. Durante as épocas mais quentes do ano, a taxa respiratória é maior, o que também pode refletir um aumento na eficiência do sistema defensivo, devido a uma maior atividade das mitocôndrias. De acordo com Dizengremel (2001), o aumento da respiração está associada a um aumento na síntese NADH que está relacionada com a formação da enzima superóxido dismutase, peroxidases, além também de ser importante na regeneração de ácido ascórbico e outros antioxidantes. Bowler et al. (1989) encontrou um aumento grande na atividade da SOD-manganês em *Plumbagifolia Nicotiana* durante a maior respiração induzida por alguns fatores de estresse.

Neste estudo, a análise de correlação de Pearson evidenciou que houve um desequilíbrio de tempo entre as mudanças no ambiente e as respostas antioxidantes. Oscilações na temperatura e umidade refletiram, provavelmente, no sistema defensivo de *I. nil* cv. Scarlet O'Hara, após alguns dias em que elas estavam crescendo no ambiente.

Além disso, tais relações não foram uniformes nas diferentes estações do ano. A Tabela 2 mostra que a superóxido dismutase foi influenciada negativamente pela temperatura, mas apenas no outono e inverno. É bem conhecido que SOD catalisa a dismutação do radical superóxido, produzindo  $H_2O_2$  e oxigênio (Scandalios 1993; Raychaudhuri e Deng 2000), portanto, qualquer variação no ambiente capaz de provocar um desequilíbrio no sistema prooxidante / antioxidante

da célula pode ser um ativador possível na atividade desta enzima, devido à sua capacidade de regular as concentrações de oxiradicals nas células e organelas (Iqbal et al. 1996). Bulbovas et al. (2005) observaram uma relação positiva entre os níveis de SOD e temperatura em plantas de *Caesalpinia echinata* Lam. cultivadas na mesma casa de vegetação do presente estudo. A análise estatística mostrou ainda uma forte relação positiva entre a temperatura e a concentração de AA na campanha de verão e uma relação negativa na campanha de outono. A umidade relativa apresentou correlação negativa com AA na primavera e uma relação positiva com SOD. Essas relações opostas em diferentes épocas, provavelmente estão relacionadas à maior ou menor taxa de fotossíntese, transpiração e respiração da planta, uma vez que temperatura e umidade relativa do ar são fatores reguladores do movimento estomático.

As relações negativas entre essas condições climáticas e de antioxidantes pode ter refletido em um maior fechamento dos estômatos, a fim de limitar a perda de água, resultando na redução das taxas de fotossíntese e da produção natural das espécies reativas de oxigênio. O fato de antioxidantes apresentarem uma forte relação positiva entre si sugere que, em geral, a comunicação endógena nas plantas, em resposta às variações do ambiente, parece ter refletido a boa capacidade de defesa de *I. nil* contra o estresse oxidativo. Isso significa que a alta atividade de SOD levou a um aumento na produção de  $H_2O_2$ , que foi, por sua vez, eliminado por outras substâncias antioxidantes do ciclo ascorbato-glutathione como AA e Peroxidases (mais especificamente ascorbato peroxidase). Por outro lado, em períodos determinados, dependendo da intensidade do esforço, o desempenho de uma espécie antioxidante parece compensar o desempenho de outro. Até o final da campanha de primavera, por exemplo, o aumento da atividade da SOD foi comparado com uma redução na concentração de AA, sendo capaz de indicar, a eficiência do ciclo ascorbato-Glutathione, em um período de intensa formação natural de ERO durante o decorrer dos processos fisiológicos.

No entanto, no presente estudo, a regeneração do ácido ascórbico oxidada no processo de eliminação de  $H_2O_2$  não foi estudada, que também é uma importante ferramenta para determinar a capacidade da planta para se defender contra o estresse oxidativo e manter o equilíbrio prooxidante / antioxidante definido pela Muggli (1993).

## Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que de fato ocorre uma sazonalidade no perfil antioxidativo de *Ipomoea nil* nas quatro estações do ano devido a ação de determinados estímulos ambientais, como por exemplo, temperatura e umidade relativa do ar, que pode exigir uma maior eficiência do sistema antioxidativo.

## Referências

- BACCIO D., CASTAGNA A., PAOLETTI E., SEBASTIANI L., RANIERI A. Could the differences in O<sub>3</sub> sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O<sub>3</sub> influx?. *Tree Physiology* 28, 1761–1772. 2008.
- BOWLER C; ALLIOTE T; DE LOOSE M; MONTAGU M V; INZÉ D. The induction of manganese duperoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. Vol 8: 31-38. 1989.
- BULBOVAS P; RINALDI M C S; DELITTI W B C; DOMINGOS M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica* vol. 28 nº 4. 2005.
- CHERNICOVA T; ROBINSON J M; LEE E H; MULCHI C L. Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynthesis research*. 64: 15-26. 2000.
- DIZENGREMEL P. Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant physiology biochemistry*. 39: 729-742. 2001.
- EPSTEIN E. 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. 1975.
- FERNANDES A J; REIS L A M; CARVALHO A. Caracterização do meio físico. 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. 51-62. 2002.
- GILHAN D J; DODGE A D. Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide scavenging systems from pea leaves: sazonal variation. *Plant science* 50:105-109. 1987.
- GUJARATI, D. *Econometria Básica*. Rio de Janeiro: Campus, 2002.
- Iqbal M; Abdin M Z; Mahmooduzzafar M Yunus; Agrawal M. Resistance mechanism in plants against air pollution. In: *Plant response to air pollution* (M. Yunus & M. Iqbal eds). Jhon Wiley and Sons, Chischester, p. 195-240. 1996.
- IRITI M, FAORO F. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollut* 187:285–301. 2008.
- Keller T, Schwager H. Air pollution and ascorbate. *Eur. J. Forest Pathol.* 7: 338-350. 1977.
- KLUMPP G, FURLAN C M, DOMINGOS M, KLUMPP A. Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *The science of the total environment* 246: 79-91. 2000.
- KLUMPP G, GUDERIAN R, KÜPERS K. Peroxidase-und superoxiddismutase- aktivität sowie Prolingehalte von fichtenna-deln nach belastung mit O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> und NO<sub>2</sub>. *Eur. J. Forest Pathol.* 19: 84-97. 1989.
- LARCHER W. *Ecofisiologia Vegetal*. Rima Artes e Textos, São Carlos. 2000.
- LEE M A, CHUNS H S, KIM, JW, LEE H, LEE D H, LEE C B. Changes in antioxidant enzyme activities in detached leaves of cucumber exposed to chilling. *Journal of Plant Biology* 47:117-123. 2004.
- MUGGLI R. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: *Free radicals and antioxidantes in nutrition* (F. corongiu, S. Banni, M. A. Dessi and C. Rice-Evans eds) Richelieu Press, London, p. 189-250. 1993.
- MUSSELMAN R C, MASSMAN W J. Ozone flux to vegetation and its relationship to plant response and ambient air quality standards. *Atmospheric environmental* 33: 65-73. 1998.
- OHE M, RAPOLU M, MIEDA T, MIYAGAWA Y, YABUTA Y, YOSHIMURA K, SHIGEOKA S. Decline in leaf photooxidative-stress tolerance with age in tobacco. *Plant science* 168: 1487-1493. 2005.
- OSSWALD W F, KRAUS R, HIPELLI S, BENS B, VOLPERT R, ELSTNER E F. 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. 1992.
- RAYCHAUDHURI S. S., DENG X. W. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The botanical review* 66(1): 89-98. 2000.

SCANDALIOS J. G. Oxigen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*.101: 7-12. 1993.

Smirnoff, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annuals of botany*. 78: 661-669. 1996.

TAKAC T. The relationship of antioxidant enzymes and some physiological parameter in maize during chilling. *Plant soil and environment* 50: 27-32. 2004.

VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 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. 2003.