CARLA ZULIANI SANDRIN

**Variações na composição qualitativa e quantitativa de carboidratos
solúveis em plantas de *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* var. Lema sob
a influência de poluentes aéreos na cidade de São Paulo, SP**

São Paulo
2007

CARLA ZULIANI SANDRIN

Variações na composição qualitativa e quantitativa de carboidratos solúveis em plantas de *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* var. Lema sob a influência de poluentes aéreos na cidade de São Paulo, SP

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Ecologia de Ecossistemas Terrestres.

Orientador: Prof. Dr. Welington Braz de Carvalho Delitti

Co-orientadora: Dra. Marisa Domingos

São Paulo
2007

Sandrin, Carla Zuliani

Variações na composição qualitativa e quantitativa de carboidratos solúveis em plantas de *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* var. Lema sob a influência de poluentes aéreos na cidade de São Paulo, SP.

Número de páginas – 148

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Ecologia.

1. *Lolium multiflorum* 2. carboidratos
solúveis 3. poluição aérea

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Ecologia.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Welington B.C. Delitti

Orientador

*Este trabalho é dedicado à minha família:
aos meus pais maravilhosos, Cláudio e Clarice;
à minha querida irmã, Camila; aos meus
avós, Vó Maria e Vó Rosa; e ao meu
amado marido, Alexandre.*

Agradecimentos

A Deus pela força concedida.

Ao Prof. Wellington B. C. Delitti pela amizade e orientação.

À Dra Rita de Cássia Leone Figueiredo Ribeiro e à Dra Marisa Domingos pelo incentivo, amizade, carinho, confiança, oportunidades e, acima de tudo, pelos conhecimentos me proporcionados. Não tenho palavras para agradecer.

À minha família, em especial aos meus pais e ao meu marido, pela compreensão nos momentos de mal-humor, preocupação e cansaço. Obrigada pelo amor, paciência e incentivo.

À Dra Maria Ângela de Machado Carvalho pela amizade e pelas diversas sugestões que ajudaram a enriquecer este trabalho.

Às colegas Érika, Amanda, Gaya, Pinho, Maitê, Amandinha, Silvia Sant'Anna, Adriana, Patrícia Bulbovas e aos demais amigos pelos momentos de felicidade e companheirismo compartilhados dentro e fora do laboratório.

À Mirian por sua dedicada ajuda nas análises bioquímicas.

À Carla pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas e da Seção de Ecologia do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo auxílio e agradável convívio.

A todos os funcionários do IPEN que me auxiliaram nas análises de metais pesados.

À CAPES pela bolsa concedida durante parte do período de doutorado.

À Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), por fornecer os dados de qualidade do ar.

Ao Departamento de Controle do Espaço Aéreo (Congonhas) e ao Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo por fornecerem os dados climáticos.

Capítulo 1. INTRODUÇÃO GERAL, JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Introdução	01
Frutanos e suas relações com fatores ambientais	01
A poluição aérea	05
Poluição aérea como fator de estresse às plantas	08
Justificativas, hipóteses e objetivos	11
Referências bibliográficas	13

Capítulo 2. PARTIÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM TECIDOS VEGETATIVOS DE *Lolium multiflorum* LAM ssp. *italicum* cv. LEMA

Abstract	20
Resumo	20
Introdução	21
Material e métodos	23
1. Material vegetal	23
2. Análise dos carboidratos solúveis	26
Resultados e Discussão	27
Referências bibliográficas	34

Capítulo 3. CONTEÚDO E COMPOSIÇÃO DE CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS EM PLANTAS DE *Lolium multiflorum* LAM. ssp. *italicum* var. LEMA EXPOSTAS EM AMBIENTE URBANO SUBTROPICAL

Abstract	38
Resumo	38
Introdução	39
Material e métodos	43
1. Material vegetal	43
2. Locais de exposição	43
3. Análise preliminar	46
4. Análise sazonal	47
Resultados	48
1. Análise preliminar	48

2. Análise sazonal	53
a) Caracterização do ambiente nos locais de estudo	53
b) Carboidratos solúveis	55
c) Elementos químicos	62
d) Relações entre variáveis biológicas e ambientais	67
Discussão	74
Referências bibliográficas	80

Capítulo 4. VARIAÇÃO DIURNA NO ACÚMULO DE FRUTANOS EM PLANTAS DE *Lolium multiflorum* Lam ssp. *italicum* Beck var. Lema EXPOSTAS À POLUIÇÃO AÉREA URBANA DA CIDADE DE SÃO PAULO

Abstract	87
Resumo	87
Introdução	88
Material e Métodos	90
1. Delineamento experimental	90
Resultados	92
a) Caracterização do ambiente nos locais de estudo	92
b) Carboidratos solúveis	97
Parte aérea	97
Raízes	110
c) Elementos químicos	116
d) Relações entre variáveis biológicas e ambientais	119
Parte Aérea	119
Raiz	122
e) Crescimento	126
Discussão	129
Referências bibliográficas	136

Capítulo 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES GERAIS	140
Conclusões gerais	142
Abstract	143
Resumo	145
Anexo	147

Capítulo 1

Introdução geral, justificativas e objetivos

INTRODUÇÃO

Frutanos e suas relações com fatores ambientais

A fotossíntese é o processo pelo qual os produtores primários sintetizam, na presença de luz solar, compostos orgânicos a partir de matéria-prima inorgânica. Neste processo, ocorre a liberação de oxigênio e a redução do gás carbônico até carboidratos (Larcher, 2000). A produção de carboidratos durante a fotossíntese é controlada por vários fatores: (1) a resistência às trocas gasosas entre a atmosfera e as células do mesófilo, que determina o suprimento de dióxido de carbono para os tecidos assimilatórios; (2) a taxa de fixação de carbono, que é controlada pela atividade das enzimas primárias de fixação, a ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO) e/ou a fosfoenol piruvato carboxilase (PEPC), e o nível de substrato disponível para estas enzimas; (3) a taxa de regeneração das enzimas fixadoras de carbono, que é controlada pela capacidade de transporte de elétrons e, logo, dependente do suprimento de elétrons da fase fotoquímica nos cloroplastos (Farquhar & Sharkey, 1982).

Sob condições ambientais flutuantes, o processo de redução do carbono fotossintético é direcionado para otimizar a regeneração da ribulose bifosfato (RUBP) e a utilização do ATP e NADPH. Falhas neste processo não somente reduzem a taxa de fixação de carbono, mas também aumentam a probabilidade de danos fotoquímicos (Pollock *et al.*, 2003). O carbono fixado além do requerido para regenerar RUBP permanece disponível para a síntese de sacarose no citossol. Em folhas de muitas espécies, o aumento na concentração de sacarose está associado ao acúmulo de amido plastídico (Bender & Smith, 1973), enquanto em outras espécies, produtos de polimerização da sacarose, como os frutanos ou os oligossacarídeos da família da rafinose, são acumulados no vacúolo (Pollock *et al.*, 1999).

Os frutanos são polímeros de frutose derivados da sacarose e consistem em séries homólogas de oligo e polissacarídeos não redutores, cada um contendo um

resíduo a mais de frutose que o membro anterior da série (Figueiredo-Ribeiro, 1993). Segundo Hendry (1993), os frutanos estão amplamente distribuídos nos sistemas biológicos, sendo encontrados em fungos, bactérias, algas verdes, musgos, hepáticas e em 15% das angiospermas atuais. Neste último grupo, podem ser encontrados em muitas plantas de importância econômica, como cereais (trigo, aveia e cevada), hortaliças (cebola e alface), ornamentais (dália e tulipa) e gramíneas forrageiras de clima temperado (*Lolium* e *Festuca*) (Hendry & Wallace, 1993).

De acordo com o modelo proposto por Edelman & Jefford (1968), a síntese de frutanos inicia-se com a ação da enzima sacarose:sacarose frutossil transferase (SST), que transfere resíduos de frutose para uma molécula de sacarose, resultando no trissacarídeo 1-cestose. Neste estágio, a enzima frutano:frutano frutossil transferase (FFT) catalisa a transferência de resíduos de frutose, alongando a cadeia. Dependendo do trissacarídeo que dá origem à série homóloga, os frutanos podem ser classificados em: frutanos do tipo inulina, baseados na série da 1-cestose, nos quais os resíduos de frutose estão unidos por ligações β (2,1); frutanos do tipo levano, baseados na série da 6-cestose, e com ligações β (2,6) entre os resíduos de frutose; e frutanos do tipo das neoséries de inulina ou levano, baseados no trissacarídeo neo-cestose e que apresentam, respectivamente, os resíduos de frutose unidos à glicose da molécula da sacarose por ligações β (2,1) ou β (2,6) (Vijn & Smeekens, 1999). A figura 1 mostra a estrutura dos três principais trissacarídeos que podem dar origem às séries de frutanos em vegetais superiores.

Figura 1. Estrutura dos principais trissacarídeos que podem dar origem à série de frutanos.

Em gramíneas, predominam os frutanos do tipo levano, mas em espécies de *Lolium*, que acumulam frutanos de alto peso molecular, uma estrutura complexa formada pelas séries da inulina, das neoséries da inulina e das neoséries de levano pode ser encontrada (Cairns *et al.*, 1999). Nesse gênero, duas outras enzimas parecem estar relacionadas à síntese de frutanos, a glicose 6-frutosil transferase (6G-FT) e a sacarose:frutano 6-frutosil transferase (6-SFT) (Pavis *et al.*, 2001).

Os frutanos podem ser acumulados em qualquer região da planta (Pollock & Cairns, 1991), destacando-se os órgãos subterrâneos espessados das Asteraceae (Figueiredo-Ribeiro, 1993). Em gramíneas de clima temperado, no entanto, os frutanos são especialmente acumulados nas bainhas foliares, que podem comportar até 70% do total de frutanos da parte vegetativa (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001).

Em nível celular, os frutanos são armazenados nos vacúolos em forma solúvel ou em estado coloidal, podendo ser acumulados em altas concentrações, uma vez que são inócuos aos constituintes celulares (Smirnoff & Cumbes, 1989). Dessa forma, esses compostos são genericamente denominados de solutos compatíveis (Rathinasabapathi, 2000) e caracterizam-se por ser osmoticamente ativos, alterando facilmente o potencial osmótico por rápidas reações de polimerização ou despolimerização (Dietrich *et al.*, 1988). Devido a essas propriedades notáveis, os frutanos podem ser rapidamente mobilizados, diferentemente do amido, que é sólido (Edelman & Jefford, 1968).

Outros compostos também podem atuar como solutos compatíveis, destacando-se os aminoácidos, os compostos quaternários de amônia, as glicinabetaínas, os açúcares e os polióis (Bohnert & Shen, 1999; Rathinasabapathi, 2000).

Além de reserva de carbono e energia e de seu papel na osmorregulação, acredita-se que os frutanos atuem como crioprotetores, conferindo resistência ao frio (Pontis & Del Campillo, 1985). Ainda, por caracterizarem-se como solutos compatíveis, a literatura atribui a estes compostos as funções de proteção de enzimas e da estrutura da membrana e a estabilização de proteínas sob condições estressantes (Bohnert & Shen, 1999). De acordo com estes mesmos autores, por serem compostos tipicamente hidrofílicos, os solutos compatíveis poderiam agir de modo a substituírem a água na superfície de proteínas, complexos protéicos ou membranas celulares. Entretanto, o papel ecofisiológico desses compostos ainda não está completamente esclarecido.

Diversos estudos demonstram que o acúmulo de frutanos pode variar em relação às condições ambientais. Plantas submetidas à seca, por exemplo, tendem a acumular mais frutano em comparação às plantas mantidas hidratadas (Thomas & Evans, 1989;

Chaves, 1991). No outro extremo, sob condições de alagamento, que limitam a quantidade de oxigênio disponível, o acúmulo de frutanos também tende a aumentar (Albrecht *et al.*, 1997).

De acordo com muitos autores, a produção de frutanos pode estar relacionada com a tolerância de algumas espécies às baixas temperaturas (Eagles, 1967; Pollock *et al.*, 1989; Chatterton *et al.*, 1989). Nessas condições, os frutanos de baixo e médio peso molecular parecem ter papel preponderante (Suzuki, 1989).

O acúmulo de frutanos em plantas também pode variar com o fotoperíodo. Em raízes tuberosas de *Viguiera discolor*, Isejima *et al.* (1991) observaram que o acúmulo de frutanos foi maior sob condições de fotoperíodo curto, que induziam a floração. Da mesma forma, raízes tuberosas de *Dahlia* expostas a curtos fotoperíodos apresentaram um aumento de 156 % na concentração de frutano total (Legnani & Miller, 2001).

A escassez de nutrientes no solo é um fator limitante para muitas espécies. No cerrado, por exemplo, o crescimento da parte aérea de muitas herbáceas é reduzido, ao contrário do que ocorre com os órgãos subterrâneos, que são muito desenvolvidos e acumulam grandes quantidades de frutanos (Figueiredo-Ribeiro, 1993). Desse modo, alguns trabalhos relacionam a disponibilidade de nutrientes no solo com a capacidade de acúmulo dos polímeros de frutose. Em plantas de *Cichorium intybus* submetidas a nível deficiente de nitrogênio no solo, a atividade da enzima 1-SST, que sintetiza frutanos, foi maior, enquanto que nas plantas tratadas com abundância de nitrogênio, a atividade de hidrolase de frutano (1-FEH) aumentou (Van den Ende *et al.*, 1999). Da mesma forma, Cuzzuol *et al.* (2003) observaram que o teor de frutanos foi reduzido em plantas de *Vernonia herbacea* tratadas com crescentes concentrações de nitrogênio no solo. Entretanto, em outro trabalho com essa mesma espécie, a produção de frutanos não foi alterada após a aplicação em dose única de nitrogênio, fósforo e potássio (Carvalho *et al.*, 1998).

A poluição aérea

A emissão de poluentes no ar vem ocorrendo desde os primórdios da Terra, através de processos naturais como a decomposição da matéria orgânica, erupção de vulcões, ocorrência de incêndios e mineralizações, e fenômenos como tornados e furacões. Ainda hoje, as quantidades de poluentes liberadas por estas fontes raramente são suficientemente altas para provocar danos ao meio ambiente. Entretanto, as

atividades vulcânicas são relevantes quando intensas, liberando grandes quantidades de compostos contendo enxofre e de material particulado, incluindo metais (Freedman, 1995).

Em relação às fontes antropogênicas de poluição do ar, estas não apresentavam grande importância no início da civilização humana, contribuindo pouco com as emissões de poluentes para a atmosfera. Mais tarde, com o crescimento rápido da urbanização e o desenvolvimento acelerado da industrialização, as emissões antropogênicas passaram a favorecer significativamente o aumento de rejeitos atmosféricos, tendo seu auge durante a Revolução Industrial, com a queima intensa de combustíveis fósseis para a produção de energia. A partir desse momento, as fontes antrópicas de poluição do ar tornaram-se a principal fonte de poluentes atmosféricos, criando problemas sérios de poluição aérea e sendo uma causa efetiva de contaminação do meio ambiente (Freedman, 1995).

Paralelamente à industrialização e ao crescimento acelerado dos centros urbanos, criou-se uma demanda cada vez maior por transporte. Deste modo, surgiu na metade do século XX um tipo de poluição associado às emissões veiculares. Em Los Angeles, por exemplo, as emissões veiculares foram reconhecidas como poluentes potenciais desde 1915, mas somente a partir dos anos 50, foi admitido que tais emissões eram o principal agente da poluição urbana (Bourotte, 2002). Atualmente, os poluentes presentes na atmosfera da maioria dos países industrializados estão principalmente relacionados à grande emissão proveniente dos veículos automotores leves e pesados e, secundariamente, pelas emissões originadas em processos industriais. Exceção à regra é feita por alguns países asiáticos, como China e Índia, que apresentam como principal fonte de poluição atmosférica as termoeletricas, responsáveis por quase toda a produção de energia desses países (Guttikunda *et al.*, 2003).

Na atmosfera de regiões urbano-industriais, como a da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), uma grande variedade de poluentes pode ser encontrada. Esses poluentes podem ser classificados em relação a sua origem, estado físico e composição química. Quanto à origem, os poluentes aéreos distinguem-se em primários, que são aqueles emitidos diretamente pelas fontes poluidoras, e os secundários, que são aqueles formados a partir das interações entre os poluentes primários ou entre estes e os constituintes naturais da atmosfera. Em relação ao seu estado físico, os poluentes aéreos podem se apresentar sob a forma gasosa, como o monóxido de carbono (CO), os óxidos de nitrogênio e de enxofre (NO_x e SO_x), alguns hidrocarbonetos (HC), os fluoretos e o

ozônio (O_3); ou sob a forma sólida ou líquida como, por exemplo, poeiras, névoas, fumaça, fuligem e material particulado em suspensão (CETESB, 2003).

Os poluentes atmosféricos podem ser constituídos por espécies químicas orgânicas ou inorgânicas. As espécies orgânicas incluem uma vasta classe de compostos, como hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, aldeídos, cetonas, pesticidas e organoclorados, enquanto que as espécies inorgânicas de maior interesse são os ânions maiores (NO_3^- , NO_2^- , Cl^- e SO_4^{2-}), o amônio (NH_4^+), os cátions básicos (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e K^+) e os metais-traço, tais como: Cu, Zn, Mn, Pb, Al, Fe e Ni (Bourotte, 2002).

De acordo com as estimativas realizadas pela CETESB em 2003, as principais fontes de poluição são responsáveis pelas emissões para a atmosfera da Região Metropolitana de São Paulo, dos seguintes poluentes: 1,8 milhão de t/ano de monóxido de carbono (CO), 415 mil t/ano de hidrocarbonetos (HC), 409 mil t/ano de óxidos de nitrogênio (NO_x), 67 mil t/ano de material particulado total (MP) e 37 mil t/ano de óxidos de enxofre (SO_x). Desses totais, os veículos são responsáveis por 98% das emissões de CO, 97% de HC, 97% NO_x , 52% de MP e 55% de SO_x (CETESB, 2003).

A concentração dos poluentes no ar não é determinada apenas pela quantidade emitida, mas também por fatores meteorológicos e geográficos que contribuem ou não para a diluição e a dispersão dos poluentes na atmosfera urbana. Entre os fatores climáticos que mais influenciam esses processos, destacam-se a direção e a velocidade dos ventos, os fenômenos de turbulência e a estabilidade atmosférica. Em relação aos fatores geográficos, a topografia é o de maior importância (Mayer, 1999).

Uma vez que as condições meteorológicas podem favorecer a dispersão de poluentes atmosféricos, estes podem afetar não somente a qualidade do ar nos locais de emissão, mas também produzir efeitos que se manifestam a grandes distâncias e em longo prazo (Klumpp *et al.*, 1996). Na Região Metropolitana de São Paulo, por exemplo, de 20 a 30% de seus poluentes são provenientes de cidades do interior ou de outros estados. Entre fins de outubro e começo de novembro, cerca de 10% da poluição da metrópole é composta por resíduo de queimadas, principalmente de cana, feitas a até 300 Km de distância, nas regiões de Piracicaba ou de Ribeirão Preto. Do mesmo modo, as cinzas de queimadas no sul da Amazônia podem atingir a capital paulista e contribuir para a degradação da qualidade do ar neste local (Revista Pesquisa FAPESP, 2004).

Diante desse panorama, muitos países têm estabelecido valores limites (padrões de qualidade do ar) para os principais poluentes atmosféricos, ou seja, aqueles com maior frequência de ocorrência e com maior capacidade de causar efeitos adversos ao

meio ambiente. Entre as legislações mundiais mais importantes, destacam-se a da Comunidade Européia e a dos Estados Unidos, que serviram de modelo para outros países, incluindo o Brasil (Fenger, 1999).

No Brasil, a Resolução CONAMA n.º 03/90 estabelece dois tipos de padrões de qualidade do ar: os padrões primários, que representam as concentrações de poluentes que, se ultrapassadas, podem afetar a saúde da população; e os padrões secundários, que estabelecem as concentrações de poluentes atmosféricos abaixo das quais se prevê o mínimo efeito adverso sobre o bem estar da população, assim como o mínimo dano à fauna e à flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral (CETESB, 2003).

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) mantém no Estado de São Paulo, desde a década de 70, redes de monitoramento da qualidade do ar, que têm permitido a medição dos poluentes atmosféricos nas escalas local e regional. Embora alguns poluentes atmosféricos já se encontrem controlados como, por exemplo, o dióxido de enxofre, a grande parte ainda ultrapassa freqüentemente os padrões de qualidade do ar (CETESB, 2003). Desse modo, destaca-se a importância de estudos sobre a interferência da poluição atmosférica nos processos vitais dos diferentes organismos, incluindo a vegetação.

Poluição aérea como fator de estresse às plantas

A primeira via de contato entre a planta e o poluente gasoso são os órgãos assimilatórios, principalmente a folha. Nela, a entrada de poluentes é determinada por um gradiente de concentração entre os meios interno e externo, pela abertura e densidade dos estômatos presentes, e pela resistência do mesofilo foliar (Rennenberg *et al.*, 1996). Já a entrada de componentes tóxicos adsorvidos ao material particulado depositado sobre as folhas, como os metais pesados, é bastante lenta e ocorre por processos de troca iônica entre o material particulado e, especialmente, a cutícula, ou indiretamente através da absorção radicular a partir de partículas depositadas no solo (Streit & Stumm, 1993; Wagner, 1993).

Uma vez dentro da planta, os poluentes aéreos podem atingir moléculas celulares sensíveis como lipídios, ácidos nucléicos e proteínas (Bray *et al.*, 2000), ocasionando transtornos em vários níveis: desde efeitos nas populações, com a redução na densidade, na dominância absoluta, na riqueza e na diversidade (Pompéia, 1997), até efeitos fisiológicos, como mudanças na fotossíntese (Darrall, 1986; Aben *et al.*, 1990),

na condutância estomática (Robinson *et al.*, 1998), na assimilação de água e minerais (Mocquot *et al.*, 1996) e no carregamento do floema (Ho Teh & Swanson, 1982). Ainda, em nível bioquímico, os poluentes aéreos podem alterar os teores de clorofila e a estrutura da membrana plasmática (Darrall, 1989).

Já foi demonstrado, também, que poluentes aéreos podem interferir no metabolismo de carboidratos solúveis em plantas (Darrall, 1989), levando a mudanças tanto em sua composição (Samarakoon & Rauser, 1979) quanto em seu conteúdo (Coleman *et al.*, 1995; Peace *et al.*, 1995). Segundo Costa & Spitz (1997), o conteúdo de carboidratos solúveis aumentaram em plantas de *Lupinus albus* tratadas com até 0,1 µM de cádmio no solo, e diminuíram na presença de concentrações maiores desse metal. Do mesmo modo, os níveis de glicose, frutose e sacarose diminuíram em plantas de algodão fumigadas com ozônio. Já em feijão, dependendo do metal pesado adicionado ao solo, foi verificado o acúmulo de um carboidrato específico. Assim, com o excesso de níquel houve maior acúmulo de sacarose e açúcares redutores; com excesso de cobalto foi preferencial o acúmulo de amido e com excesso de zinco não houve alterações nas concentrações desses três carboidratos (Samarakoon & Rauser, 1979).

No entanto, nada ainda foi relatado em relação aos efeitos de poluentes atmosféricos sobre a composição e conteúdo de frutanos em plantas. Sabe-se apenas que quando presentes no solo, os metais pesados podem alterar os teores desses polímeros de frutose. Frossard *et al.* (1989) mostraram que o acúmulo de frutanos nas gramíneas *Lolium perenne* e *Lolium multiflorum* Lam var. *italicum* Beck cv. Lipo tendeu a aumentar paralelamente às concentrações crescentes de cádmio, cobre, zinco e níquel no solo.

Os efeitos dos poluentes atmosféricos nos organismos vivos dependem essencialmente da sua concentração e do tempo de exposição, podendo exposições prolongadas a baixas concentrações ser mais nocivas do que exposições de curta duração a concentrações elevadas. Existem ainda fatores de sensibilidade nos indivíduos que determinam a maior ou menor severidade dos efeitos, tais como idade, estado nutricional e predisposição genética (Darrall, 1989).

A agressividade dos poluentes aéreos sobre a vegetação pode ser consequência da formação de espécies reativas de oxigênio no interior dos tecidos vegetais, que podem danificar moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Gallego *et*

al., 1996; Bray *et al.*, 2000, Cuypers *et al.*, 2001; Di Cagno *et al.*, 2001). Após sua entrada na planta, o dióxido de enxofre, por exemplo, pode sofrer oxidação através de uma cadeia de reações e formar espécies como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Hippeli & Elstner, 1996). O ozônio, por sua vez, devido ao seu alto poder oxidativo, induz rapidamente à formação de diferentes espécies tóxicas de oxigênio, entre as quais o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e os radicais hidroxil ($\text{OH}^{\cdot}$) e peridroxil ($\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$) (Bray *et al.*, 2000). Entretanto, ressalta-se que o estresse por poluição apenas intensifica um processo natural de formação desses radicais tóxicos, que acontece durante reações de transferência de elétrons dentro da mitocôndria ou do cloroplasto, ao longo da respiração e da fotossíntese (Bray *et al.*, 2000).

A regulação da toxicidade das espécies reativas de oxigênio nas plantas ocorre por meio de um sistema de defesas antioxidativas, formado tanto por constituintes enzimáticos como por constituintes não enzimáticos. Entre esses principais compostos, destacam-se as enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalases e os metabólitos ascorbato, glutatona, α -tocoferol e os carotenóides (Foyer *et al.*, 1994).

O diagnóstico dos efeitos da poluição aérea na vegetação e o prognóstico de riscos ambientais podem ser feitos eficientemente através da quantificação de danos observados em plantas bioindicadoras, desde o nível celular até o de paisagem (Klump *et al.*, 1996). Mudanças na atividade dos constituintes pertencentes ao sistema de defesas antioxidativas nesses organismos são, também, respostas indicadoras eficientes da presença de poluentes na atmosfera (Fangmeier *et al.*, 1994).

São consideradas plantas bioindicadoras de poluição aérea aquelas capazes de apresentar respostas qualitativas e/ou quantitativas, conservativas, mensuráveis e dose-dependentes quando expostas àquela condição (Manning & Feder, 1980; Ellenberg *et al.*, 1991). A delimitação das respostas em nível de tecido ou de células, entre as quais os danos visíveis (cloroses e necroses) e as alterações químicas, fisiológicas, bioquímicas, histológicas e genéticas, é geralmente mais precisa do que as observadas em níveis de organização mais altos. Entre as plantas bioindicadoras de poluição atmosférica mais comumente utilizadas estão os líquens e as briófitas (Weinstein & Davison, 2003), que respondem à poluição aérea através do acúmulo de poluentes ou pela presença/ausência em locais poluídos (Garty, 2001).

As plantas superiores acumuladoras de elementos químicos presentes na atmosfera poluída são, também, interessantes para discriminar quantitativamente os diferentes tipos de poluentes aéreos, assim, como diferentes graus de contaminação

atmosférica em uma dada região. A variedade Lema da gramínea *C₃* de clima temperado *Lolium multiflorum* ssp. *italicum*, por apresentar a característica de acumular metais pesados, fluoretos e enxofre em suas folhas, quando se desenvolve na presença desses elementos químicos no ar, tem sido muito utilizada como bioacumuladora (Domingos *et al.*, 1998). A resposta bioindicadora adotada, nesse caso, é o acúmulo foliar desses elementos tóxicos. Porém, sabendo-se que tais elementos tóxicos, especialmente metais, podem eventualmente alterar os níveis de frutanos nessa espécie (Frossard *et al.*, 1989), alterações nos mesmos poderão vir a fornecer informações adicionais importantes para delimitar o nível de toxicidade de metais na atmosfera e, conseqüentemente, para indicação de riscos ambientais. No entanto, para que tais respostas metabólicas sejam adequadas para prever riscos ambientais, é preciso verificar antes se são conservativas, facilmente mensuráveis e dependentes do nível de acúmulo de determinados elementos químicos tóxicos.

JUSTIFICATIVAS, HIPÓTESES E OBJETIVOS

Em São Paulo, a poluição do ar apresenta aspectos sazonais marcantes causados pelas condições meteorológicas, que no inverno são desfavoráveis à dispersão dos poluentes. Por isso, neste período as concentrações de partículas inaláveis (PI) e de monóxido de carbono (CO) ultrapassam com muita frequência, não apenas os padrões nacionais de qualidade do ar, como também os níveis críticos de atenção, alerta e, às vezes, emergência, fazendo com que este período seja o de maior risco aos organismos vivos em geral (CETESB, 2003).

A concentração atmosférica de poluentes em São Paulo não varia somente pelos aspectos sazonais ao longo do ano, mas também por variações nas emissões horárias de poluentes, ao longo de um único dia, as quais também sofrem a influência das curtas variações nas condições climáticas. Em relação aos óxidos de nitrogênio, por exemplo, picos horários de concentrações atmosféricas geralmente acontecem entre 6 e 10 horas, quando o tráfego veicular é mais intenso e a atmosfera está mais estável (registros CETESB).

Do mesmo modo que a poluição aérea, os frutanos podem variar ao longo de um dia e ao longo das estações anuais, de acordo com as condições climáticas favoráveis ou não ao seu acúmulo. Assim, pode-se esperar que as reações metabólicas das plantas aos poluentes atmosféricos, especialmente aos gases de nitrogênio e de enxofre e aos metais

pesados, variem também em resposta às mudanças nos perfis de contaminação atmosférica. Considerando tais informações, no presente estudo foram testadas as hipóteses de que o conteúdo e a composição de frutanos na variedade Lema de *L. multiflorum*, acumuladora de enxofre e metais pesados, podem se alterar quando suas plantas crescem em ambiente contaminado por poluentes que contenham tais elementos e que essas mudanças tanto podem acontecer lentamente em resposta à absorção e ao acúmulo gradativos de elementos tóxicos oriundos da poluição atmosférica, como os metais pesados contidos no material particulado, quanto ao longo de um dia apenas, em resposta aos elementos tóxicos contidos nos poluentes gasosos, os quais são prontamente absorvidos pelas plantas via estômatos.

Assumindo-se que a poluição aérea urbana pode alterar o perfil qualitativo e quantitativo de frutanos, com possível redução da produção de biomassa pelas plantas, a eficiência bioacumuladora dessa variedade também pode vir a ser alterada. Assim, o presente trabalho teve como objetivos:

- Caracterizar quantitativamente e qualitativamente a partição de frutanos em cinco regiões distintas (lâmina em alongamento, lâmina expandida, porção superior do estolho, porção inferior do estolho e raízes) de plantas da variedade Lema de *Lolium multiflorum* cultivadas em Casa de Vegetação;
- Acompanhar as variações mensais na composição qualitativa e quantitativa de frutanos em plantas de *L. multiflorum* “Lema” expostas em local da cidade de São Paulo altamente poluído por óxidos de enxofre e de nitrogênio e por material particulado contendo metais pesados, por períodos consecutivos de 28 dias ao longo de um ano, comparando-as com as variações na composição de frutanos em plantas mantidas em ambiente com baixos níveis de poluição;
- Acompanhar as variações nos mesmos metabólitos ao longo de um dia, em plantas expostas por 2 meses em local da cidade de São Paulo altamente poluído por óxidos de enxofre e de nitrogênio e por material particulado contendo metais pesados, nas quatro estações do ano, comparando-as com as variações na composição de frutanos em plantas mantidas em ambiente com baixos níveis de poluição.
- Verificar se as variações sazonais e diurnas no conteúdo de frutanos são determinadas por acúmulos foliares de enxofre e metais pesados ou por variações nas concentrações de poluentes gasosos.

- Verificar a eficiência bioacumuladora da variedade “Lema” de *Lolium multiflorum* para a região tropical.

Para tanto, o trabalho foi dividido em três experimentos distintos, cujos resultados serão apresentados nos capítulos que se seguem.

No capítulo 2 será mostrada a partição de frutanos em plantas de *Lolium multiflorum* Lam ssp. *italicum* var. Lema crescidas em Casa de Vegetação, onde foi avaliado o conteúdo e a composição desses carboidratos em cinco partes distintas da planta.

O capítulo 3 mostrará a variação sazonal no acúmulo de frutanos em plantas de *Lolium multiflorum* expostas ou não à poluição aérea urbana da cidade de São Paulo, sendo discutido o efeito dos poluentes atmosféricos, especialmente dos metais pesados, no conteúdo e na composição de carboidratos não-estruturais na variedade em estudo.

No capítulo 4 serão mostradas as variações, ao longo de um dia, no acúmulo de frutanos em plantas de *Lolium multiflorum* var. Lema expostas ou não a locais poluídos da cidade de São Paulo.

Por último, no capítulo 5, será apresentada uma discussão geral sobre os resultados obtidos, destacando as principais conclusões do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEN, J.M.M.; JANSSEN-JURKUVICOVA, M.; ADEMA, E.H. Effects of low-level ozone exposure under ambient conditions on photosynthesis and stomatal control of *Vicia faba* L. **Plant Cell Environment**, v. 13, p. 463-469, 1990.
- ALBRECHT, G.; BIEMELT, S.; BAUMGARTNER, S. Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances. **New Phytologist**, v. 136, p. 137-144, 1997.
- BENDER, M.M.; SMITH, D. Classification of starch- and fructosan- accumulating grasses as C-3 or C-4 species by carbon isotope analysis. **J. Brit. Grassland Soc.**, v. 28, p. 97-100, 1973.
- BOHNERT, H.J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 237-260, 1999.
- BOUROTTE, C.L.M. **Caracterização de poluentes atmosféricos (metais traço e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) na interface atmosfera-solo em áreas**

- urbana e natural do Estado de São Paulo**, 2002. 251f. Tese (Doutorado em Geoquímica), Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B., GRUISSSEN, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1158 –1203.
- CAIRNS, A.J.; NASH, R.; CARVALHO, M.A.M.; SIMS, I.M. Characterization of the enzymatic polymerization of 2,6-linked fructan by leaf extracts from timothy grass (*Phleum pratense*). **New Phytologist**, v. 142, p. 79-91, 1999.
- CARVALHO, M.A.M.; PINTO, M.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, p. 275-280, 1998.
- CETESB. **Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo**. Série Relatórios, 2003.
- CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; BENNETT, J.H.; ASAY, K.H. Carbohydrate partitioning in 185 accessions of Gramineae grown under warm and cool temperatures. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 169-179, 1989.
- CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 1-16, 1991.
- COLEMAN, M.D.; DICKSON, R.E.; ISEBRANDS, J.G.; KARNOSKY, D.F. Carbon allocation and partitioning in aspen clones varying in sensitivity to tropospheric ozone. **Tree Physiology**, v.15, p. 593-604, 1995.
- COSTA, G.; SPITZ, E. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. **Plant Science**, v. 128, p. 131-140, 1997.
- CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 39, p. 657-664, 2001.
- CUZZUOL, G.R.F.; CARVALHO, M.A.M.; BARBEDO, C.J.; ZAIDAN, L.B.P. Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 81-91, 2003.

- DARRALL, N.M. The sensitivity of net photosynthesis in several plant species to short-term fumigation with sulphur dioxide. **Journal of Experimental Botany**, v. 37, p. 1313-1322, 1986.
- DARRALL, N. M. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 12, p. 1-30, 1989.
- DI CAGNO, R.; GUIDI, L.; DE GARA, L.; SOLDATINI, G.F. Combined cadmium and ozone treatments affect photosynthesis and ascorbate-dependent defences in sunflower. **New Phytologist**, v. 151, p. 627-636, 2001.
- DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; CHU, E.P.; BUCKERIDGE, M.S. O açúcar das plantas. **Ciência Hoje**, v. 7, p. 42-48, 1988.
- DOMINGOS, M.; KLUMPP, A.; KLUMPP, G. Air pollution impact on the Atlantic forest in the Cubatão region, SP, Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 50, p. 230-236, 1998.
- EAGLES, C.F. Variation in the soluble carbohydrate content of climate races of *Dactylis glomerata* (cocksfoot) at different temperatures. **Annals of Botany**, v. 31, p. 350-356, 1967.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytologist**, v. 67, p. 517-531, 1968.
- ELLENBERG, H. et al. **Biological monitoring**. Signals from the Environment. Eschborn: Vieweg, 1991.
- FANGMEIER, A., BRUNSCHÖN, S.; JÄGER, H.J. Time course of oxidant biomarkers in flag leaves of wheat exposed to ozone and drought stress. **The New Phytologist**, v. 126, p. 63-69, 1994.
- FARQUHAR, G. D.; SHARKEY, T. D. Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 33, p. 317-345, 1982.
- FENGER, J. Urban air quality. **Atmospheric Environment**, v. 33, p. 4877-4900, 1999.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, p. 203-208, 1993.
- FOYER, C.H., DESCOURVIÈRES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant Cell and Environment**, v. 17, p. 507-523, 1994.

- FREEDMAN, B. **Environmental ecology**. The ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses. 2.ed. San Diego: Academic Press Inc., 1995.
- FROSSARD, R.; STADELMANN, F.X.; NIEDERHAUSER, J. Effects of different heavy metals on fructan, sugar and starch content of ryegrass. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 180-185, 1989.
- GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, v. 121, p. 151-159, 1996.
- GARTY, J. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: Theory and application. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 20, p. 309-371, 2001.
- GUTTIKUNDA, S.K.; CARMICHAEL, G.R.; CALORI, G.; ECK, C.; WOO, J.H. The contribution of megacities to regional sulfur pollution in Asia. **Atmospheric Environment**, v. 37, p. 11-22, 2003.
- HENDRY, G.A.F. Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. **New Phytologist**, v. 106, p. 201-216, 1993.
- HENDRY, G.A.F.; WALLACE, R.K. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, J.N. (Eds). **Science and Technology of Fructans**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 119-139.
- HIPPELI, S.; ELSTNER, E.F. Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants. **Journal of Plant Physiology**, v. 148, p. 249-257, 1996.
- HO TEH, K.; SWANSON, C.A. Sulfur dioxide inhibition of translocation in bean plants. **Plant Physiology**, v. 69, p. 88-92, 1982.
- ISEJIMA, E.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; ZAIDAN, L.B.P. Fructan composition in adventitious tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by daylength. **New Phytologist**, v. 119. p. 149-154, 1991.
- KLUMPP, A.; KLUMPP, G.; DOMINGOS, M. Bio-indication of air pollution in the tropics. **Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft**, v. 56, p. 27-31, 1996.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMA Artes e Textos, 2000. 531p.
- LEGNANI, G.; MILLER, W.B. Short photoperiods induce fructan accumulation and tuberous root development in *Dahlia* seedlings. **New Phytologist**, v. 149, p. 449-454, 2001.

- MAYER, H. Air pollution in cities. **Atmospheric Environment**, v. 33, p. 4029-4037, 1999.
- MANNING, W.J.; FEDER, W.A. **Biomonitoring air pollutants with plants**. London: Applied Science Publishers LTD, 1980.
- MOCQUOT, B.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H.; MENCH, M. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. **Plant and Soil**, v. 182, p. 287-300, 1996.
- MORVAN-BERTRAND, A.; BOUCAUD, J.; LE SAOS, J.; PRUD'HOMME, M.P. Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne* L. **Planta**, v. 213, p. 109-120, 2001.
- PAVIS, N.; CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; BAUMGARTNER, S.; PRAZNIK, W.; BOUCAUD, J.; PRUD'HOMME, M.P. Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. **New Phytologist**, v. 150, p. 83-95, 2001.
- PEACE, E.A.; LEA, P.J.; DARRALL, N.M. The effect of open-air fumigation with SO₂ and O₃ on carbohydrate metabolism in Scots pine (*Pinus sylvestris*) and Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Cell and Environment**, v. 18, p. 277-283, 1995.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J.; COLLIS, B.E.; WALKER, R.P. Direct effects of low temperature upon components of fructan metabolism in leaves of *Lolium temulentum* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 203-208, 1989.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J. Fructan metabolism in grasses and cereals. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 77-101, 1991.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J.; GALLAGHER, J.; CARVALHO, M.A.M.; KOCHHAR, A. The metabolism of sugars based upon sucrose. In: BRYANT, J.A.; BURRELL, M.M.; KRUGER, N.J. (Eds). **Plant carbohydrate biochemistry**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1999. p. 47-60.
- POLLOCK, C.; FARRAR, J.; TOMOS, D.; GALLAGHER, J.; LU, C.; KOROLEVA, O. Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 489-494, 2003.
- POMPÉIA, S.L. **Sucessão secundária da Mata Atlântica em áreas afetadas pela poluição atmosférica de Cubatão, SP**. 1997. 193f. Tese (Doutorado em Botânica), Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- PONTIS, H.G.; DEL CAMPILLO. Fructan. In: DEY, P.M (Eds). **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London: Academic Press, 1985. p. 205-227.
- RATHINASABAPATHI, B. Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. **Annals of Botany**, v. 86, p. 709-716, 2000.
- RENNENBERG, H.; HERSCHBACH, C.; POLLE, A. Consequences of air pollution on shoot-root interactions. **Journal of Plant Physiology**, v. 148, p. 296-301, 1996.
- REVISTA PESQUISA FAPESP. Estufa que exporta poluição. Especial São Paulo 450 anos, p.12-19, 2004.
- ROBINSON, M.F.; HEATH, J.; MANSFIELD, T.A. Disturbances in stomatal behaviour caused by air pollutants. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 461-469, 1998.
- SAMARAKOON, A.B.; RAUSER, W.E. Carbohydrate levels and photoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc. **Plant Physiology**, v. 63, p. 1165-1169, 1979.
- SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.
- STREIT, B.; STUMM, W. Chemical properties of metals and the process of bioaccumulation in terrestrial plants. In: MARKERT, B. (Eds). **Plants as biomonitors**. Indicators for heavy metals in the Terrestrial Environment. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1993. p. 2-27.
- SUZUKI, M. Fructans in forage grasses with varying degrees of coldhardiness. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 224-231, 1989.
- THOMAS, H.; EVANS, C. Effects of divergent selection for osmotic adjustment on water relations and growth of plants of *Lolium perenne* L. **Annals of Botany**, v. 64, p. 581-587, 1989.
- VAN DEN ENDE, W.; ROOVER, J.D.; LAERE, A.V. Effect of nitrogen concentration on fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 2-8, 1999.
- VIJN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology**, v. 120, p. 351-359, 1999.
- WAGNER, G. Large-scale screening of heavy metals burdens in higher plants. In: MARKERT, B. (Eds). **Plants as biomonitors**. Indicators for heavy metals in the Terrestrial Environment. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1993. p. 425-434.

WEINSTEIN, L.H.; DAVISON, A.W. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution**, v. 125, p. 3-11, 2003.

Capítulo 2

Partição de carboidratos solúveis em tecidos vegetativos de *Lolium multiflorum*

Lam. ssp. italicum cv. Lema.

Resultados publicados no artigo Partitioning of water soluble carbohydrates in vegetative tissues of *Lolium multiflorum* Lam. ssp. italicum cv. Lema. Sandrin, C.Z., Domingos, M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. Brazilian Journal of Plant Physiology 18(2): 299-305, 2006 (anexo).

Abstract: Partitioning of water soluble carbohydrates in vegetative tissues of *Lolium multiflorum* Lam. ssp. italicum cv. Lema. In temperate grasses, fructans are the major storage polysaccharides, being accumulated mainly in mature leaf sheaths, and also in the roots. The partitioning of carbohydrates within different organs regulates plant growth and development. The aim of the present work was to analyze the partitioning of water soluble carbohydrates in five different parts (elongating leaf blades, expanded leaf blades, upper and lower segments of the stubble, and roots) of plants of *L. multiflorum* cv. Lema, contributing to an understanding of soluble carbohydrates distribution in these plants. Soluble carbohydrates and total fructose were analyzed in plants cultivated during 4 months in a glasshouse, by colorimetric, TLC and HPAEC-PAD techniques. Results showed that the greatest portion of total soluble carbohydrates was constituted by free and combined fructose, in all parts of the plants. The stubble contained the highest level of carbohydrates, followed by the elongating leaf blades, expanded leaf blades and roots. The leaf sheaths were not analyzed separately from the stubble, explaining the high levels of carbohydrates found in this part of the plant. The high metabolism of the elongating leaf blades, when compared to that of the expanded leaf blades, could explain the increased amounts of fructans stored in those tissues. Analysis by HPAEC-PAD showed that the elongating leaf blades and the roots had the highest proportions of low molecular weight fructans, which could be readily mobilized, supplying the demand of growing tissues in other organs.

Key-words: Fructan, grass, Italian ryegrass, sugars.

Resumo: Partição de carboidratos solúveis em tecidos vegetativos de *Lolium multiflorum* Lam. ssp. italicum cv. Lema. Em gramíneas de clima temperado, os frutanos são os polissacarídeos de reserva mais abundantes, sendo estocados principalmente nas bainhas de folhas maduras e também nas raízes. A partição de carboidratos entre os diferentes órgãos da planta regula seu crescimento e seu desenvolvimento. Visto que a partição de carboidratos solúveis ainda é desconhecida em *Lolium multiflorum* cv. Lema, o objetivo do presente trabalho foi verificar a partição de carboidratos solúveis em cinco partes distintas (lâminas em alongamento, lâminas totalmente expandidas, segmentos superior e inferior do estolho e raízes) de plantas dessa espécie. Para isso, os carboidratos solúveis totais e a frutose total foram quantificados em plantas cultivadas durante quatro meses em Casa de Vegetação, por métodos colorimétricos e por TLC e HPAEC-PAD. Os resultados mostraram que grande parte da fração dos carboidratos solúveis totais foi constituída por frutose, na forma livre e combinada, em todas as partes da planta. O estolho continha os maiores níveis de carboidratos, seguido pelas lâminas em alongamento, lâminas expandidas e

raiz. No presente estudo, as bainhas foliares não foram diferenciadas do estolho, explicando os altos teores de carboidratos solúveis encontrados nessa porção das plantas. O alto metabolismo das lâminas em alongamento, quando comparadas com as lâminas expandidas, poderia explicar o maior acúmulo de frutanos. A análise por HPAEC-PAD mostrou que as lâminas em alongamento e as raízes apresentaram as maiores proporções de frutanos de baixo peso molecular, que podem ser mobilizados prontamente, atendendo à demanda de outros órgãos da planta.

Palavras-chave: Açúcares, azevém, frutanos, gramíneas.

INTRODUÇÃO

Após a fixação do carbono pela fotossíntese, os carboidratos têm de ser distribuídos por toda a planta para o suprimento das necessidades de desenvolvimento. Essa distribuição é controlada pela demanda (manutenção, crescimento e estoque) e por mecanismos de regulação, alguns dos quais envolvem a ação de hormônios vegetais (Larcher, 2000).

A sacarose é o principal carboidrato translocável das plantas, podendo ser armazenada nos vacúolos celulares até o momento de ser metabolizada (Farrar *et al.*, 2000). Neste compartimento celular, a sacarose pode ser transformada, dependendo da espécie, em outros carboidratos, como o amido e os frutanos (Dietrich *et al.*, 1988).

Em gramíneas de clima temperado, como aquelas do gênero *Lolium*, os frutanos são os polissacarídeos de reserva mais abundantes (Volenec, 1986), sendo estocados principalmente nas bainhas de folhas maduras, e também nas raízes (Guerrand *et al.*, 1996). Nessas espécies, a habilidade de tolerar as condições ambientais estressantes depende da capacidade de acumularem esses polímeros de frutose e de transportá-los para os tecidos em crescimento (Davies, 1988). Em plantas de *Lolium multiflorum* submetidas à desfoliação, por exemplo, a partição de assimilados foi distribuída entre as demandas dos folíolos e das sementes em desenvolvimento (Griffith, 1992).

Segundo Pollock *et al.* (2003), o metabolismo de carboidratos pode variar tanto entre as estações do ano quanto entre as diferentes partes da planta. No primeiro caso, foi observado que os frutanos são rapidamente mobilizados durante a primavera, permitindo o crescimento e a diferenciação dos órgãos assimilatórios, assim como o desenvolvimento das sementes (Roth *et al.*, 1997). Já em relação à distribuição na planta, tem sido observado que em algumas espécies cultivadas, as folhas mais próximas ao solo abastecem o sistema radicular e as mais próximas ao ápice suprem os

meristemas da parte aérea e, sobretudo, as flores e os frutos em amadurecimento (Larcher, 2000).

Jelling & Leech (1982) observaram diferenças na distribuição dos carboidratos solúveis entre as células de folhas de trigo, demonstrando que, do total de células, apenas 55% eram células fotossintetizantes do mesofilo, sendo a maior parte dos demais tipos celulares heterotróficos. Com base nestas e em outras observações, Pollock *et al.* (2003) sugeriram um modelo para a partição de carboidratos em folhas de gramíneas C₃ de clima temperado. De acordo com este modelo, em células heterotróficas, como as da epiderme, que são drenos terminais, a sacarose seria catabolizada para suprir a demanda metabólica e gerar um gradiente de açúcar independente do fluxo de carboidratos no floema; em células autotróficas, através da síntese de frutanos, as concentrações de sacarose seriam mantidas abaixo do nível que poderia inibir a fotossíntese e, por último, em células envolvidas no transporte a longa distância, um gradiente de sacarose seria mantido entre o mesofilo e os vasos, podendo ocorrer síntese de frutanos quando o suprimento excedesse a demanda por carbono. Entretanto, os mecanismos que levam à partição de carboidratos nos diferentes tecidos da planta ainda não estão completamente conhecidos.

Nos últimos anos, a partição de fotoassimilados na planta vem despertando o interesse de muitos agricultores, que estão à procura de técnicas de melhoramento capazes de favorecer o vigor de sementes e grãos de interesse econômico. De acordo com alguns estudos, respostas positivas quanto a esse aspecto já estão sendo adquiridas em algumas espécies. Em milho, por exemplo, foi possível um aumento na massa dos grãos de 24 para 47% em relação à biomassa total da planta (Zelitch, 1975). Do mesmo modo, em trigo e cevada, uma contribuição de 20 a 30% foi alcançada no peso final dos grãos maduros (Schnyder, 1993).

Com o objetivo de conhecer como ocorre a partição de carboidratos solúveis, entre os quais os frutanos, nos diferentes órgãos de plantas da variedade Lema de *Lolium multiflorum*, procurou-se, nesta primeira etapa do trabalho, determinar a partição desses compostos em cinco partes distintas (lâmina em alongamento, lâmina expandida, porção superior do estolho, porção inferior do estolho e raízes) de plantas cultivadas em Casa de Vegetação e isentas de poluentes aéreos. Uma vez obtida tal caracterização, ainda desconhecida para a variedade em questão, será possível delimitar melhor as interferências dos poluentes atmosféricos nesse processo metabólico.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

No inverno de 2002, sementes de *Lolium multiflorum* Lam. ssp. *italicum* Beck var. Lema, procedentes da Universidade de Hohenheim (Alemanha), foram germinadas em cinco vasos de plástico (1L) utilizando como substrato o composto comercial Plantmax (marca Eucatex) e vermiculita, na proporção de 3:1, respectivamente. As plantas foram mantidas em Casa de Vegetação climatizada e com ar filtrado no Instituto de Botânica de São Paulo, em condições de baixo nível de poluentes gasosos e particulados para que nenhuma interferência destes elementos tóxicos ocorresse no metabolismo de frutanos. O ar condicionado manteve as condições climáticas da Casa de Vegetação similares à da cidade de São Paulo. Os valores médios de temperatura e umidade durante o período de cultivo foram de 21,5 °C (17,5 °C a 26,3 °C) e 66,7% (55,7% a 80%), respectivamente, e de irradiância foi de 472 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ (74 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ a 816 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$).

Durante o cultivo, foi utilizado um sistema semi-automático de irrigação, adaptado daquele proposto por Arndt & Schweizer (1991). Os vasos de plástico, equipados com cordões de náilon, foram colocados sobre uma grade de metal recoberta por saco plástico preto, a fim de evitar o crescimento de algas, a qual foi apoiada em caixa plástica contendo cerca de 60 litros de água deionizada, onde os cordões ficaram mergulhados para um contínuo suprimento hídrico por capilaridade. A água deionizada foi utilizada para evitar qualquer tipo de contaminação com elementos químicos que pudessem alterar a composição de carboidratos solúveis nas plantas. No início, a cultura de *Lolium* foi coberta com plástico transparente até a germinação das sementes e surgimento das primeiras folhas, sendo então, retirado. As folhas eram excisadas periodicamente, durante seis semanas, a uma altura de 4 cm acima da superfície do substrato, estimulando, assim, sua rebrotação e crescimento contínuos. Após cada excisão, as plantas receberam solução nutritiva contendo apenas macronutrientes (40 ml/litro de substrato), conforme recomendações de Epstein (1975). A partir da sétima semana de cultivo, a adubação das plantas e as excisões foliares foram interrompidas.

Ao completarem 4 meses de idade, as plantas de *Lolium multiflorum* foram levadas ao laboratório para sua individualização, dentro de cada vaso. Após esta etapa, as mesmas foram seccionadas em cinco regiões distintas (figura 2), e as partes

correspondentes foram unidas, até a obtenção de 2 g de massa fresca de material vegetal, para posterior análise dos carboidratos solúveis totais. Ao todo, foram obtidas cinco amostras mistas de cada parte da planta, cada uma proveniente de um vaso.

Figura 2. Representação esquemática de uma planta de *Lolium multiflorum* com a indicação das cinco partes selecionadas para avaliação da partição dos carboidratos solúveis na espécie. **LA** = lâmina em alongamento; **LE** = lâmina totalmente expandida; **ES** = porção superior do estolho; **EI** = porção inferior do estolho; **R** = raiz. Barra = 1cm.

2. Análise dos carboidratos solúveis

A fração de carboidratos solúveis dos tecidos frescos de *Lolium multiflorum* foi extraída em solução hidro-alcoólica, conforme metodologia adaptada de Pollock & Jones (1979). Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório até pequeno volume e quantificados quanto à frutose total (frutose livre + frutanos) e açúcar total (ou carboidratos solúveis totais = glicose + frutose + sacarose + frutanos), pelos métodos da antrona (Jermyn, 1956) e do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), respectivamente. Em seguida, os extratos foram clareados com 10% de polivinil-polipirrolidona (PVPP) por uma noite (Pavis *et al.*, 2001a) e purificados em colunas de troca iônica, utilizando-se resinas aniônica e catiônica Dowex e coluna C18 da Waters (USA), para neutralização e retirada de compostos hidrofóbicos. Este procedimento foi necessário para posterior realização das análises qualitativas da composição de carboidratos solúveis de *L. multiflorum*.

Parte das amostras purificadas foi submetida à cromatografia aniônica de alto desempenho (HPAEC), em cromatógrafo DIONEX, modelo DX 300, com detector amperométrico pulsado (PAD). Os frutanos foram analisados em coluna Carbo-Pac PA 1, utilizando-se um gradiente linear de 2,5 mM/m³ a 50 mM/m³ de acetato de sódio em 15 mM/m³ de hidróxido de sódio, com fluxo de 1 cm³/min (Itaya *et al.*, 1997).

Os carboidratos solúveis totais, incluindo os frutanos, também foram analisados quanto à composição através de cromatografia em camada delgada, em placas de sílica gel pré-fabricadas da Schleicher & Schuell (F1500). As placas contendo alíquotas dos extratos de carboidratos solúveis totais (50-100 µg) foram colocadas em cuba cromatográfica com cerca de 100 ml do sistema de solventes 1-butanol: 2-propanol: água na proporção de 3:12:4 (v/v), respectivamente (Kanaya *et al.*, 1978). A revelação das placas para frutose na forma livre e combinada (frutanos) foi realizada através de nebulização com reagente de uréia e ácido orto-fosfórico, seguida do aquecimento em estufa a 150 °C por 5 min (Wise *et al.*, 1955). Extrato de tubérculos de *Helianthus tuberosus* (espécie acumuladora de frutanos do tipo inulina) foi usado como material de referência para a identificação dos frutanos.

Diferenças na concentração de frutose e açúcar total entre as diferentes partes da planta de *L. multiflorum* foram identificadas por meio de análises de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Student Newman Keuls.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior fração (de 89,6% a 96,2%) de carboidratos solúveis em todas as partes da planta de *Lolium multiflorum* foi composta por polímeros de frutose (Figura 3), confirmando informações preliminares de que os frutanos são os principais carboidratos de reserva nesta gramínea de clima temperado (Souza *et al.*, 2005), mesmo quando cultivada em casa de vegetação sob condições ambientais subtropicais.

Figura 3. Conteúdos de (□) açúcar total (mg/gMS) e de (■) frutose total (mg/gMS) em cinco partes distintas das plantas de *Lolium multiflorum* crescidas por quatro meses em Casa de Vegetação: **LA** = lâminas em alongamento; **LE** = lâminas totalmente expandidas; **ES** = porção superior do caule (estolho); **EI** = porção inferior do caule (estolho) e **R** = raiz. Letras comparam médias entre açúcar total ou frutose total nas diferentes partes da planta. Os valores indicados com a mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Barras indicam o erro padrão.

Em gramíneas de clima temperado, os frutanos são acumulados especialmente nas bainhas foliares e nas bases de folhas em alongamento. Em *Lolium perenne*, por exemplo, 64% do total de frutanos são estocados nas bainhas foliares e 36% nas bases de folhas em alongamento (Morvan *et al.*, 1997). Desse modo, tem sido sugerido que as bainhas funcionariam como via de passagem de carboidratos entre as lâminas foliares e outras partes da planta (Borland & Farrar, 1988). Porém, em condições que favorecem o acúmulo de frutanos, as bainhas foliares poderiam ser consideradas metabolicamente como um reservatório temporário de carboidratos não-estruturais e não como um órgão de reserva *per se* (Housley & Volenec, 1988).

Ao contrário da maioria dos estudos, a distinção entre bainha foliar e base foliar em alongamento não foi realizada no presente trabalho, sendo ambas consideradas como parte de uma única estrutura, o estolho (incluindo o caule). Desse modo, era de se esperar que os maiores níveis de carboidratos solúveis totais fossem encontrados nessa região, o que de fato ocorreu. Ambas as porções do estolho (superior e inferior) apresentaram um acúmulo de frutose cerca de três vezes maior do que as folhas (Figura 3). Griffith (1992) também verificou altos níveis de carboidratos solúveis no caule de plantas de *Lolium multiflorum* Lam. var. Marshall logo após a antese, nos estágios iniciais de desenvolvimento das sementes. De acordo com este autor, sob condições que reduzem a capacidade fotossintética, o caule funcionaria como uma importante via de partição de assimilados. No presente estudo, condições de alta umidade, intensidade luminosa e fertilização, como as verificadas na casa de vegetação, favoreceram a produção de assimilados e o crescimento de novos ramos (dados não mostrados), os quais são normalmente considerados fortes drenos de assimilados (Griffith, 1992). Ainda, Pollock & Jones (1979) observaram em caules de diferentes variedades de gramíneas (*Lolium perenne*, *Festuca pratensis* e *Phleum pratense*) que os inter-nós inferiores acumulavam a maior proporção de frutanos durante a antese.

No presente trabalho, nenhuma diferença significativa foi encontrada na concentração de polímeros de frutose entre ambas as porções do estolho de *L. multiflorum* cv. Lema, considerando que o estolho também incluiu as bases foliares de folhas totalmente expandidas e todo ou parte do segmento basal de folhas em alongamento. Isto destaca a importância desses tecidos como reservatórios de longo prazo de frutanos (em tecidos maduros) e de curto prazo (nas zonas de extensão de folhas em crescimento), permitindo a rebrotação quando a demanda exceder a produção

de fotoassimilados, como observado em caules por Pollock & Jones (1979) e Housley & Volenec (1988), em outras gramíneas forrageiras.

A análise de carboidratos entre as folhas de *Lolium multiflorum* não mostrou diferença significativa no conteúdo de frutose total nas lâminas foliares em alongamento, em comparação com as lâminas foliares expandidas (Figura 3). Já os resultados observados em *L. perenne* por Guerrand *et al.* (1996) e Morvan-Bertrand *et al.* (1999) mostraram maior acúmulo de frutanos em folhas em alongamento, sugerindo que esses polímeros de frutose desempenham funções como a de fornecer energia, descarregar a sacarose do floema e regular o potencial osmótico das células (Volenec, 1986; Cairns *et al.*, 1991). Estes autores consideraram em suas análises toda a folha expandida e não somente a lâmina foliar, como realizado no presente estudo. Neste, o estolho incluiu tanto a zona de alongamento como a zona de maturação de folhas em expansão, que poderiam agir como fortes drenos de fotossintatos, competindo com força similar de dreno por carboidratos das lâminas foliares totalmente expandidas ou das lâminas foliares em alongamento (Allard & Nelson, 1991). Logo, em condições de acúmulo de carboidratos, as lâminas foliares em alongamento translocariam o carbono fixado para a zona de maturação, reduzindo a necessidade de utilizar os frutanos como fonte de carbono para a síntese e crescimento celular nesta zona.

Por outro lado, tem sido sugerido que o acúmulo de frutanos em folhas expandidas apenas ocorre quando a capacidade de acúmulo das bainhas foliares é reduzida (Guerrand *et al.*, 1996). De acordo com Humphreys *et al.* (2006) este processo pode também ser influenciado por uma variedade de fatores ambientais, incluindo irradiância, temperatura, disponibilidade de água, etc. Além disso, Guerrand *et al.* (1996) encontraram maior atividade da enzima 1-SST (que inicia a síntese de frutanos) em folhas em alongamento e menor em lâminas foliares totalmente expandidas.

Raízes de *L. multiflorum* (Figura 3) apresentaram um acúmulo de açúcar total dez vezes menor do que aquele encontrado no estolho, conforme também observado por McGrath (1988). Este autor verificou que raízes de gramíneas perenes possuíam, geralmente, apenas de 5 a 10% do total de frutanos. No presente trabalho, os resultados sugerem que as condições para crescimento na Casa de Vegetação poderiam ter promovido o desenvolvimento das partes aéreas das plantas, diminuindo o acúmulo de frutanos nos órgãos subterrâneos. Além disso, o acúmulo de carboidratos nas bainhas das plantas de *L. multiflorum* parece ser mais importante para o desenvolvimento das plantas do que aquele das raízes.

A análise qualitativa por TLC evidenciou a presença de monossacarídeos e de sacarose em todas as partes da planta, com menores proporções desses açúcares nos extratos de lâminas foliares. Frutanos de alta massa molecular presentes em todas as amostras ficaram retidos na origem dos cromatogramas, como pode ser observado na figura 4. Polímeros de frutose de tamanhos variados foram observados principalmente no extrato da raiz de *L. multiflorum*, que apresentou as maiores proporções de 1-cestose e nistose, além de frutanos com grau de polimerização (GP) igual ou superior a cinco. Do mesmo modo, Pavis *et al.* (2001a) encontraram os maiores níveis de frutanos de baixo peso molecular em raízes de *L. perenne*, quando comparadas com outras partes da planta.

Variações consideráveis na proporção individual dos diferentes componentes dos frutanos têm sido relatadas para diferentes tecidos de uma mesma planta. A bainha foliar mais externa de festuca, por exemplo, apresentou significativamente mais frutanos com GP>6 e significativamente menos frutanos com GP 3-6 do que as folhas expandidas da planta (Housley & Volenec, 1988). No presente trabalho, as análises por HPLC mostraram maiores proporções de frutanos de baixo GP, eluídos de 5 a 10 minutos, em todas as partes das plantas de *L. multiflorum*, mas especialmente nas raízes (Figura 5). As proporções de frutanos de baixo e alto grau de polimerização foram semelhantes em ambas as porções analisadas do estolho, conforme também observado para outras quatro variedades de gramíneas (Pollock & Jones, 1979). Isto significa que o conteúdo total de frutanos desses tecidos pode incluir tanto polímeros armazenados por longos períodos nos tecidos maduros, como frutanos acumulados temporariamente nas zonas de extensão de folhas em crescimento, conforme previamente discutido. No entanto, altas proporções de frutanos de todos os tamanhos moleculares foram encontradas em segmentos basais do caule de *L. perenne* (Pavis *et al.*, 2001b). Sheen (1994) sugeriu que quando o excesso de carbono fixado era armazenado primeiramente nas bases foliares e depois nas lâminas e bainhas foliares (ou estolho) poderia favorecer a regulação da fotossíntese, evitando sua inibição por um mecanismo de “feedback”.

Figura 4. Cromatografia em camada delgada (TLC) dos carboidratos solúveis de cinco partes distintas das plantas de *Lolium multiflorum*: **R** = raiz; **LA** = lâminas em alongamento; **LE** = lâminas totalmente expandidas; **ES** = porção superior do estolho e **EI** = porção inferior do estolho. **Ht** = padrão de *Helianthus tuberosus*; **F** = frutose; **S** = sacarose; **1C** = 1-cestose; **N** = nistose; **GP 5** = fruto-oligossacarídeos com grau de polimerização 5. Análises realizadas em plantas crescidas por quatro meses em Casa de Vegetação. Amostras equivalentes a 80 µg de frutose.

Figura 5. Análise por HPAEC/PAD em Coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros de cinco partes distintas das plantas de *Lolium multiflorum*: **A** = lâminas em alongamento; **B** = lâminas expandidas; **C** = porção superior do estolho; **D** = porção inferior do estolho e **E** = raiz. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos. Amostras contendo 800 µg frutose/ml.

Em relação às folhas, a figura 5 mostra maiores proporções de frutanos de baixo peso molecular nas lâminas foliares em alongamento do que nas lâminas totalmente expandidas, confirmando os dados quantitativos. Tendências similares foram verificadas por Guerrand *et al.* (1996) e Pavis *et al.* (2001b) em plantas de *L. perenne* e poderiam estar relacionadas com a alta demanda por energia das folhas expandidas. De acordo com os primeiros autores, frutanos de baixo peso molecular poderiam facilitar a rápida mobilização destes compostos pela planta, especialmente durante a rebrotação. Além disso, por conterem células mais velhas, as folhas expandidas estavam provavelmente senescendo e, logo, menos ativas em termos de fixação de carbono (Pavis *et al.*, 2001b), apresentando menores proporções de frutanos de baixo GP. As consideráveis proporções de frutanos de alto peso molecular em lâminas de folhas maduras, em comparação com as lâminas de folhas em alongamento (Figuras 5A e 5B) é consistente com a função de reserva de carboidratos de longo prazo.

Conteúdos elevados de carboidratos solúveis nos tecidos vegetativos, como mostrado por plantas de *L. multiflorum*, é um aspecto importante em se tratando de nutrição animal, uma vez que esta gramínea é muito usada para forragem. No Brasil, o azevém (*L. multiflorum*) pode representar mais de 80% da composição das pastagens durante a estação de inverno em campos do Estado do Rio Grande do Sul (Marchezan *et al.* 2002). Carboidratos de reserva, tanto na forma de açúcar livre como combinado, fornecem energia metabólica e são fontes de esqueletos de carbono para a biossíntese nos animais (Humphreys *et al.*, 2006). Ainda, a sacarose e os frutanos constituem a fração de carboidrato fermentável (70-80% do total) mais importante em tecidos vegetativos (Pollock & Cairns, 1991; Cairns *et al.*, 2002). Durante o pastoreio, as folhas são as principais partes da planta removidas pelos animais, enquanto o estolho (incluindo o caule) e as raízes permanecem no solo e contribuem com suas reservas de carboidratos solúveis para o crescimento de novos ramos e também para manter a capacidade fotossintética dessas plantas (Fulkerson & Donaghy, 2001).

Considerando o fato de que as folhas de gramíneas forrageiras constituem o principal componente da alimentação do gado e que os maiores conteúdos de carboidratos estavam presentes no estolho, seguido pelas lâminas foliares em alongamento, lâminas foliares expandidas e raízes, é plausível supor, do ponto de vista qualitativo e quantitativo, que o gado recebe uma fonte de energia potencialmente menor quando come folhas. Estes dados estão de acordo com aqueles observados em *L. perenne* por Guerrand *et al.* (1996) e Pavis *et al.* (2001b), que encontraram maior

acúmulo de frutanos em bainhas, seguido por folhas expandidas e finalmente em lâminas, e altos conteúdos de sacarose e baixos conteúdos de frutanos na parte distal da lâmina foliar, respectivamente.

Como já é de conhecimento geral, espécies de *Lolium* são muito sensíveis a estresses abióticos (Humphreys *et al.*, 2006). Logo, a presença de frutanos de diferentes tamanhos em diferentes tecidos das plantas de *L. multiflorum* crescidas sob condições ambientais subtropicais apropriadas devem ser levadas em consideração para entender as respostas fisiológicas de plantas crescidas em locais poluídos. A capacidade de acumular elementos tóxicos do ar e a eficiência biomonitora do cultivar estudado podem ser também afetadas uma vez que suas concentrações são expressas de forma relativa à massa foliar. Considerando o maior acúmulo de frutanos no estolho de plantas de *Lolium multiflorum*, esse tecido foi escolhido para o estudo das variações sazonais e diárias nos carboidratos solúveis de plantas de *Lolium multiflorum* expostas aos poluentes aéreos da cidade de São Paulo, conforme será apresentado nos próximos capítulos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, G.; NELSON, C.J. Photosynthate partitioning in basal zones of tall fescue leaf blades. **Plant Physiology**, v. 95, p. 663-668, 1991.
- ARNDT, U.; SCHWEIZER, B. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: ELLENBERG, H. (Ed.). **Biological monitoring - signals from the environment**. Eschborn: Vieweg, 1991. p. 199-260.
- BORLAND, A.M.; FARRAR, J.F. Compartment and fluxes of carbon in leaf blades and leaf sheaths of *Poa annua* L. and *Poa x jemtlandica* (Almq.) Richt. **Plant, Cell and Environment**, v. 11, p. 535-543, 1988.
- CAIRNS, A.J.; WINTERS, A.; POLLOCK, C.J.; NELSON, C.J.; SCHNYDER, H.; ALLARD, G. Fructan metabolism in leaves of temperate grasses. In: BONNEMAIN, J.L. et al. (Eds.). **Phloem Transport and Assimilate Compartmentation Nantes**: Ouest Editions, Presses Académiques, 1991, p. 33-40.
- CAIRNS, A.J.; BEGLEY, P.; SIMS, I.M. The structure of starch from seeds and leaves of the fructan-accumulating ryegrass, *Lolium temulentum* L. **J. Plant Physiology**, v. 159, p. 221-230, 2002.

- DAVIES, A. The regrowth of grass swards. In: JONES, M.B.; LAZENBY, A. (Eds.). **The Grass Crop: the physiological basis of production**. London: Chapman & Hall, 1988. p. 85-127.
- DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; CHU, E.P.; BUCKERIDGE, M.S. O açúcar das plantas. **Ciência Hoje**, v. 7, p. 42-48, 1988.
- DUBOIS, M.; GILLES, A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-355, 1956.
- EPSTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas**. Princípios e Perspectivas. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo e Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1975. 341p.
- FARRAR, J.; POLLOCK, C.; GALLAGHER, J. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science**, v. 154, p. 1-11, 2000.
- FULKERSON, W.J.; DONAGHY, D.J. Plant-soluble carbohydrate reserves and senescence – key criteria for developing an effective grazing management system for ryegrass-based pastures: a review. **Aust. J. Exp. Agric.**, v. 41, p. 261-275, 2001.
- GRIFFITH, S.M. Changes in post-anthesis assimilates in stem and spike components of italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). I. Water soluble carbohydrates. **Annals of Botany**, v. 69, p. 243-248, 1992.
- GUERRAND, D.; PRUD'HOMME, M.P.; BOUCAUD, J. Fructan metabolism in expanding leaves, mature leaf sheaths and mature leaf blades of *Lolium perenne*. Fructan synthesis, fructosyltransferase and invertase activities. **New Phytologist**, v. 134, p. 205-214, 1996.
- HOUSLEY, T.L.; VOLENEC, J.J. Fructan content and synthesis in leaf tissue of *Festuca arundinacea*. **Plant Physiology**, v. 86, p. 1247-1251, 1988.
- HUMPHREYS, M.W.; YADAV, R.S.; CAIRNS, A.J.; TURNER, L.B.; HUMPHREYS, J.; SKOT, L. A changing climate for grassland research. **New Phytologist**, v. 169, p. 9-26, 2006.
- ITAYA, N. M.; BUCKERIDGE, M. S.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Biosynthesis in vitro of high-molecular mass fructan by cell-free extracts from tuberosus roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). **New Phytologist**, v. 136, p. 53-60, 1997.
- JELLINGS, A.J.; LEECH, R.M. The importance of quantitative anatomy in the interpretation of whole leaf biochemistry in species of *Triticum*, *Hordeum* and *Avena*. **New Phytologist**, v. 92, p. 39-48, 1982.

- JERMYN, M.A. A new method for the determination of ketohexoses in the presence of aldohexoses. **Nature**, v. 177, p. 38-39, 1956.
- KANAYA, K.I.; CHIBA, S.; SHIMOMURA, T. Thin layer chromatography of linear oligosaccharides. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, p. 1947-1948, 1978.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMA Artes e Textos, 2000. 531p.
- MARCHEZAN, E.; VIZZOTO, V.R.; ROCHA, M.G.; MOOJEN, E.L.; SILVA, J.H.S. Produção animal em várzea sistematizada cultivada com forrageiras de estação fria submetidas a diferentes níveis de adubação. **Ciência Rural**, v. 32, p. 303-308, 2002.
- MC GRATH, D. Seasonal variation in the water-soluble carbohydrates of perennial and Italian ryegrass under cutting conditions. **Irish Journal of Agricultural Research**, v. 27, p. 131-139, 1988.
- MORVAN, A.; CHALLE, G.; PRUD'HOMME, M.P.; LE SAOS, J.; BOUCAUD, J. Rise of fructan exohydrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. **New Phytologist**, v. 136, p. 81-88, 1997.
- MORVAN-BERTRAND, A.; PAVIS, N.; BOUCAUD, J.; PRUD'HOMME, M.P. Partitioning of reserve and newly assimilated carbon in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* during regrowth after defoliation: assessment by ¹³C steady-state labelling and carbohydrate analysis. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, p. 1097-1108, 1999.
- PAVIS, N.; CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; BAUMGARTNER, S.; PRAZNIK, W.; BOUCAUD, J.; PRUD'HOMME, M.P. Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. **New Phytologist**, v. 150, p. 83-95, 2001a.
- PAVIS, N.; BOUCAUD, J.; PRUD'HOMME, M.P. Fructans and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. **New Phytologist**, v. 150, p. 97-109, 2001b.
- POLLOCK, C.J.; JONES, T. Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. **New Phytologist**, v. 83, p. 9-15, 1979.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J. Fructan metabolism in grasses and cereals. **Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.**, v. 42, p. 77-101, 1991.
- POLLOCK, C.; FARRAR, J.; TOMOS, D.; GALLAGHER, J. LU, C.; KOROLEVA, O. Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 489-494, 2003.
- ROTH, A.; LÜSCHER, M.; SPRENGER, N.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Fructan and fructan-metabolizing enzymes in the growth zone of barley leaves. **New Phytologist**, v. 136, p. 73-79, 1997.

SCHNYDER, H. The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling – a review. **New Phytologist**, v. 123, p. 233-245, 1993.

SHEEN, J. Feedback control of gene expression. **Photosynthesis Research**, v. 39, p. 427-438, 1994.

SOUZA, A.; SANDRIN, C.Z.; MORAES, M.G.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Diurnal variations of non-structural carbohydrates in vegetative tissues of *Melinis minutiflora*, *Echinolaena inflexa* and *Lolium multiflorum* (Poaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 755-763, 2005.

VOLENEC, J.J. Nonstructural carbohydrates in stem base components of tall fescue during regrowth. **Crop Science**, v. 26, p. 122-127, 1986.

WISE, C.S.; DIMLER, R.J.; DAVIES, H.A.; RIRST, C.E. Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparations. **Analytical Chemistry**, v. 27, p. 33-36, 1955.

ZELITCH, I. Improving the efficiency of photosynthesis. **Science**, v. 188, p. 626-633, 1975.

Capítulo 3

Conteúdo e composição de carboidratos não estruturais em plantas de *Lolium multiflorum* Lam. ssp. *italicum* Beck var. Lema expostas em ambiente urbano subtropical

Abstract: Sub-tropical urban environment affecting content and composition of non-structural carbohydrates in plants of *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* cv. Lema. *Lolium multiflorum* Lam ssp. *italicum* Beck cv. Lema, a fructan accumulator, is currently used as bioindicator of air pollution since this plant also accumulates heavy metals, sulfur and fluorine when growing in the presence of air pollutants. Urban air pollutants, such as heavy metals, can alter many physiological and metabolic processes within the plant, including carbohydrate production. The aim of the present study was to analyze the relationship between the concentrations of air pollutants, among other environmental factors, and leaf concentrations of metals and non-structural carbohydrates in plants of *Lolium multiflorum* seasonally exposed to different conditions of air pollution in São Paulo city. Plants were exposed at Congonhas (site with high levels of particulate material) and in a glasshouse with low levels of air contamination during consecutive periods of 28 days from July 2001 to April 2002. After each exposure, composition and concentrations of carbohydrates and concentrations of heavy metals (Al, Fe, Cu, Zn, Pb and Cd) and sulfur were measured in leaves. Preliminary results showed that the accumulation of total fructose increased in parallel with the age of the plants. The seasonal pattern of non-structural carbohydrate distribution was similar in plants from both sites. However, plants at Congonhas showed higher sugar concentrations, especially fructans of low and medium degree of polymerisation (DP). Multiple regression analysis showed that the higher the temperature and the leaf iron concentration the more intense was the accumulation of total fructose in plants from the polluted site. On the other hand, under conditions of higher values of relative humidity and particulate material in the air, plants accumulated less total non-structural carbohydrates.

Key words: Air pollution, carbohydrate, fructan, grass, heavy metals.

Resumo: *Lolium multiflorum* Lam ssp. *italicum* Beck var. Lema, uma gramínea acumuladora de frutanos, tem sido usada como bioindicadora de poluição aérea, uma vez que também acumula metais pesados, fluoretos e enxofre, quando se desenvolve na presença desses elementos químicos no ar. Poluentes aéreos, como os metais pesados, podem alterar muitos processos fisiológicos e metabólicos das plantas, incluindo a produção de carboidratos. O objetivo do presente trabalho foi analisar as relações entre as concentrações de poluentes aéreos urbanos, entre outros fatores ambientais, e as concentrações foliares de metais e de carboidratos solúveis em plantas de *Lolium multiflorum* expostas sazonalmente a diferentes condições de poluição do ar na cidade de São Paulo. Para isso, as plantas foram expostas por períodos consecutivos de 28 dias, entre julho de 2001 e abril de 2002, em Congonhas (local com altos níveis de material particulado) e em casa de vegetação, com baixa contaminação atmosférica (local de

referência). Após cada exposição, as concentrações de carboidratos, incluindo frutose total, e de metais pesados (Al, Fe, Cu, Zn, Pb e Cd) e enxofre foram quantificadas. Resultados preliminares mostraram que o acúmulo de frutose total aumentou em paralelo à idade das plantas. Embora o padrão sazonal de carboidratos solúveis tenha sido semelhante nas plantas dos dois locais de estudo, as plantas de Congonhas apresentaram as maiores concentrações de açúcares, especialmente frutanos de baixo e médio grau de polimerização (GP). A análise de regressão multivariada mostrou que quanto maior foi a temperatura e a concentração foliar de ferro, maior foi o acúmulo de frutose total em plantas do local poluído. Por outro lado, em condições de alta umidade e de material particulado no ar, plantas tenderam a acumular menos carboidratos não-estruturais.

Palavras-chave: carboidratos, frutano, gramínea, metais pesados, poluição aérea.

INTRODUÇÃO

Os frutanos são polímeros de frutose relacionados estrutural e metabolicamente com a sacarose (Figueiredo-Ribeiro, 1993) e constituem os principais carboidratos solúveis encontrados em gramíneas de regiões de clima temperado (Bender & Smith, 1973) e em membros das ordens Asterales e Liliales (Pollock & Cairns, 1991). De acordo com Hendry & Wallace (1993), a expansão global da flora que acumula frutanos coincidiu com o estabelecimento da estacionalidade no regime de chuvas e com a redução gradual do fator água no ambiente. Ainda, parece que a distribuição de frutanos na flora está também relacionada com períodos de frio vivenciados pelas espécies acumuladoras desses polímeros (Hendry, 1993). Desse modo, há evidências de que o acúmulo de frutanos, como uma forma de “sequestrar” o excesso de sacarose, seja um mecanismo adaptativo para que a fotossíntese ocorra sob baixas temperaturas e para a regulação do potencial osmótico celular sob condições de déficit hídrico (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro, 2001).

Em regiões temperadas e subtropicais, gramíneas e plantas lenhosas apresentam uma periodicidade característica na estocagem e na mobilização dos carboidratos de reserva: durante o período de dormência (outono e inverno), as reservas são acumuladas, enquanto no período de crescimento ativo (primavera e verão), ocorre a despolimerização e a mobilização do material de reserva, incluindo os frutanos, para a retomada do desenvolvimento (Zimmermann & Brown, 1974; Roth *et al.*, 1997). Essas variações estacionais parecem estar relacionadas com o fotoperíodo, que modifica os padrões de desenvolvimento (Wareing, 1956) e com a síntese de polissacarídeos de

reserva (Isejima *et al.*, 1991), ou com a temperatura baixa, que possui efeito bastante conhecido no acúmulo de carboidratos solúveis (Suzuki, 1989).

A produção de frutanos também pode ser alterada frente a outras variações ambientais, como a disponibilidade de nutrientes no solo (Van den Ende *et al.*, 1999). Nesse contexto, Cuzzuol e colaboradores (2003) observaram que o teor de frutanos foi reduzido em plantas de *Vernonia herbacea* tratadas com concentrações crescentes de nitrogênio no solo. Muitos estudos igualmente mostraram que plantas tratadas com excesso de metais pesados no solo, entre eles o cádmio, cobalto, níquel e zinco, tinham seu acúmulo de carboidratos solúveis alterado (Samarakoon & Rauser, 1979; Costa & Spitz, 1997). Em sementes na fase de germinação, por exemplo, foi observado que a presença de elevadas concentrações de metais pesados no meio de cultura suprimiu a mobilização e a translocação de carboidratos do endosperma para as regiões de crescimento do embrião (Hsu & Chang, 1992 apud Madhava Rao & Sresty, 2000). No caso dos frutanos, Frossard e colaboradores (1989) observaram, em plantas do gênero *Lolium*, que esses compostos acumularam-se paralelamente ao aumento no conteúdo de cádmio, níquel, cobre ou zinco no solo.

A presença de metais pesados no solo diminui a qualidade das pastagens quando em altas concentrações. Estes compostos, além de serem prejudiciais às plantas, também são prejudiciais aos animais, visto que os acumulam em níveis tóxicos durante o pastejo e, afetam, por conseqüência, o homem como consumidor secundário (Frossard *et al.*, 1989). Os metais pesados em excesso no solo também podem alterar a atividade de algumas enzimas. De um modo geral, as atividades enzimáticas podem ser inibidas pelo acúmulo de metais no compartimento celular da enzima, ou estimuladas, através da síntese *de novo* da proteína ou da ativação da enzima já existente (Van Assche & Clijsters, 1990). Segundo estes autores, duas enzimas de biossíntese da clorofila são inibidas por metais, assim como a rubisco (ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase). Nesta última, dois mecanismos de interação com metais podem ocorrer: metais com afinidade por ligantes-S podem se ligar aos grupos sulfidríla da enzima, provocando sua ruptura em subunidades e sua perda de atividade (Stiborová, 1988), ou metais tóxicos podem se combinar a metaloproteínas e substituir o elemento estrutural da enzima, resultando na perda da capacidade de carboxilação e na redução da atividade carboxilase/oxigenase (Van Assche & Clijsters, 1990). Como resultado, alterações na capacidade fotossintética e, conseqüentemente, na produção e acúmulo de carboidratos solúveis são esperados.

Por sua parte, as plantas apresentam mecanismos para evitar os efeitos adversos dos metais pesados em seu metabolismo. Algumas plantas respondem às elevadas concentrações de metais no solo, excluindo a absorção desses elementos pelos tecidos vegetativos (Baker, 1981). Já outras são capazes de desintoxicar e acumular os metais em concentrações muitas vezes maiores que a do solo (Baker & Brooks, 1989). Tais plantas são denominadas hiperacumuladoras e sua extraordinária capacidade de acumular aqueles elementos tóxicos parece envolver sua compartimentação em níveis celular e subcelular, sem interferência na atividade normal da célula (Küpper *et al.*, 1999). Aliás, os metais pesados são aqueles que apresentam uma densidade superior a 5 g/cm³. Por esta definição, dos 90 metais encontrados naturalmente, 53 são considerados metais pesados (Weast, 1984), mas nem todos apresentam importância biológica. Baseado em sua solubilidade sob condições fisiológicas, 17 metais pesados podem estar disponíveis para as células vivas (Weast, 1984). Dentre estes, o ferro, o molibdênio e o manganês são importantes como micronutrientes para as plantas. Já o zinco, níquel, cobre, cobalto, cromo, tungstênio e vanádio são elementos tóxicos, podendo ser ou não importantes como micronutrientes. Por último, metais pesados como arsênio, mercúrio, prata, antimônio, cádmio, chumbo e urânio não possuem função conhecida como nutrientes e podem ser ou não tóxicos às plantas e microorganismos (Breckle, 1991).

Embora sejam mais comumente encontrados no solo, os metais pesados também podem ser encontrados no ar, sendo emitidos por fontes diversas que envolvem, principalmente, a queima de combustíveis fósseis (CETESB, 2003). Na atmosfera urbana, como a da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), além dos metais pesados, principais constituintes do material particulado, também podem ser encontrados poluentes gasosos, como monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO_x), hidrocarbonetos (HC), óxidos de enxofre (SO_x), nitrato de peroxiacetila (PAN) e ozônio (O₃) (CETESB, 2003). Isto torna bastante complexas as relações entre as plantas e elementos tóxicos presentes na atmosfera urbana. Dependendo de sua natureza química, tais poluentes tanto podem ser absorvidos via estômatos ou cutículas foliares como por via radicial.

O material particulado atmosférico da RMSP começou a ser estudado a partir de 1980 com os trabalhos de Orsini *et al.* (1984, 1986) e Artaxo & Orsini (1987). Estes autores determinaram a composição elementar do material particulado inalável (<10 µm) e suas características granulométricas, comparando as observações realizadas em áreas urbanas com outras naturais. Os resultados desses estudos evidenciaram que, em

áreas naturais, as concentrações do material particulado eram baixas em contraste com as encontradas em áreas urbanas. Em relação à composição química, os autores verificaram uma grande diversidade de compostos presente no material particulado, destacando-se poeira, fuligem, esporos, pólen, metais, sal marinho, nitratos e sulfatos. Já em relação à fração orgânica, Martinis (1997) identificou várias classes de compostos, incluindo cetonas, aldeídos, piridinas, furanos, amidas, aminas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, todas muito tóxicas aos seres vivos.

As concentrações de poluentes no ar são determinadas pela quantidade emitida pelas fontes poluidoras e pelas condições meteorológicas da região. Tabacniks *et al.* (1994) observaram que a concentração de material particulado no ar pode apresentar uma oscilação semanal relacionada à intensidade do tráfego de veículos automotores. Assim, as concentrações tendem a ser maiores durante os dias da semana, apresentando valores mínimos durante os finais de semana. Já Artaxo & Orsini (1987) observaram um padrão sazonal nas concentrações do material particulado em São Paulo, sendo as maiores concentrações encontradas durante o inverno.

Estudos sobre os efeitos dos poluentes aéreos no metabolismo de frutanos são escassos na literatura. Considerando que os elementos tóxicos contidos na atmosfera urbana, especialmente os metais pesados, podem interferir no acúmulo de frutanos (Frossard *et al.*, 1989) e de outros carboidratos, e que tanto a poluição aérea como o metabolismo dos polímeros de frutose apresentam aspectos sazonais marcantes, os objetivos do presente trabalho foram: 1) acompanhar as variações mensais na composição qualitativa e quantitativa de carboidratos, incluindo frutanos, em plantas de *Lolium multiflorum* expostas em local da cidade de São Paulo altamente poluído, por períodos consecutivos de tempo, ao longo de um ano, e comparar essas variações com as observadas em plantas mantidas em ambiente com baixos níveis de poluição; 2) verificar como o metabolismo de carboidratos é alterado em resposta às variações no acúmulo foliar de metais pesados, às concentrações de poluentes aéreos e/ou às variáveis climáticas.

O estudo foi dividido em duas etapas. Realizou-se, inicialmente, um experimento preliminar para verificar se o tempo de exposição das plantas no ambiente, protocolado para biomonitoramento com essa espécie acumuladora, seria adequado também para detectar as alterações nos carboidratos solúveis. Uma vez que isto foi possível, realizou-se um experimento de maior duração, em condições de campo na

cidade de São Paulo, seguindo o protocolo estabelecido, no qual são recomendadas exposições das plantas por 28 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Para ambos os experimentos, as plantas de *Lolium multiflorum* foram cultivadas em casa de vegetação, conforme descrito no capítulo anterior. Após seis semanas de cultivo, o lote de plantas foi dividido entre os dois locais de exposição.

2. Locais de exposição

Os dois experimentos foram conduzidos na cidade de São Paulo, inserida na região metropolitana de São Paulo (RMSP), caracterizada por apresentar um grande parque industrial e uma frota bastante significativa de veículos automotores (carros, caminhões, ônibus, motocicletas), que são as principais fontes de poluição do ar (CETESB, 2003). Os sistemas de exposição para *Lolium multiflorum* foram instalados em dois locais da cidade de São Paulo, sendo um situado numa área com intensa emissão veicular de poluentes e um afastado das principais fontes emissoras de poluição. A Avenida dos Bandeirantes (Figura 6B), na altura do Aeroporto de Congonhas, foi escolhida como o local afetado pela poluição aérea, já que o intenso tráfego de veículos automotores contribui para uma atmosfera local altamente contaminada por material particulado, monóxido de carbono e gases de enxofre e de nitrogênio. Nas proximidades desse local de estudo, há uma estação de monitoramento de qualidade do ar da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), onde foram registradas continuamente as concentrações de material particulado com até 10 µm de diâmetro, em cuja composição estavam contidos metais como Fe, Al, Zn, Cu, Mn, Pb, Cd, Ni, entre outros, e de dióxidos de enxofre e nitrogênio. A casa de vegetação da Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo foi utilizada como local de referência durante o experimento preliminar e as exposições de junho a dezembro do experimento sazonal, sendo então substituída pela casa de vegetação da Seção de Ecologia (Figura 6C) do mesmo Instituto, com climatização e ar filtrado. Com

esta escolha foi possível caracterizar, de fato, o conteúdo de açúcares em plantas de *L. multiflorum* quando submetidas a baixos níveis de contaminação atmosférica.

Figura 6. Aspecto geral das plantas de *Lolium multiflorum* (A) e de seus respectivos locais de exposição: Av. dos Bandeirantes (Congonhas) (B) e casa de vegetação com ar filtrado (C). A seta indica o local exato de exposição das plantas em Congonhas.

A filtragem do ar era feita pela ação de exaustores, que garantiam um fluxo de ar adequado para o interior da casa de vegetação, através de filtros de lã de vidro e papel, que retinham partículas grossas e finas, respectivamente, e de filtros de carvão ativado impregnado com permanganato de potássio, que retinham gases (O_3 , SO_2 , NO_x e PAN).

Ao longo de todo o experimento, não foi possível a medição de dados meteorológicos e de poluição atmosférica na casa de vegetação devido à falta de equipamentos para este fim. Assim, para caracterização do ambiente no interior da casa de vegetação, utilizou-se como referência as médias estacionais das condições climáticas e de poluição aérea obtidas por Bulbovas (2005) nesse local em anos posteriores (2002/2003).

As medidas de qualidade do ar foram realizadas com um amostrador de grande volume de ar (AGV) para partículas de até $10\ \mu m$ (material particulado - MP_{10}) e também com um amostrador de pequeno volume de ar para coleta de ozônio e de dióxidos de nitrogênio e de enxofre (APV Trigás), todos os equipamentos da Energética. No entanto, os dados obtidos para o ozônio não foram utilizados no presente trabalho.

O AGV MP_{10} consistia em uma casinhola com uma cabeça de separação e uma base amostradora. Na base, havia um motor que retirava o ar ambiente a partir de um fluxo conhecido. Este entrava pela cabeça onde havia um filtro de fibra de vidro que retinha as partículas. O filtro era pesado (após equilibrar a umidade) antes e depois da coleta para se determinar o ganho líquido em peso (massa). O volume de ar amostrado era determinado a partir da vazão medida e do tempo de amostragem. A concentração de material particulado com até $10\ \mu m$ em suspensão no ar ambiente foi computada dividindo-se a massa de partículas coletadas pelo volume de ar amostrado e foi expressa em $\mu g/m^3$ (ABNT, 1997).

No caso do APV Trigás, o ar ambiente entrava no trem de amostragem através de um funil invertido conectado a uma mangueira flexível. O ar passava por um tubo de vidro distribuidor (*manifold*), que dividia o fluxo em três partes iguais. Cada um destes três fluxos era encaminhado a um frasco borbulhador. Havia um frasco para cada um dos três poluentes a serem medidos. O método de NO_2 era baseado na reação específica que ocorria durante duas horas de amostragem de ar, do íon nitrito com reagentes diazotizantes para formar corante azo, que foi medido colorimetricamente (Saltzman, 1960). O SO_2 era absorvido através de uma solução de peróxido de hidrogênio, durante

24 horas de borbulhamento, formando ácido sulfúrico, que foi quantificado através de uma solução de tetraborato de sódio (ABNT, 1993). Mais detalhes sobre a metodologia de quantificação da qualidade do ar na casa de vegetação podem ser encontrados em Bulbovas (2005).

Para caracterização das condições ambientais no local poluído durante o período experimental foram obtidas junto à CETESB as concentrações horárias de material particulado e de dióxidos de enxofre e de nitrogênio. Valores mensais de temperatura e de umidade relativa do ar foram fornecidos pelo Departamento de Controle do Espaço Aéreo (Congonhas) e os de precipitação, pelo Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo.

3. Análise preliminar

De acordo com protocolo padronizado para biomonitoramento pela Associação Alemã de Engenharia (VDI) e pelo Instituto Alemão de Padronização Metodológica (DIN), o tempo de exposição mínimo para as plantas de *Lolium multiflorum* acumularem metais pesados, fluoretos e enxofre é de 28 dias (VDI, 2001 *apud* Nobel, 2002). No entanto, o tempo ideal para o acúmulo de frutanos em quantidades suficientes para análise ainda não era conhecido em plantas expostas à poluição aérea. Desse modo, foi realizado um experimento preliminar entre o outono e o inverno de 2001, quando as concentrações de poluentes aéreos na atmosfera, especialmente os particulados, são geralmente maiores, para a verificação do tempo de exposição mais adequado à análise dos carboidratos solúveis de *Lolium multiflorum*. Para isso, plantas da espécie em estudo foram expostas nos dois locais de exposição por 1, 2, 3, 4, 8 e 12 semanas. No início da exposição foram expostos, em cada local de estudo, vasos em número suficiente para a retirada de três após cada período de exposição. Os vasos retirados eram levados para o laboratório, onde as folhas eram excisadas para a análise dos carboidratos solúveis, seguindo metodologia mencionada no capítulo anterior. Os pesos moleculares (PM) médios dos carboidratos solúveis também foram determinados nas amostras de plantas com 4, 8 e 12 semanas, pelo método de filtração molecular em coluna de Biogel P-10 (gel de poliacrilamida) (Pollock, 1982; Praznik & Beck, 1985), utilizando padrões para a calibração da coluna (Andrews, 1965). O volume vazio (V_0) foi determinado utilizando-se “blue dextran” (Sigma) e o coeficiente de correlação entre V_0/V_e (volume de eluição) e o log do peso molecular foi $r^2 = 0,97$ e $y = 5,3525 -$

0,9228x. O grau de polimerização (GP) dos frutanos foi calculado dividindo-se o peso molecular dos frutanos pelo peso molecular da frutose anidra. Os resultados obtidos foram utilizados como parâmetro para os demais experimentos.

4. Análise sazonal

No período de junho/2001 a abril/2002, foram realizadas 10 exposições consecutivas de plantas nos dois locais de estudo. Em cada exposição, seis vasos da planta bioindicadora eram levados para cada um dos locais, lá permanecendo por 28 dias, quando eram retirados e sucessivamente substituídos por um novo lote de plantas. Conforme será mostrado a seguir, esse tempo de exposição configurou-se como adequado para as análises dos carboidratos de *L. multiflorum*.

Os vasos retirados em cada exposição eram levados para o laboratório para as análises químicas. Folhas de *Lolium multiflorum* eram excisadas a quatro centímetros acima do substrato, pesadas e separadas para a análise de metais pesados e enxofre, e a porção inferior do caule (estolho), pesada e separada para a análise dos carboidratos solúveis. Logo, cada vaso representou uma repetição para cada período e local de exposição.

A extração e análise dos carboidratos solúveis foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 2 e em Sandrin *et al.* (2006). Os pesos moleculares (PM) médios e o grau de polimerização (GP) dos frutanos também foram determinados. O coeficiente de correlação entre V_0/V_e (volume de eluição) e o log do peso molecular foi $r^2 = 0,99$ e $y = 8,1562 - 1,6439x$.

Para determinar as concentrações de metais pesados (Zn, Cu, Al, Fe, Ba, Pb e Cd) e enxofre, folhas frescas de *Lolium multiflorum* foram colocadas em sacos de papel, secas em estufa (70°C), moídas em moinho de bola de ágata ou manualmente em almofariz de porcelana e armazenadas em frascos de polietileno. Uma alíquota de cada amostra, correspondente a 0,25 ou 0,50 g de massa seca, dependendo da quantidade disponível de material vegetal, foi digerida com ácido nítrico concentrado (2,5 ou 5 ml), por 12 h a temperatura ambiente, seguida por aquecimento em bloco digestor a 160°C. Após a maior parte do ácido nítrico ter sido evaporada, foi adicionado ácido perclórico concentrado (0,6 ou 1,2 ml), sendo a digestão finalizada, então, com o aquecimento em bloco digestor a 210°C até eliminação total da matéria orgânica. O extrato concentrado resultante foi diluído na proporção de 1 g de massa seca para 100 ml de extrato com

água bi-deionizada. Nesses extratos diluídos, foram determinadas as concentrações de enxofre por turbidimetria (Butters & Chenery, 1959) e de zinco, cobre, alumínio, ferro, bário, chumbo e cádmio por espectrofotometria de absorção atômica (Zagatto *et al.*, 1981). A precisão analítica foi avaliada através da digestão e análises químicas, seguindo a mesma metodologia de amostras padronizadas (folhas de macieira - NIST 1515) e certificadas pelo “National Bureau of Standards” (Estados Unidos).

Diferenças nas concentrações de açúcar total, frutose total e metais pesados acumulados pelas plantas nos dois locais de estudo e ao longo dos meses de exposição foram localizadas por meio de análise de variância com dois fatores (locais e meses de exposição), testando-se possível interação entre eles e localizando-se as diferenças pelo teste de Student Newman Keuls. A relação entre os dados biológicos e os dados ambientais foi analisada qualitativamente por meio da Análise de Componentes Principais (ACP). A fim de verificar se as variações mensais nos conteúdos de açúcar e frutose total em plantas expostas em Congonhas poderiam ser previstas por oscilações no acúmulo foliar de metais pesados ou por variáveis ambientais (temperatura, umidade, precipitação e concentrações atmosféricas de MP_{10} , NO_2 e SO_2), foi realizada uma análise multivariada tipo “stepwise”. Para isso, foram adotados os dados de açúcar ou frutose total como variável dependente e o acúmulo foliar de metais pesados e as condições ambientais como variáveis independentes. O método de análise começou com o modelo saturado, ou seja, com todas as variáveis presentes, seguido pela remoção de uma variável por vez, conforme sua baixa participação na explicação dos dados de açúcar e frutose total (alto valor de p). Em cada etapa, o ajuste e a significância da variável eram avaliados, permanecendo apenas aquelas que contribuíram significativamente para o modelo.

RESULTADOS

1. Análise preliminar

As análises dos conteúdos de açúcar e de frutose total (Figura 7) em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por uma, duas, três, quatro, oito e doze semanas, nos dois locais de estudo, mostraram que os níveis desses carboidratos aumentaram, especialmente a partir da terceira semana, paralelamente ao aumento no tempo de

exposição, com os maiores valores sendo encontrados nas plantas expostas por doze semanas.

Figura 7. Variações nos conteúdos de açúcar total e de frutose total em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por até doze semanas em dois locais com diferentes níveis de poluição aérea: (■) Congonhas e (□) casa de vegetação. Barras indicam o erro padrão. (*) Resultado não disponível.

A determinação dos pesos moleculares da fração de carboidratos solúveis (Figura 8) mostrou que as plantas de Congonhas apresentaram frutanos de menor peso molecular do que aqueles encontrados nas plantas da casa de vegetação. Destaca-se, ainda, que o peso molecular médio dos frutanos das plantas expostas no local poluído variou de 8.014 (GP = 49) a 10.032 (GP = 62) após 4 e 8 semanas de exposição, enquanto que nas plantas do local de referência o peso molecular médio dos frutanos (PM = 18.259; GP = 113) permaneceu igual durante 4, 8 e 12 semanas. Esses resultados foram confirmados pela análise qualitativa por HPAEC/PAD (Figura 9), que mostrou que as plantas de Congonhas expostas por 4 semanas realmente apresentaram frutanos de peso molecular menor (aqueles com tempo de retenção entre 5 e 10 minutos) em proporções mais elevadas que nas plantas expostas por 8 semanas. Do mesmo modo, foi observado que a proporção de frutanos nas plantas da casa de vegetação não variou muito ao longo dos tempos de exposição.

Com base nesses resultados, decidiu-se realizar as análises foliares de carboidratos solúveis, nos meses posteriores, após quatro semanas de exposição, permitindo maior número de avaliações ao longo do ano e adotando o período selecionado para o biomonitoramento ambiental.

Figura 8. Variações no peso molecular médio de frutanos em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por quatro e oito semanas em (A) Congonhas e por quatro, oito e doze semanas na (B) casa de vegetação. (●) 4, (■) 8 e (▲) 12.

Figura 9. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 100 dos carboidratos solúveis neutros em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por quatro e oito semanas em Congonhas (esquerda) e por quatro, oito e doze semanas na casa de vegetação (direita). **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos. Amostras contendo 4 mg frutose/ml.

2. Análise sazonal

a) Caracterização do ambiente nos locais de estudo

Na tabela 1, observa-se que os valores mais altos de material particulado 10 μm (MP_{10}) em Congonhas ocorreram em junho e agosto, correspondentes à estação de inverno, e os valores mais baixos em janeiro e fevereiro, no verão. Em relação ao dióxido de enxofre (SO_2), pode-se observar que este poluente gasoso variou menos ao longo dos meses de amostragem, porém seguindo a mesma tendência observada para material particulado. Já as concentrações de dióxido de nitrogênio (NO_2) foram mais altas nos meses de junho e de janeiro a abril.

Tabela 1. Concentrações (**M** = média mensal; **M.M** = média diária máxima e **V.M** = valor máximo horário) dos poluentes atmosféricos ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) em Congonhas durante o período de estudo.

Mês	MP_{10}			SO_2			NO_2		
	M	M.M	V.M	M	M.M	V.M	M	M.M	V.M
Junho	89,2	218,6	361,3	23,0	39,0	85,4	74,4	133,7	213,0
Agosto	73,8	136,7	608,0	21,2	35,7	76,1	46,1	81,3	147,3
Setembro	68,3	123,7	220,6	21,1	32,1	95,9	47,2	79,3	147,2
Outubro	63,0	99,5	378,7	18,6	39,7	93,9	42,3	71,7	130,6
Novembro	69,5	100,0	282,4	20,8	35,9	87,7	45,0	79,2	132,9
Dezembro	61,9	102,5	280,2	16,2	29,5	86,6	41,1	73,0	176,1
Janeiro	52,3	139,1	385,0	15,6	31,1	71,9	64,5	110,8	190,7
Fevereiro	52,0	126,1	308,0	14,5	28,9	47,5	64,2	110,1	205,3
Março	67,3	159,9	308,0	18,6	37,7	49,6	87,7	154,3	246,6
Abril	67,3	138,5	240,0	21,0	44,3	125,6	77,9	138,6	240,5

Fonte: CETESB.

Os perfis médios da qualidade do ar foram muito diferentes em ambos locais de estudo, com os níveis de NO_2 (Figura 10A), MP_{10} (Figura 10B) e SO_2 (Figura 10C) sendo muito maiores em Congonhas. Neste local, as concentrações de poluentes aéreos foram mais elevadas em Julho e Abril.

Em relação aos dados meteorológicos dos locais de estudo, observa-se que os valores de umidade relativa do ar (Figura 10D) foram praticamente constantes ao longo dos meses de exposição, com a casa de vegetação apresentando valores menores do que Congonhas, em consequência da climatização com ar condicionado. Em ambos os locais de exposição, os maiores valores de temperatura (Figura 10E) foram obtidos nos meses de dezembro a março, que caracterizam o verão. O verão (dezembro, janeiro e

fevereiro) e o inverno (junho e agosto) foram as estações mais úmida e seca, respectivamente (Figura 10F). Em função das condições experimentais serem controladas na casa de vegetação, assumiu-se que a situação do ambiente, no período do presente estudo (2001/2002), foi similar às médias obtidas nos anos de 2002/2003 por Bulbovas (2005).

Figura 10. Variações mensais de poluentes aéreos (**A** = dióxido de nitrogênio, **B** = material particulado e **C** = dióxido de enxofre) e de variáveis climáticas (**D** = umidade relativa do ar, **E** = temperatura média e **F** = precipitação) em Congonhas (■) e na casa de vegetação (□).

A figura 11 mostra os valores de temperatura máxima, média e mínima obtidos em Congonhas durante o período de estudo. Observa-se que os valores máximos de temperatura variaram de 22 a 30°C e os valores mínimos, de 14 a 21°C.

Figura 11. Variações mensais de temperaturas máxima (■), média (▲) e mínima (●) em Congonhas durante o período de estudo. Dados fornecidos pelo Departamento de Controle do Espaço Aéreo, Congonhas, São Paulo.

b) Carboidratos solúveis

A figura 12 mostra a variação mensal, ao longo de 10 meses consecutivos, nos conteúdos de açúcar e de frutose totais em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por quatro semanas nos dois locais de estudo. De um modo geral, observou-se que o padrão de variação mensal dos carboidratos (Figuras 12 A e B) foi semelhante nos locais de exposição. Porém, as plantas de Congonhas tenderam a apresentar concentrações mais elevadas, exceto em junho. No entanto, enquanto tais diferenças foram comprovadas estatisticamente apenas em outubro, novembro e janeiro para açúcares totais (Figura 12A), foram comprovadas em todos os meses para frutose total (Figura 12B). O maior acúmulo de carboidratos solúveis ocorreu em dezembro nas plantas de Congonhas e em dezembro, março e abril nas plantas do local de referência. Já picos de frutose total (Figura 12B) foram encontrados em dezembro e abril nas plantas de ambos locais. Interações entre os locais e os meses de exposição no conteúdo de frutose total não foram observadas.

Figura 12. Variações mensais nos conteúdos de (A) açúcar total (mg/gMS) e de (B) frutose total (mg/gMS) em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por quatro semanas nos dois locais de estudo: (■) Congonhas e (□) casa de vegetação. Os valores indicados com a mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5%. (*) indica valores mensais significativamente superiores àqueles observados em, no mínimo, outros três meses, no mesmo local. (**) resultado não disponível. Barras indicam o erro padrão.

A análise qualitativa por HPAEC/PAD (Figuras 13 a 16) indicou, no geral, tendência ao maior acúmulo de frutanos, principalmente de baixo e médio peso molecular (tempos de retenção de 7 a 12 min), nas plantas expostas em Congonhas, conforme ficou bem evidenciado nos meses de agosto (inverno), outubro (primavera), dezembro (verão) e abril (outono). Apenas em junho (inverno), as plantas da casa de vegetação foram as que apresentaram mais frutanos de tamanho molecular intermediário (tempos de retenção entre 10 e 12 min) do que as plantas do local poluído. Diferenças entre os meses de exposição e, conseqüentemente, entre as estações do ano, não foram muito representativas, especialmente na casa de vegetação, dificultando a observação de um padrão sazonal na composição de carboidratos solúveis. Contudo, os cromatogramas sugerem que os frutanos de peso molecular intermediário são acumulados no outono e degradados na primavera, nas plantas mantidas na casa de vegetação.

Figura 13. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por quatro semanas nos meses de inverno em Congonhas (esquerda) e na casa de vegetação (direita). **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos. Amostras contendo 400 µg frutose/ml.

Figura 14. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por quatro semanas nos meses de primavera em Congonhas (esquerda) e na casa de vegetação (direita). **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos. Amostras contendo 400 µg frutose/ml.

Figura 15. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por quatro semanas nos meses de verão em Congonhas (esquerda) e na casa de vegetação (direita). **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos. Amostras contendo 400 µg frutose/ml.

Figura 16. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por quatro semanas nos meses de outono em Congonhas (esquerda) e na casa de vegetação (direita). **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos. Amostras contendo 400 µg frutose/ml.

A análise dos pesos moleculares (Tabela 2) mostrou que o tamanho dos frutanos variou entre 40 GP (primavera) a 91 GP (inverno) nas plantas de Congonhas, e entre 40 GP (primavera) a 52 GP (inverno) nas plantas da casa de vegetação. Desse modo, frutanos de alto peso molecular predominaram durante o inverno nas plantas do local poluído, complementando os resultados obtidos por HPLC (Figuras 13 a 16) nos quais a visualização destes dados (frutanos com tempo de retenção maior que 15 min) não estava destacada.

Tabela 2. Grau de polimerização (GP) e massa molecular relativa de frutopolissacarídeos em plantas de *L. multiflorum* expostas sazonalmente no local poluído (Congonhas) e no local de referência (casa de vegetação).

Estação do Ano	GP		Mr (kDa)	
	Congonhas	Casa Veg.	Congonhas	Casa Veg.
Inverno	91	52	14,8	8,5
Primavera	40	40	6,4	6,4
Verão	46	-	7,4	-
Outono	46	-	7,4	-
Média	56	46	9,0	7,4

(-) Dado não disponível.

As concentrações de glicose, frutose e sacarose (Tabela 3) nas plantas de Congonhas tenderam a ser mais baixas durante a primavera. Por outro lado, as plantas da casa de vegetação mostraram maior acúmulo de sacarose no inverno e no outono. Comparando os dois locais de exposição em cada estação do ano, verificou-se que as concentrações de glicose e frutose foram similares nas plantas expostas durante o inverno e o outono no local poluído, enquanto na casa de vegetação mostraram conteúdos mais elevados desses monossacarídeos somente no inverno. Nas plantas de ambos os locais de estudo, as variações na quantidade de sacarose foram maiores do que nas dos demais carboidratos, com tendência a diminuir na primavera e no verão.

Tabela 3. Variação sazonal nos conteúdos de glicose, frutose e sacarose em plantas de *L. multiflorum* expostas sazonalmente no local poluído (Congonhas) e no local de referência (casa de vegetação) (valores $\pm$ erro padrão).

Estação do Ano	Congonhas Carboidratos (mg/gMS)			Casa de Vegetação Carboidratos (mg/gMS)		
	Glicose	Frutose	Sacarose	Glicose	Frutose	Sacarose
Inverno	1.7 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.7	11.1 $\pm$ 9.3	2.2 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.9	9.7 $\pm$ 3.1
Primavera	0.5 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 2.0
Verão	1.5 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 2.3	0.7 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2
Outono	1.9 $\pm$ 1.3	2.0 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.9	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.4	9.4 $\pm$ 0.0

c) Elementos químicos

De um modo geral, observou-se que os teores de elementos químicos acumulados nas folhas das plantas de Congonhas tenderam a ser maiores do que nas

plantas da casa de vegetação (Figuras 17 a 19). No entanto, tais tendências nem sempre foram comprovadas estatisticamente. Destaca-se também que, com exceção do cádmio, a análise estatística mostrou interação entre os fatores local e mês do ano para os elementos químicos analisados.

Comparando as concentrações de enxofre (Figura 17A) entre os dois locais de estudo, observa-se que as plantas de Congonhas apresentaram valores significativamente maiores que as da casa de vegetação nos meses de janeiro e abril. Em janeiro, a concentração desse elemento foi significativamente maior do que na maioria dos outros meses de exposição. Nas plantas da casa de vegetação, a concentração de enxofre foi bastante semelhante ao longo dos meses de exposição. A variação no conteúdo de cobre (Figura 17B) foi mais significativa nas plantas do local de referência, que apresentaram níveis significativos desse metal nos meses de outubro, novembro e dezembro. Nas plantas do local poluído, o conteúdo mais elevado de cobre ocorreu em junho. Diferenças na concentração de cobre entre as plantas dos dois locais de estudo não foram significativas. O acúmulo foliar de zinco (Figura 17C) nas plantas da casa de vegetação foi equivalente entre os meses de exposição, enquanto que nas plantas de Congonhas, valores significativamente mais elevados de zinco ocorreram nos meses de junho e dezembro. Nesses meses, também observou-se maior acúmulo de zinco nas plantas mantidas em Congonhas.

Picos de concentração foliar de alumínio (Figura 18A) foram observados em novembro e em março, nas plantas do local poluído e do local de referência, respectivamente. Em novembro e em abril, diferenças significativas na concentração de alumínio foram observadas entre os dois locais de exposição, com as plantas de Congonhas apresentando os maiores valores. Por outro lado, março foi o único mês em que a concentração de alumínio foi significativamente maior nas plantas da casa de vegetação. Já em relação ao bário (Figura 18B), o conteúdo desse metal não diferiu entre as plantas de Congonhas e da casa de vegetação. Os maiores acúmulos ocorreram em outubro, no local poluído, e em dezembro, no local de referência. As plantas do local poluído acumularam ferro significativamente (Figura 18C) nos meses de junho, outubro, dezembro e abril, e as plantas da casa de vegetação no mês de junho. As concentrações de ferro nas plantas dos dois locais de estudo diferiram significativamente na maioria dos meses analisados, com exceção de janeiro e março, meses em que as plantas de Congonhas apresentaram os níveis mais baixos desse metal.

O conteúdo de cádmio (Figura 19A) em plantas de *L. multiflorum* expostas em Congonhas e na casa de vegetação não diferiu ao longo dos meses e dos locais de exposição. As variações no conteúdo de chumbo (Figura 19B) foram maiores nas plantas do local poluído, sendo que no mês de junho o teor desse metal foi significativamente mais elevado do que o das plantas da casa de vegetação e do que nos demais meses de exposição.

Figura 17. Variações mensais nos conteúdos foliares de enxofre (µg/gMS), cobre (µg/gMS) e zinco (µg/gMS) em plantas de *Lolium multiflorum* expostas em (■) Congonhas e na (□) casa de vegetação. Letras comparam médias entre os locais de estudo. Os valores indicados com a mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5%. (*) indica valores mensais significativamente superiores àqueles observados em, no mínimo, outros três meses, no mesmo local. (**) resultado não disponível.

Figura 18. Variações mensais nos conteúdos foliares de alumínio ($\mu\text{g/gMS}$), bário ($\mu\text{g/gMS}$) e ferro ($\mu\text{g/gMS}$) em plantas de *Lolium multiflorum* expostas em (■) Congonhas e na (□) casa de vegetação. Letras comparam médias entre os locais de estudo. Os valores indicados com a mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5%. (*) indica valores mensais significativamente superiores àqueles observados em, no mínimo, outros três meses, no mesmo local. (**) resultado não disponível.

Figura 19. Variações mensais nos conteúdos foliares de cádmio ($\mu\text{g/gMS}$) e chumbo ($\mu\text{g/gMS}$) em plantas de *Lolium multiflorum* expostas em (■) Congonhas e na (□) casa de vegetação. Letras comparam médias entre os locais de estudo. Os valores indicados com a mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5%. (*) indica valores mensais significativamente superiores àqueles observados em, no mínimo, outros três meses, no mesmo local. (**) resultado não disponível.

d) Relações entre variáveis biológicas e ambientais

As correlações de Pearson entre o conteúdo de frutose total e o acúmulo foliar de elementos químicos (Tabela 4) somente foram significativas para ferro e chumbo. Regressões lineares entre esses compostos (Figura 20) mostraram que as concentrações de frutose total nas plantas dos dois locais de estudo aumentaram na medida em que ferro e chumbo foram acumulados nas folhas de *Lolium multiflorum*. Em relação aos

componentes do clima e da poluição atmosférica, nenhum desses fatores pareceu interferir significativamente no acúmulo dos carboidratos analisados (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2) entre o conteúdo de frutose total (mg/gMS) e o acúmulo foliar de metais pesados ($\mu\text{g/gMS}$), enxofre (mg/gMS), poluentes atmosféricos ($\mu\text{g/gMS}$) e dados climáticos (temperatura média ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (%)) em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por 28 dias em Congonhas e na casa de vegetação.

	Frutose Total		
	R	R^2	p
Cobre	-0,19	0,04	0,59
Zinco	0,53	0,28	0,11
Ferro	0,87	0,76	0,00
Alumínio	0,31	0,10	0,38
Chumbo	0,71	0,50	0,02
Cádmio	0,09	0,01	0,80
Bário	0,42	0,18	0,22
Enxofre	0,07	0,01	0,85
Material Particulado	0,58	0,33	0,08
Dióxido de Enxofre	0,57	0,32	0,09
Dióxido de Nitrogênio	0,28	0,08	0,43
Temperatura Média	-0,26	0,07	0,46
Umidade Relativa	0,20	0,04	0,57

Figura 20. Regressões lineares entre o acúmulo foliar de ferro (μg/gMS) e chumbo (μg/gMS) e a concentração de frutose total em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por 28 dias em Congonhas e na casa de vegetação. Análises realizadas nos meses de junho (2001) a abril (2002). Regressões lineares com $p < 0,05$ são significativas.

A tabela 5 mostra que as correlações de Pearson para os dados de açúcar total somente foram significativas para o acúmulo foliar de cobre e para a temperatura. Regressões lineares entre esses compostos (Figura 21) mostraram que as concentrações de açúcar total nas plantas dos dois locais de estudo aumentaram na medida em que a temperatura aumentou e que o acúmulo de cobre diminuiu nas folhas de *Lolium multiflorum*.

Tabela 5. Coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2) entre o conteúdo de açúcar total (mg/gMS) e o acúmulo foliar de metais pesados ($\mu\text{g/gMS}$), enxofre (mg/gMS), poluentes atmosféricos ($\mu\text{g/gMS}$) e dados climáticos (temperatura média ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (%)) em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por 28 dias em Congonhas e na casa de vegetação.

	Açúcar Total		
	R	R^2	p
Cobre	-0,52	0,09	0,03
Zinco	-0,25	0,06	0,33
Ferro	0,01	0,00	0,96
Alumínio	0,21	0,04	0,42
Chumbo	-0,03	0,00	0,91
Cádmio	-0,20	0,05	0,43
Bário	0,25	0,06	0,32
Enxofre	0,44	0,19	0,08
Material Particulado	0,17	0,03	0,52
Dióxido de Enxofre	0,22	0,05	0,38
Dióxido de Nitrogênio	0,28	0,08	0,26
Temperatura Média	0,58	0,36	0,01
Umidade Relativa	0,41	0,17	0,09

Figura 21. Regressões lineares entre o acúmulo foliar de cobre (μg/gMS), os valores de temperatura (°C) e a concentração de açúcar total em plantas de *Lolium multiflorum* expostas por 28 dias em Congonhas e na casa de vegetação. Análises realizadas nos meses de junho (2001) a abril (2002). Regressões lineares com $p < 0,05$ são significativas.

A figura 22 mostra o resultado da Análise de Componentes Principais (ACP) incluindo variáveis biológicas (acúmulo de açúcares solúveis e frutose total, metais pesados e enxofre) e as variáveis do ambiente (temperatura média, umidade relativa do ar, MP₁₀, SO₂ e NO₂). A análise resumiu 68% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação, sendo o primeiro eixo o que mais contribuiu para a análise (49%) (Figura 22, Tabela 6).

Figura 22. Análise de componentes principais (ACP) para a média das unidades amostrais ao longo do período de estudo nos dois locais de exposição: (Δ) casa de vegetação e ($\blacktriangle$) Congonhas. T = temperatura; U = umidade relativa; MP = material particulado; SO₂ = dióxido de enxofre; NO₂ = dióxido de nitrogênio; Frutose = frutose total; Açúcar = açúcar solúvel total; Cu = cobre; Zn = zinco; Fe = ferro; Al = alumínio; Cd = cádmio; Pb = chumbo; Jn = junho; Ag = agosto; S = setembro; O = outubro; N = novembro; D = dezembro; Jan = janeiro; F = fevereiro; M = março e Ab = abril.

No lado negativo do eixo 1 (Figura 22), foram alocadas todas as unidades amostrais referentes ao ambiente poluído, sendo as unidades altamente associadas aos altos níveis de carboidratos, metais pesados e poluentes aéreos. A ACP também mostrou que as unidades amostrais de Congonhas nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, correspondentes à estação de verão, e nos meses de março e abril, correspondentes ao outono, estão relacionadas às maiores concentrações de carboidratos solúveis. Já as unidades amostrais do inverno e da primavera estão mais associadas aos maiores valores de poluentes aéreos e ao maior acúmulo de metais pesados. Diferentemente, no lado positivo do eixo 1, encontraram-se a maioria das unidades amostrais do local de referência, as quais apresentaram menores níveis de todas as variáveis consideradas. Assim, o eixo 1 representou a separação entre os dois locais de estudo.

Seis variáveis contribuíram mais ($r > 0,7$) para a ordenação do primeiro eixo (49%), que foram: ferro, chumbo, umidade relativa, material particulado e dióxidos de enxofre e de nitrogênio (Tabela 6). Já para o segundo eixo (19%), as variáveis que mais contribuíram ($r > 0,7$) foram açúcar total e temperatura (Tabela 6).

Tabela 6. Correlação das variáveis biológicas e ambientais com os componentes principais.

Variáveis	Componentes Principais	
	1	2
Frutose total	-0,373	-0,644
Açúcar solúvel total	-0,412	-0,755
Cobre	0,183	0,580
Zinco	-0,581	0,420
Ferro	-0,778	0,373
Alumínio	-0,528	0,036
Chumbo	-0,805	0,487
Cádmio	-0,112	0,453
Temperatura média	0,103	-0,846
Umidade relativa	-0,793	-0,266
Material particulado	-0,973	0,116
Dióxido de enxofre	-0,976	0,017
Dióxido de nitrogênio	-0,897	-0,116
Variação explicada	49%	19%

A análise multivariada “stepwise” demonstrou que 73% da variabilidade nos conteúdos de carboidratos solúveis em plantas expostas em Congonhas foram significativamente explicadas por uma combinação linear dos efeitos do acúmulo foliar de ferro, dos valores de temperatura e de umidade relativa, e dos níveis de material

particulado no ar (Tabela 7). A análise envolvendo frutose total demonstrou que 29% da variabilidade no conteúdo desse carboidrato puderam ser explicadas pela combinação linear dos efeitos do acúmulo de ferro e dos valores de temperatura. Assim, quanto maiores os valores de temperatura e de acúmulo de ferro, mais intensos eram os acúmulos de açúcar total e de frutose total neste local. Por outro lado, sob condições de alta umidade e de material particulado no ar, as plantas de *L. multiflorum* expostas em Congonhas acumularam menos açúcares totais (Tabela 7).

Tabela 7. Modelo previsto para as concentrações de carboidratos solúveis em plantas de *L. multiflorum* expostas no local poluído (Congonhas).

Variáveis	Coefficiente	p
Açúcar Total		
Constante = 469.69		
Concentração foliar de ferro	0,15	<0,000
Temperatura	24,62	<0,000
Umidade Relativa	-10,55	0,005
MP ₁₀	-3,03	0,016
$R^2 = 0,73$ ($p < 0,001$)		
Frutose total (log)		
Constante = -0.15		
Concentração foliar de ferro	0,00	0,032
Temperatura	0,08	0,003
$R^2 = 0,29$ ($p = 0,009$)		

DISCUSSÃO

O acúmulo de frutanos paralelo ao tempo de exposição das plantas de *Lolium multiflorum*, no experimento preliminar, nos dois locais de estudo (Figura 7), poderia estar relacionado, em parte, ao aumento na idade das plantas. Desse modo, o aumento no número e no tamanho das folhas poderiam favorecer o aumento da fotossíntese e, logo, a produção em excesso de fotossintetados, que ficariam acumulados na forma de frutanos, principalmente. O pequeno acúmulo de açúcar e frutose totais nas duas primeiras semanas de crescimento também pode, em parte, estar relacionado com a excisão das folhas no momento anterior à exposição, visto que a desfoliação provoca a

hidrólise dos frutanos já acumulados (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001), sendo o produto da hidrólise utilizado como fonte de energia e de carbono para o crescimento no período subsequente. Em outro trabalho, Morvan-Bertrand e colaboradores (1999) observaram que os frutanos presentes antes da desfoliação foram hidrolisados (perda de 93 a 100%) e a frutose resultante foi encontrada nas novas bases foliares, sugerindo que este fluxo pudesse ser usado para sustentar a divisão e alongamento celulares.

Na desfoliação de plantas de *Lolium perenne*, foi observado que o crescimento das plantas após esse evento envolveu duas fases diferentes: a primeira (0 a 6 dias) foi caracterizada pela mobilização de carboidratos tanto das raízes como do estolho para sustentar o desenvolvimento foliar na ausência de fluxo de fotossintetados; e a segunda (6-29 dias), foi caracterizada pelo aumento do conteúdo de carboidratos aos valores iniciais (antes da poda) (Prud'homme *et al.*, 1992). O mesmo padrão de mobilização de carboidratos foi verificado no presente trabalho (Figura 7), onde os valores médios de açúcar total (41,5 mg/gMS) e de frutose total (29,3 mg/gMS) antes da desfoliação (dados não mostrados) foram recuperados apenas na terceira semana de exposição (21 dias). Exceção feita para a amostra da casa de vegetação na primeira semana de exposição, que mostrou níveis mais elevados de açúcar total em comparação aos iniciais.

Em Congonhas, foi observado que em períodos de exposição mais prolongados (Figuras 8 e 9) houve acúmulo de frutanos de peso molecular maior, enquanto na casa de vegetação, o tempo de exposição influenciou menos no tamanho molecular médio dos polímeros de frutose. Desse modo, as condições atmosféricas de Congonhas interferiram no tamanho dos frutanos acumulados, o que foi demonstrado também no experimento sazonal.

De modo geral, os níveis de carboidratos solúveis acumulados em plantas de *L. multiflorum* expostas em Congonhas foram maiores do que nas plantas de referência (Figura 12) e linearmente influenciados pela combinação de variáveis climáticas e de poluição. No verão, devido aos maiores índices de precipitação e conseqüentemente menor contaminação atmosférica (Figura 10), o acúmulo de carboidratos solúveis pareceu ser pouco influenciado pelos poluentes (Figura 12). De acordo com o relatório de qualidade do ar da CETESB (2003), a ocorrência de precipitação pluviométrica, além de ser um indicador de que a atmosfera está instável, ou seja, com movimentos de ar que favorecem a dispersão de poluentes, promove a remoção dos mesmos, pois uma parcela significativa desses poluentes é incorporada à água da chuva. Além disso, o solo

úmido evita que haja ressuspensão das partículas para a atmosfera. Como todas essas condições ambientais são também propícias ao crescimento das plantas, teores foliares de elementos químicos tendem a diminuir, podendo suavizar também seus efeitos tóxicos.

Em ambos os locais de estudo, valores mais altos de temperatura tenderam a promover o acúmulo de carboidratos solúveis nas plantas, o que pode ser bem evidenciado nas plantas expostas em Congonhas durante o verão e o outono, e nas plantas da casa de vegetação durante o outono, principalmente (Figuras 12 e 22). Esse efeito da temperatura também é destacado pelas correlações de Pearson (Figura 21) que mostraram aumento significativo de açúcar total nas plantas dos dois locais de estudo. Em relação aos frutanos, estes resultados contrariam aqueles de Pollock & Lloyd (1987) e Pontis (1989), que observaram maior acúmulo de compostos de frutose em plantas expostas às baixas temperaturas de outono e de inverno em regiões de clima temperado. O acúmulo de frutanos foi interpretado por estes autores como uma estratégia de proteção das plantas contra o congelamento, devido à capacidade desses carboidratos de manterem um apropriado potencial osmótico nas células. Este mecanismo, no entanto, pode não ser relevante para plantas de *Lolium multiflorum* crescidas em São Paulo, onde as temperaturas de inverno raramente atingem valores menores que 10° C, ao contrário das regiões de clima temperado.

A síntese de futanos é diretamente relacionada com a taxa fotossintética e com o excesso na produção de fotoassimilados, como já mencionado anteriormente. Em contrapartida, a resposta fotossintética é dependente das condições ambientais, entre as quais temperatura e irradiância, a que está submetida uma planta em crescimento. Wilson & Cooper (1969), por exemplo, verificaram que células do mesófilo foliar de genótipos de *L. perenne* desenvolvidas sob temperaturas mais baixas (15 °C) tinham uma taxa fotossintética média maior do que células do mesmo tamanho produzidas sob temperaturas mais elevadas (21 °C). No presente trabalho, as diferenças na temperatura média dos dois locais de exposição ao longo do período de estudo foram muito pequenas (Figura 10), indicando que este fator tenha afetado igualmente a taxa fotossintética das plantas em ambos os locais.

No entanto, a resposta fotossintética à uma certa temperatura pode variar com a intensidade luminosa, conforme observado por Woledge & Dennis (1982). Estes autores observaram que o aumento da fotossíntese em relação ao aumento da temperatura foi

maior em plantas de *L. perenne* crescidas em temperaturas mais altas (25 °C). Porém, mesmo quando crescidas a temperaturas de 25 °C mas com menor intensidade luminosa, variedades de *Lolium* apresentavam menor temperatura ótima para fotossíntese (Charles-Edwards et al., 1971). Embora os dados de irradiância não tenham sido coletados no presente trabalho, sabe-se que seus valores são relativamente menores no local de referência, sugerindo que esse fator tenha contribuído para o menor acúmulo de carboidratos nas plantas expostas na casa de vegetação, uma vez que a taxa fotossintética seria reduzida. No entanto, a resposta fotossintética à irradiância pode variar tanto entre espécies como em uma mesma espécie e pode ser também afetada pelo ambiente no qual a planta cresce. Este processo ficou bem evidenciado no trabalho de Eagles (1967) que, ao comparar duas populações de *L. perenne* de regiões climáticas diferentes, observou que a população da Europa do Norte (clima temperado) alcançou saturação luminosa em intensidades luminosas menores do que a população mediterrânea (clima árido e quente). Durante o inverno, o acúmulo de frutanos nas bases foliares de *L. perenne* foi maior na população de clima temperado, que apresentava uma taxa respiratória três vezes menor do que a população de clima árido. Desse modo, o acúmulo de frutanos em condições de menor irradiância (casa de vegetação) no presente trabalho, poderia estar mais relacionado com balanços entre as taxas de fotossíntese e de respiração do que com o ponto de saturação luminosa.

O acúmulo foliar de metais pesados pelas plantas foram altos (Figuras 17, 18 e 19) e mostraram grande associação com as unidades amostrais de material particulado (Figura 22), confirmando tratar-se de uma espécie acumuladora de metais pesados (Domingos *et al.*, 1998). Observando as correlações de Pearson entre carboidratos e acúmulo de metais pesados (Tabelas 4 e 5), verificou-se que as correlações foram significativas e positivas apenas em relação ao ferro e ao chumbo, no caso da frutose total (Figura 20), e significativas e negativas em relação ao cobre, no caso de açúcar total (Figura 21). Esses dados também são evidenciados pela ACP (Figura 22).

Desse modo, embora o ferro seja um elemento essencial para as plantas superiores, estando envolvido em processos celulares vitais como a fotossíntese e a respiração, o excesso desse elemento também pode causar alterações fisiológicas. Em plantas de *Nicotiana plumbaginifolia*, por exemplo, foi observado que o excesso de ferro reduziu a taxa fotossintética em 40% enquanto que a taxa de respiração celular aumentou, assim como a atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (Kampfenkel *et al.*, 1995). Em relação ao chumbo, diversas mudanças bioquímicas já foram observadas

nas plantas em resposta a este metal, como redução no conteúdo de clorofila (Ewais, 1997; Xiong, 1997; Fargašová, 2001), carotenóides (Fargašová, 2001), proteínas (Kevresan *et al.*, 2001) e na atividade da nitrato redutase (Singh *et al.*, 1997; Kevresan *et al.*, 2001) e da fotossíntese (Kaznina *et al.*, 2005). Com esses efeitos, tais metais também poderiam ocasionar mudanças na quantidade e na qualidade do frutano acumulado.

Embora os conteúdos foliares de bário, cádmio, cobre e zinco não tenham sido identificados como fatores que explicam a variabilidade da concentração de frutanos, seus efeitos devem ser considerados uma vez que são metais predominantes no material particulado emitido por veículos automotores e por influenciarem a concentração de carboidratos em plantas (Darrall, 1989). No trabalho de Frossard e colaboradores (1989), por exemplo, foi verificado um aumento de 25%, 42% e 118% no conteúdo de frutanos em gramíneas do gênero *Lolium* expostas a elevadas concentrações de cádmio, cobre e zinco no solo, respectivamente. Já em relação ao bário, poucos estudos mostram o efeito desse metal em processos fisiológicos e metabólicos de plantas superiores, não sendo encontrado nenhum trabalho relacionado a carboidratos solúveis. Entretanto, seu aumento na atmosfera das grandes cidades de todo o mundo tem sido de grande importância, uma vez que esse metal vem sendo adicionado ao combustível em substituição ao chumbo (Monaci *et al.*, 2000). No Brasil, este processo ainda é recente, mas acredita-se que em um futuro próximo o bário será um importante componente do material particulado atmosférico. Por enquanto, como demonstrado no presente estudo, o chumbo ainda é um componente importante da poluição atmosférica em São Paulo.

Em outros trabalhos, os metais pesados têm sido relacionados com a redução no conteúdo de carboidratos, conforme observado no presente trabalho para o cobre (Figura 21). Este efeito poderia ser uma consequência da diminuição da taxa fotossintética, que poderia ser causada por efeitos dos poluentes restritos a esse processo (Stiborová *et al.*, 1987; Krupa, 1993; Yruela *et al.*, 1996) e por variações climáticas, ou ambos. Deve-se considerar que a fotossíntese pode ser mecanicamente reduzida pela obliteração dos estômatos pelo material particulado depositado na superfície foliar, o que também cria uma barreira contra a radiação solar. Ainda, conforme apontado pela análise multivariada (Tabela 7), não seria apropriado afirmar que entre os poluentes aéreos apenas o material particulado explicou as variações no conteúdo de carboidratos. Certamente outras substâncias emitidas por veículos com considerável fitotoxicidade, como os dióxidos de enxofre e de nitrogênio, poderiam ter interferido também no

metabolismo de carboidratos. A proximidade e o comprimento dos vetores na ACP são indicações dessa suposição (Figura 22).

A análise de correlação de Pearson (dados não mostrados) também indicou correlação significativa ($p < 0,05$) e relativamente alta ($r > 0,5$) entre os conteúdos foliares de zinco e alumínio e as concentrações atmosféricas de material particulado e dióxido de enxofre. O mesmo foi observado para os metais ferro e chumbo, que também mostraram correlação com as concentrações de dióxido de nitrogênio no ar. Esses dados foram confirmados pela ACP (Figura 22), que mostra a alta associação entre esses poluentes atmosféricos, especialmente MP_{10} , e os metais pesados acumulados nas folhas de *Lolium*. Entretanto, deve ser mencionado que o acúmulo foliar de um dado elemento não reflete, necessariamente, o nível de contaminação atmosférica, quando se realiza biomonitoramento com a espécie, com o objetivo de avaliar a qualidade do ar. Isto pode ser explicado, entre outros motivos, pelo fato da concentração do elemento ser uma medida relativa à biomassa. Assim, um acúmulo elevado de frutanos pode resultar da diminuição do crescimento e da produção de biomassa e, em consequência, maior acúmulo de elementos no tecido foliar.

Nas plantas da casa de vegetação, o acúmulo foliar de metais pesados geralmente foi inferior ao observado nas de Congonhas (Figuras 17, 18 e 19), mostrando que a escolha de uma casa de vegetação climatizada e com ar filtrado foi bastante importante para se alcançar uma situação ideal para referência em relação à contaminação atmosférica, apesar das restrições apontadas quanto a diferenças nas condições climáticas. Outro aspecto importante foi que, no caso do enxofre (Figura 17A), zinco (Figura 17C), ferro (Figura 18C) e chumbo (Figura 19B), não houve variação mensal significativa no acúmulo desses elementos nas plantas da casa de vegetação. Assim, esses elementos não explicariam a variação nos níveis de frutose ao longo do estudo. Na verdade, esta parece ter refletido uma sazonalidade natural no metabolismo de frutanos nessas plantas, talvez comandada pela sazonalidade de fatores climáticos, conforme comentado anteriormente.

O efeito da sazonalidade nos níveis de açúcar total foi mais fortemente explicado (73%) por fatores ambientais do que nos níveis de frutanos (29%), embora modelos lineares significativos foram propostos para ambos os casos (Tabela 7). Se for assumido que as análises de regressão consideram apenas os dados quantitativos, e que o principal componente da fração de açúcar total é frutose livre ou combinada, pode-se considerar que as concentrações de frutanos foram igualmente influenciadas por fatores urbanos.

Além disso, por serem carboidratos de reserva, os frutanos desempenham um papel importante em tamponar desequilíbrios temporários entre o suprimento de carbono fotossintético e a demanda de carbono para crescimento e desenvolvimento (Roth et al., 1997). No presente trabalho, a variação sazonal nas quantidades de frutanos foi provavelmente determinada por condições climáticas, especialmente temperatura e umidade, uma condição também imposta para as plantas da casa de vegetação, mas intensificada pela poluição aérea nas plantas de Congonhas.

Fatores urbanos claramente afetaram as proporções de membros individuais da série de frutanos em *L. multiflorum*, como verificado pelas análises de HPLC (Figuras 13 até 16) e GPC (Tabela 2). A poluição aérea pareceu estimular o acúmulo de frutanos com graus de polimerização intermediários, especialmente durante a primavera (Figura 14), verão (Figura 15) e outono (Figura 16). Este processo poderia ser interpretado como uma estratégia de curto prazo, isto é, de pronta utilização, uma vez que estes compostos seriam rapidamente mobilizados pela planta, principalmente durante uma situação de estresse (Guerrand et al., 1996), quando carbono é prontamente requerido para atender às demandas vitais da planta. Ao contrário, frutanos com alto grau de polimerização acumularam-se preferencialmente nas plantas do local de referência, estando seu uso mais relacionado a processos de longo prazo. Assim, os resultados observados na análise preliminar foram, em parte, confirmados na análise sazonal. No presente trabalho também foi observado que quando as concentrações de glicose, frutose e sacarose eram altas nas plantas de ambos os locais de estudo, as proporções de frutanos também eram maiores.

O presente trabalho mostrou que a concentração e a composição de carboidratos não-estruturais são indicadores de estresse imposto pelo ambiente urbano subtropical em plantas de *Lolium multiflorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. **Atmosfera** – Determinação da concentração de dióxido de enxofre, pelo método do peróxido de hidrogênio. NBR 12979, 1993.
- ABNT. **Material particulado em suspensão no ar ambiente** – Determinação da concentração total pelo método do amostrador de grande volume. NBR 9547, 1997.

- ANDREWS, P. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. **Biochemical Journal**, Great Britain, v. 96, p. 595-606, 1965.
- ARTAXO, P. & ORSINI, C. Pixe and receptor models applied to remote aerosol source apportionment in Brazil. **Nuclear Instruments and Methods in Physics research B**, v. 22, n. 1-3, p. 259-263, 1987.
- BAKER, A.J.M. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, p. 643:654, 1981.
- BAKER, A.J.M. & BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v. 1, p. 81-126, 1989.
- BENDER, M.M. & SMITH, D. Classification of starch- and fructosan- accumulating grasses as C-3 or C-4 species by carbon isotope analysis. **J. Brit. Grassland Soc.**, v. 28, p. 97-100, 1973.
- BRECKLE, C.W. Growth under heavy metals. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Eds). **Plant roots: the hidden half**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 351-373.
- BULBOVAS, P. **Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras de resistência da espécie à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP**. 2005. 108f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BUTTERS, B. & CHENERY, E.M. A rapid method for the determination of total sulphur in soils and plants. **Analyst**, London, v. 84, p. 239-245, 1959.
- CARVALHO, M.A.M & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. In: LAJOLO, F.M et al. **Fibra dietética em Iberoamérica: tecnología y salud – obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. cap. 5, p. 77-89.
- CETESB. **Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo**. Série Relatórios, 2003.
- CHARLES-EDWARDS, D.A.; CHARLES-EDWARDS, J.; COOPER, J.P. The influence of temperature on photosynthesis and transpiration in ten temperate grass varieties grown in four different environments. **Journal of Experimental Botany**, v. 22, p. 650-662, 1971.

COSTA, G.; SPITZ, E. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. **Plant Science**, v. 128, p. 131-140, 1997.

CUZZUOL, G.R.F. et al. Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 81-91, 2003.

DARRALL, N. M. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 12, p. 1-30, 1989.

DOMINGOS, M.; KLUMPP, A.; KLUMPP, G. Air pollution impact on the Atlantic forest in the Cubatão region, SP, Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 50, p. 230-236, 1998.

EAGLES, C.F. Apparent photosynthesis and respiration in populations of *Lolium perenne* from contrasting climatic regions. **Nature**, v. 215, p. 100-101, 1967.

EWAIS, E.A. Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. **Biologia Plantarum**, v. 39, p. 403-410, 1997.

FARGAŠOVÁ, A. Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. **Biologia Plantarum**, v. 44, p. 471-473, 2001.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, p. 203-208, 1993.

FROSSARD, R.; STADELMANN, F.X.; NIEDERHAUSER, J. Effects of different heavy metals on fructan, sugar and starch content of ryegrass. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 180-185, 1989.

GUERRAND, D.; PRUD'HOMME, M.P.; BOUCAUD, J. Fructan metabolism in expanding leaves, mature leaf sheaths and mature leaf blades of *Lolium perenne*. Fructan synthesis, fructosyltransferase and invertase activities. **New Phytologist**, v. 134, p. 205-214, 1996.

HENDRY, G.A.F. Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. **New Phytologist**, v. 106, p. 201-216, 1993.

HENDRY, G.A.F.; WALLACE, R.K. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, J.N. (Eds). **Science and Technology of Fructans**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 119-139.

- ISEJIMA, E.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; ZAIDAN, L.B.P. Fructan composition in adventitious tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by daylength. **New Phytologist**, v. 119, p. 149-154, 1991.
- KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants. **Plant Physiology**, v. 107, p. 725-735, 1995.
- KAZNINA, N.M. et al. Effect of lead on the photosynthetic apparatus of annual grasses. **Biology Bulletin**, v. 32, p. 147–150, 2005.
- KEVRESAN, S. et al. Nitrogen and protein metabolism in young pea plants as affected by different concentrations of nickel, cadmium, lead, and molybdenum. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p. 1633-1644, 2001.
- KRUPA, Z.A. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. **Physiologia Plantarum**, v. 88, p. 626-630, 1993.
- KÜPPER, H.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, v. 119, p. 305-311, 1999.
- MADHAVARAO, K.V.; SRESTY, T.V.S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, v. 157, p. 113-128, 2000.
- MARTINIS, B.S. **Caracterização química e biológica das partículas respiráveis (PM10) do material particulado atmosférico coletado em um sítio urbano da cidade de São Paulo**. 1997. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MONACI, F.; MONI, F.; LANCIOTTI, E.; GRECHI, D.; BARGAGLI, R. Biomonitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emission, in place of lead. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 321-327, 2000.
- MORVAN-BERTRAND, A. et al. Partitioning of reserve and newly assimilated carbon in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* during regrowth after defoliation: assessment by ¹³C steady-state labelling and carbohydrate analysis. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, p. 1097-1108, 1999.
- MORVAN-BERTRAND, A. et al. Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne* L. **Planta**, v. 213, p. 109-120, 2001.

- NOBEL, W. Standardisation of bioindication methods in Germany – status quo and prospects. In: KLUMPP, A. et al. (Eds). **Bioindication and air quality in European cities**: research, application, communication. Stuttgart: Verlag Günter Heimbach, 2002. p. 77-85.
- ORSINI, C.Q.; ARTAXO, P.; TABACNIKS, M.H. Trace elements in the urban aerosols of São Paulo. **Ciência e Cultura**, v. 36, p. 823-828, 1984.
- ORSINI, C.Q. et al. Characteristics of fine and coarse particles of natural and urban aerosols of Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 20, n. 11, p. 2259-2269, 1986.
- POLLOCK, C.J. Oligosaccharide intermediates of fructan synthesis in *Lolium temulentum*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2461-2465, 1982.
- POLLOCK, C.J.; LLOYD, E.J. The effect of low temperature upon starch, sucrose and fructan synthesis in leaves. **Annals of Botany**, v. 60, p. 231-235, 1987.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J. Fructan metabolism in grasses and cereals. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 77-101, 1991.
- PONTIS, H.G. Fructans and cold stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 148-150, 1989.
- PRAZNIK, W.; BECK, R.H.F. Application of gel permeation chromatographic systems to the determination of the molecular weight of inulin. **Journal of Chromatography**, v. 348, p. 187-197, 1985.
- PRUD'HOMME, M.P. et al. Carbohydrate content, fructan and sucrose enzyme activities in roots, stubble and leaves of ryegrass (*Lolium perenne* L.) as affected by source/sink modification after cutting. **Journal of Plant Physiology**, v. 140, p. 282-291, 1992.
- ROTH, A. et al. Fructan and fructan-metabolizing enzymes in the growth zone of barley leaves. **New Phytologist**, v. 136, p. 73-79, 1997.
- SALTZMAN, B.E. Modified nitrogen dioxide reagent for recording air analysers. **Analytical Chemistry**, v. 32, p. 135, 1960.
- SAMARAKOON, A.B.; RAUSER, W.E. Carbohydrate levels and photoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc. **Plant Physiology**, v. 63, p. 1165-1169, 1979.
- SINGH, R.P. et al. Response of higher plants to lead contaminated environment. **Chemosphere**, v. 34, p. 2467-2493, 1997.

STIBOROVÁ, M.; DITRICHOVÁ, M.; BREZINOVÁ, A. Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley and maize seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 29, p. 453-467, 1987.

STIBOROVA, M. Cd²⁺ ions affect the quaternary structure of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase from barley leaves. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 183, p. 371-378, 1988.

SUZUKI, M. Fructans in forage grasses with varying degrees of coldhardiness. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 224-231, 1989.

TABACNIKS, M.H. et al. Diagnóstico do ciclo diurno da concentração do aerossol atmosférico na Universidade de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Meteorologia, 8., 1994, Belo Horizonte. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Meteorologia**, v. 1, p. 108-109.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 13, p. 195-206, 1990.

VAN DEN ENDE, W.; ROOVER, J.D.; LAERE, A.V. Effect of nitrogen concentration on fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 2-8, 1999.

WAREING, P.F. Photoperiodism in wood plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 7, p. 191-214, 1956.

WEAST, R.C. **Handbook of chemistry and physics**. Boca Raton: CRC Press, 1984.

WILSON, D.; COOPER, J.P. Effect of temperature during growth on leaf anatomy and subsequent light-saturated photosynthesis among contrasting *Lolium* genotypes. **New Phytologist**, v. 68, p. 1115-1123, 1969.

WOLEDGE, J.; DENNIS, W.D. The effect of temperature on photosynthesis of ryegrass and white clover leaves. **Annals of Botany**, v. 50, p. 25-35, 1982.

XIONG, Z.T. Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. **Environmental Pollution**, v. 97, p. 275-279, 1997.

YRUELA, I. et al. Cu(II)-inhibitory effect on photosystem II from higher plants. A picosecond time-resolved fluorescence study. **Biochemistry**, v. 35, p. 9469-9474, 1996.

ZAGATTO, E.A.G. et al. **Manual de análise de plantas e águas empregando sistemas de injeção em fluxo**. Piracicaba: CENA/Universidade de São Paulo, 1981.

ZIMMERMAN, M.H.; BROWN, C.L. **Trees, structure and function**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 336p.

Capítulo 4

Variação diurna no acúmulo de frutanos em plantas de *Lolium multiflorum* Lam ssp. *italicum* Beck var. Lema expostas à poluição aérea urbana da cidade de São Paulo

Abstract: (Diurnal variation in fructan accumulation in plants of *Lolium multiflorum* Lam ssp. *italicum* Beck var. Lema exposed to urban air pollution in São Paulo city). Concentrations of soluble carbohydrates, especially of sucrose, starch and fructans, may vary along one day. This process seems to be related with climatic factors, which can affect the production, export and consumption of photosynthates in the leaves. In the same way, the levels of air pollutants can show some variation during the day because of differences in the vehicular traffic or in the climatic conditions during the day. The present study aimed at analyzing the diurnal relationships between the concentration of urban air pollutants, mainly nitrogen and sulfur dioxides and particulate material, among other environmental factors, leaf concentrations of heavy metals and changes in fructan accumulation in plants of *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* seasonally exposed to different conditions of air pollution in São Paulo city. Plants were exposed during two months in each season at Congonhas (site reached by high levels of air pollutants) and at glasshouse with filtered air (control situation). After this period of exposure, the concentrations of fructans and heavy metals (Al, Fe, Cu, Zn, Ba) were analyzed in leaves and roots of *L. multiflorum* taken along one day, in six different times (8, 10, 12, 14, 16, 18h). The analytical methods employed were those described in chapter 3. Results showed that the concentrations of fructans in plants exposed at the polluted site were lower in comparison with reference plants, in the same time that the accumulation of heavy metals was higher. Principal Component Analysis evidenced the differences between the two sites: the sample units of Congonhas were mainly associated to gaseous and particulate pollutants, and the sample units of glasshouse were mainly associated to climatic factors. Pearson correlations and the multivariate analysis showed that air pollutants were negatively related with fructan concentrations, while climatic data were positively related with these carbohydrates. Results suggest that the heavy metals accumulated in the plants seasonally affected the fructan accumulation. On the other hand, diurnal variations on this carbohydrate content seemed to be mainly related with changes in meteorological factors such as irradiance, temperature and relative humidity and in gaseous pollutants levels, such as NO₂ during the daytime.

Key words: fructan, *Lolium multiflorum*, heavy metal, air pollution, sulfur dioxide, nitrogen dioxide.

Resumo: As concentrações de carboidratos solúveis, especialmente de sacarose, amido e frutano, podem variar ao longo do dia. Este processo parece estar relacionado com fatores climáticos, que podem afetar a produção, exportação e consumo de fotoassimilados nas folhas. Do mesmo modo, os níveis de poluentes aéreos podem variar ao longo do dia devido a diferenças no tráfego de veículos ou nas condições climáticas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar as relações diurnas entre a concentração de poluentes aéreos urbanos, principalmente material particulado e dióxidos de enxofre e de nitrogênio, entre outros fatores ambientais, o acúmulo foliar de

metais e mudanças no acúmulo de frutanos em plantas de *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* expostas sazonalmente a diferentes condições de poluição do ar na cidade de São Paulo. Em cada estação do ano, as plantas foram expostas por dois meses em Congonhas (local poluído) e na casa de vegetação com ar filtrado (local de referência). Após esse período de exposição, a composição de frutanos e as concentrações de frutose total, enxofre e metais pesados (Al, Fe, Cu, Zn, Ba) foram determinadas em folhas e raízes de *L. multiflorum*, em seis horários diferentes ao longo de um único dia (8, 10, 12, 14, 16 e 18h). Os métodos analíticos empregados foram os mesmos relacionados no capítulo 3. Os resultados mostraram que as concentrações de frutanos nas plantas expostas no local poluído foram menores em comparação com as plantas do local de referência, enquanto que o acúmulo de metais pesados foi maior. Análises de componentes principais evidenciaram as diferenças entre os locais de estudo: as unidades amostrais de Congonhas se associaram principalmente aos poluentes gasosos e particulados, e as unidades amostrais da casa de vegetação se associaram aos fatores climáticos, principalmente. As correlações de Pearson e a análise multivariada mostraram que os poluentes aéreos se relacionam negativamente com as concentrações de frutanos, enquanto que os dados de clima se relacionam positivamente. Os resultados sugerem que os metais pesados acumulados nas plantas afetaram sazonalmente o acúmulo de frutanos. Por outro lado, as variações diurnas no conteúdo desse carboidrato pareceram estar principalmente relacionadas com as mudanças em fatores meteorológicos como irradiância, temperatura e umidade relativa e nos níveis de poluentes gasosos como NO₂ ao longo do dia.

Palavras-chave: frutano, *Lolium multiflorum*, metais pesados, poluição aérea, dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio.

INTRODUÇÃO

Na maioria dos vegetais superiores, os principais produtos finais da fotossíntese são a sacarose e o amido. Mas, em algumas espécies, carboidratos solúveis, como frutanos, oligossacarídeos da família da rafinose e polióis, são os principais compostos de reserva e/ou de translocação de carbono (Büchi *et al.*, 1998). Em Poaceae, por exemplo, os frutanos estão amplamente distribuídos, podendo ser encontrados em cereais como aveia, trigo e cevada e em gramíneas forrageiras, como as do gênero *Festuca*, *Agrostis*, *Lolium* e *Poa*. A diferença na estocagem de carboidratos dentro do reino vegetal parece ser uma estratégia associada às adaptações ao ambiente, porém as vantagens seletivas de uma forma sobre a outra ainda não foram completamente esclarecidas (Pollock *et al.*, 1999).

Além das diferenças no tipo de carboidrato armazenado, ocorrem variações sazonais e diurnas no conteúdo e na composição dos carboidratos não-estruturais, o que também reflete a importância deles nas adaptações ao ambiente. Nas espécies

acumuladoras de amido, as folhas sintetizam, durante o dia, a sacarose e o amido e, ao mesmo tempo, exportam sacarose para as demais partes da planta; no período noturno, esses carboidratos acumulados são mobilizados para manter o suprimento de sacarose e a respiração foliar (Lunn & Hatch, 1995). No caso de gramíneas forrageiras, as variações diurnas nos frutanos refletem-se no grau de digestibilidade e estão diretamente associadas a condições ambientais, em especial à intensidade luminosa (Ciavarella *et al.*, 2000). De acordo com Servaites *et al.* (1989), os carboidratos de reserva podem funcionar como um tampão contra mudanças na irradiância ao longo do dia, sendo remobilizados em períodos de baixa irradiância para suprir a demanda por carbono nos outros tecidos da planta.

Do mesmo modo que os carboidratos solúveis não-estruturais podem variar ao longo do dia, os poluentes atmosféricos também podem apresentar picos horários de concentração. Em muitos estudos, tem sido observada a existência de um ciclo diurno de concentração de poluentes atmosféricos, com um pico maior na parte da manhã e outro, menor, no final da tarde. Este é o caso, por exemplo, dos óxidos de nitrogênio e do material particulado (Tabacniks *et al.*, 1994; Mayer, 1999). De acordo com estes autores, o primeiro pico parece ocorrer porque a atmosfera ao nível do chão é mais estável pela manhã, enquanto o tráfego de veículos e as atividades industriais já se iniciaram. O segundo pico deve-se, provavelmente, ao aumento de tráfego no final da tarde. Em relação ao ozônio, o ciclo diurno deste poluente é caracterizado por um pico maior de concentração entre 10 e 16 horas, quando a intensidade luminosa é mais alta, e por um pico menor na madrugada, proveniente do transporte desse poluente de camadas mais altas da atmosfera para camadas mais baixas (CETESB, 2003; Mayer, 1999).

Considerando essas informações, o presente estudo teve como objetivos verificar se há variações na composição qualitativa e quantitativa de carboidratos solúveis ao longo de um dia, em plantas de *Lolium multiflorum* expostas nas quatro estações do ano em local da cidade de São Paulo altamente poluído por óxidos de enxofre e de nitrogênio e por material particulado contendo metais pesados. O trabalho objetivou também avaliar se o perfil dessas variações é diferente do verificado em plantas mantidas em ambiente com baixos níveis de poluição do ar e se este perfil é determinado por oscilações horárias na concentração dos poluentes ou por acúmulo foliar de metais ou por variações meteorológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Delineamento experimental

Nos anos de 2002 e 2003, as plantas de *Lolium multiflorum* foram cultivadas e expostas nos locais de estudo do mesmo modo que o descrito no capítulo anterior. Entretanto, os vasos, em número de 25, contendo as plantas bioindicadoras ficaram expostos nos respectivos locais de exposição por 2 meses, nas diferentes estações do ano (inverno de 2002, primavera de 2002, verão de 2003, outono de 2003 e inverno de 2003). No experimento, foram retiradas, ao final de cada exposição e a cada duas horas ao longo de um dia, a partir das 8h (8, 10, 12, 14, 16 e 18 horas), três amostras mistas de plantas, para análises de frutose total e de elementos químicos (metais pesados e enxofre). Em cada horário de amostragem, as folhas eram cortadas, pesadas e envolvidas em sacos de papel para posterior análise dos elementos químicos, enquanto que o caule era cortado, pesado e mergulhado em etanol 80% para posterior análise de frutanos. Nas estações de primavera e de outono, as raízes de *Lolium* também foram coletadas, seguindo a mesma metodologia de análise para os compostos mencionados. As coletas na casa de vegetação (local de referência) foram sempre feitas no dia posterior à realizada em Congonhas (local poluído).

Ao final das exposições de primavera/02, outono/03 e inverno/03, dos sete vasos sobressalentes, cinco foram levados ao laboratório para a determinação de alguns parâmetros de crescimento das plantas em cada local de estudo. Foram realizadas medidas de biomassa aérea e subterrânea, altura e número de folhas. Na exposição de verão, as plantas foram destruídas por atos de vandalismo, perdendo-se a coleta nesta estação. As medidas de biomassa aérea e subterrânea basearam-se na quantidade total de massa seca, em gramas, obtida em cada vaso de *Lolium multiflorum*. Assim, para cada estação do ano, foi realizada uma média dos valores de biomassa dos cinco vasos de plantas expostas em cada local de estudo. Já para a determinação da altura e do número de folhas, 40 indivíduos, de cada vaso, foram coletados ao acaso para medição e contagem, respectivamente.

A extração e análise dos carboidratos solúveis, em folhas e raízes, foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 2, enquanto que a extração e análise de metais pesados e enxofre seguiram a metodologia descrita no Capítulo 3.

Ao longo de todo o período de exposição, foram tomadas, com um termohigrógrafo, medidas contínuas de temperatura e umidade relativa do ar nos dois locais de estudo. O perfil diurno ao longo do dia de amostragem, em cada estação do ano, foi obtido por meio de medidas horárias da radiação fotossinteticamente ativa. Nas estações de inverno e primavera, no entanto, não foi possível realizar tais medidas. Além disso, o perfil da radiação fotossinteticamente ativa nas diferentes estações do ano foi estabelecido por meio de medidas descontínuas realizadas um dia por semana, ao redor das 12:00 h, com radiômetro portátil Li-Cor Li-185B.

Para caracterização das condições ambientais no local poluído durante o período experimental, foram obtidas, junto à CETESB, as concentrações horárias de material particulado e de dióxidos de enxofre e de nitrogênio. Os valores de precipitação foram obtidos por meio de medidas semanais realizadas com dois pluviômetros de PVC. Já as medidas da qualidade do ar na casa de vegetação foram feitas com um amostrador de grande volume de ar (AGV) para partículas com até 10 µm e também com um amostrador de pequeno volume de ar (APV Trigas) para coleta dos gases dióxido de enxofre e dióxido de nitrogênio, conforme metodologia descrita no Capítulo 3.

Diferenças nas concentrações de frutose total, metais pesados e enxofre ao longo do dia para as plantas expostas nos dois locais de estudo e nas diferentes estações anuais foram localizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida por análise de comparações múltiplas (teste de Student Newman Keuls). As relações entre o acúmulo foliar de elementos químicos, concentrações atmosféricas de poluentes e as alterações nas concentrações de carboidratos solúveis foram avaliadas através de testes de correlação e regressão. A relação entre os dados biológicos e os dados ambientais foi analisada qualitativamente por meio da Análise de Componentes Principais (ACP). A fim de verificar se as variações diurnas e sazonais no conteúdo de frutose total em plantas expostas em Congonhas poderiam ser previstas por oscilações no acúmulo foliar de metais pesados ou por variáveis ambientais (temperatura, umidade, intensidade luminosa e concentrações atmosféricas de MP₁₀, NO₂ e SO₂), foi realizada uma análise multivariada tipo “stepwise”, conforme descrita no capítulo anterior. Nessas análises de correlação, regressão, ACP e multivariada, utilizaram-se valores médios das variáveis ambientais correspondentes às 2 horas anteriores a cada amostragem ao longo do dia no local poluído. Na casa de vegetação, utilizaram-se os valores médios das concentrações de poluentes aéreos durante cada período de exposição.

RESULTADOS

a) Caracterização do ambiente nos locais de estudo

Dados médios de temperatura e de umidade relativa do ar obtidos a cada 2 horas, entre 6 e 18 horas de cada dia, nas diferentes estações do ano, são mostrados nas tabelas 8 e 9, assim como médias sazonais de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação são mostradas na tabela 10 para cada local de estudo.

Os maiores valores de temperatura ocorreram entre 12 e 16 horas nos dois locais de estudo, especialmente na estação de verão/03 (Tabela 8). Em geral, a temperatura em Congonhas foi maior do que na casa de vegetação, com exceção à registrada na estação de outono e nos horários de 12 às 18h na estação de inverno. Destaca-se também, que a variação nas médias horárias de temperatura na casa de vegetação foi menor em todas as estações do ano, o que reflete sua climatização. Ao contrário, em Congonhas houve maiores variações na temperatura média horária entre uma estação e outra. O mesmo pode ser verificado nos valores sazonais médios de temperatura (Tabela 10).

Em relação à variação diurna da umidade relativa do ar (Tabela 9), verifica-se que, no local poluído, o início (8h) e o fim do dia (18h) foram marcados por maiores valores de umidade, enquanto que entre 12 e 14 horas foram registrados os menores valores, em todas as estações do ano. Com exceção da estação de inverno/02, a umidade relativa do ar na casa de vegetação tendeu a diminuir até às 12 horas e depois a aumentar até o fim do dia. Observando os valores médios de umidade (Tabela 10), em Congonhas estes foram maiores do que na casa de vegetação, principalmente na estação de outono/03. No local de referência, destacam-se as duas estações de inverno com os maiores valores de umidade relativa do ar.

Já em relação à precipitação em Congonhas (Tabela 10), pode ser verificado que as estações de inverno foram mais secas, enquanto que o verão/03 foi a estação mais chuvosa.

Tabela 8. Valores médios de temperatura obtidos a cada 2 horas ao longo do período de exposição, nos dois locais de estudo das plantas de *Lolium multiflorum* e nas quatro estações do ano.

Local de Estudo	Estação do Ano	Horário de Registro da Temperatura (°C)					
		6-8h	8-10h	10-12h	12-14h	14-16h	16-18h
Congonhas	Inverno/02	18,9	21,5	24,1	22,6	21,0	19,6
	Primavera/02	20,7	23,0	25,4	24,7	24,1	21,2
	Verão/03	26,0	27,6	29,2	29,8	30,4	25,9
	Outono/03	17,0	20,1	23,2	23,5	23,8	19,4
	Inverno/03	16,7	20,3	23,9	24,0	24,0	19,1
Casa de Vegetação	Inverno/02	18,6	21,9	25,1	24,7	24,4	22,3
	Primavera/02	17,8	20,9	24,0	23,0	22,0	20,4
	Verão/03	21,4	22,8	24,3	24,1	24,0	22,2
	Outono/03	21,3	24,6	27,9	26,2	24,6	22,8
	Inverno/03	15,8	18,2	20,6	19,6	18,5	17,1

Tabela 9. Valores médios de umidade relativa do ar obtidos a cada 2 horas ao longo do período de exposição, nos dois locais de estudo das plantas de *Lolium multiflorum* e nas quatro estações do ano.

Local de Estudo	Estação do Ano	Horário de Registro da Umidade (%)					
		6-8h	8-10h	10-12h	12-14h	14-16h	16-18h
Congonhas	Inverno/02	70,5	58,5	46,6	52,9	59,2	68,6
	Primavera/02	77,1	66,0	54,9	58,1	61,3	74,4
	Verão/03	63,7	59,3	55,0	61,0	67,0	79,1
	Outono/03	81,8	66,0	50,2	60,0	69,8	81,8
	Inverno/03	89,5	75,2	60,8	62,2	63,7	80,7
Casa de Vegetação	Inverno/02	79,7	82,5	85,3	74,8	64,3	64,0
	Primavera/02	70,4	63,2	56,1	60,9	65,7	64,2
	Verão/03	70,2	64,1	58,1	60,1	62,2	63,4
	Outono/03	68,8	64,0	59,1	60,1	61,0	63,4
	Inverno/03	67,3	68,2	69,0	71,8	74,7	74,7

Tabela 10. Valores médios de temperatura (T), umidade relativa do ar (UR) e precipitação (P) nos locais de exposição das plantas de *Lolium multiflorum*, nas quatro estações do ano.

Estação do Ano	Congonhas			Casa de Vegetação		
	T (°C)	UR (%)	P (mm)	T (°C)	UR (%)	P (mm)
Inverno/02	19,1	71,8	102,4	20,8	76,1	*
Primavera/02	21,2	74,4	355,0	20,4	64,2	*
Verão/03	25,9	79,1	733,8	22,2	63,4	*
Outono/03	19,4	81,8	308,7	22,8	63,4	*
Inverno/03	19,1	80,7	16,3	17,1	74,7	*

*Valores inexistentes.

A Figura 23 mostra os valores de irradiância, registrados ao longo de um dia de coleta (Figura 23A), e os valores médios sazonais (Figura 23B) registrados em Congonhas e na casa de vegetação, nas diferentes estações do ano. De um modo geral, os valores de irradiância no local poluído foram mais altos do que no local de referência (Figuras 23A e B) e tenderam a aumentar às 12h, na maioria das estações, e depois a

diminuir até às 18h (Figura 23A). O padrão de variação sazonal da irradiância foi semelhante em ambos os locais de estudo, sendo que no verão/03 observaram-se os maiores valores e, nos invernos, os valores mais baixos (Figura 23B).

A Tabela 11 mostra as variações horárias nas concentrações de MP_{10} , NO_2 e SO_2 no local afetado pela poluição atmosférica, nas diferentes estações do ano. Na maioria das estações, observa-se que as maiores concentrações de MP_{10} foram encontradas no fim do dia, entre 16 e 18 horas. Em relação ao NO_2 , foi verificada tendência ao aumento nos níveis desse poluente ao longo do dia, em todas as estações do ano, com valores mais elevados também entre 16 e 18 horas. Já em relação ao SO_2 , seu padrão de variação diurna caracterizou-se por maiores valores às 10, 16 e 18 horas, na maioria das estações do ano.

Figura 23. (A) Valores horários de irradiância obtidos ao longo de um dia de amostragem, em Congonhas (símbolos cheios e linhas contínuas) e na casa de vegetação (símbolos vazios e linhas pontilhadas), nas estações de (●) verão/03, (▲) outono/03 e (■) inverno/03. (B) Valores médios sazonais de irradiância em (●) Congonhas e na (○) casa de vegetação nas diferentes estações do ano.

Tabela 11. Valores médios de (MP₁₀) material particulado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), (NO₂) dióxido de nitrogênio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) e (SO₂) dióxido de enxofre ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) obtidos a cada 2 horas ao longo do período de exposição em Congonhas, nas diferentes estações do ano.

Poluente Atmosférico	Estação do Ano	Horário de Registro dos Poluentes Atmosféricos					
		6-8h	8-10h	10-12h	12-14h	14-16h	16-18h
MP ₁₀	Inverno/02	71,9	60,1	59,7	71,9	82,3	87,6
	Primavera/02	76,2	79,4	89,5	92,1	106,2	114,7
	Verão/03	48,4	46,2	49,8	53,4	52,3	61,0
	Outono/03	36,4	34,3	37,0	40,4	50,0	51,6
	Inverno/03	62,3	57,1	61,4	58,0	66,1	79,9
NO ₂	Inverno/02	73,3	97,5	109,2	99,7	111,5	120,8
	Primavera/02	87,9	105,2	111,4	118,1	131,7	130,5
	Verão/03	69,8	87,3	87,1	92,0	100,1	102,6
	Outono/03	67,8	86,3	88,8	104,8	112,9	104,2
	Inverno/03	89,9	105,7	113,7	111,3	129,4	144,4
SO ₂	Inverno/02	23,8	26,6	23,1	20,7	24,9	29,4
	Primavera/02	20,9	23,6	21,8	20,8	26,0	27,4
	Verão/03	14,5	15,1	13,8	13,9	16,5	16,9
	Outono/03	17,8	18,0	16,9	19,3	23,2	23,5
	Inverno/03	19,9	23,0	19,9	19,4	25,7	33,3

Comparando as médias sazonais dos poluentes aéreos nos dois locais de estudo (Tabela 12), foi observado que o nível de contaminação aérea foi muito maior em Congonhas do que na casa de vegetação. Neste local, embora baixos, os maiores valores de poluentes foram encontrados na estação de inverno/02. Em Congonhas, os níveis de material particulado foram mais elevados na primavera/02; os níveis de NO₂ foram mais altos no inverno/03 e os teores de SO₂ foram maiores durante os dois invernos estudados.

Tabela 12. Variações sazonais nas concentrações de (MP₁₀) material particulado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), (NO₂) dióxido de nitrogênio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) e (SO₂) dióxido de enxofre ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) nos dois locais de estudo.

Estação do Ano	Congonhas			Casa de Vegetação		
	MP ₁₀	NO ₂	SO ₂	MP ₁₀	NO ₂	SO ₂
Inverno/02	75,1	91,2	23,8	11,8	10,0	3,6
Primavera/02	84,6	98,9	20,8	*	*	*
Verão/03	48,8	79,2	13,3	*	*	*
Outono/03	39,4	78,1	17,1	10,4	5,3	2,4
Inverno/03	68,5	106,8	23,4	8,2	7,1	0,0

* Dados não coletados.

b) Carboidratos solúveis

- *Parte aérea*

A Figura 24 mostra a variação diurna no conteúdo de frutose total nas plantas de *Lolium multiflorum* após exposição por dois meses, em cada estação do ano, em Congonhas (Figura 24A) e na casa de vegetação (Figura 24B). De um modo geral, observa-se que o nível de frutose total foi constante ao longo do dia na maioria das estações. Diferenças estatisticamente significativas entre os horários de exposição foram observadas no inverno/02, com a redução nos teores de frutose entre 12 e 14 horas nas plantas de Congonhas (Figura 24A) e, na primavera/02, com a redução desse carboidrato ao final do dia nas plantas da casa de vegetação (Figura 24B). Plantas expostas em Congonhas pareceram acumular menos frutanos do que as mantidas no local de referência, especialmente no inverno/02 e no verão/03.

Em geral, as análises qualitativas por HPAEC/PAD (Figuras 25 a 34) na parte aérea de *Lolium multiflorum* mostraram que as proporções de frutanos também variaram pouco ao longo do dia nos dois locais de estudo, comprovando os resultados quantitativos. Destaca-se, também, que a proporção de monossacarídeos e de frutanos de baixo e médio peso molecular foi maior do que a proporção de frutanos de alto peso molecular, tanto em Congonhas como na casa de vegetação.

Na estação de inverno/02 (Figuras 25 e 26), foram verificadas baixas proporções de frutanos, ao longo do dia, na parte aérea das plantas dos dois locais de estudo. Contudo, em Congonhas (Figura 25), a partir das 12 horas foi verificado um aumento nos frutanos de baixo peso molecular (tempo de retenção entre 5-10 min). As plantas da casa de vegetação (Figura 26) mostraram proporções menores de mono, di e oligossacarídeos, especialmente às 8 e 10 horas da manhã.

As análises realizadas na primavera/02 (Figuras 27 e 28) evidenciaram uma grande estabilidade no perfil cromatográfico dos frutanos da parte aérea de plantas de *L. multiflorum* expostas em Congonhas (Figura 27), mais do que nas cultivadas na casa de vegetação (Figura 28). Ao contrário do inverno/02, na primavera/02 foram verificadas proporções mais elevadas de mono, di e oligossacarídeos nas plantas da casa de vegetação (Figura 28).

No verão/03 (Figuras 29 e 30) e no outono/03 (Figuras 31 e 32) houve uma grande proporção de frutanos de todos os pesos moleculares na parte aérea de plantas expostas nos dois locais de estudo e ambos em níveis estáveis ao longo do dia. No

inverno de 2003 (Figuras 33 e 34), foi observado que as plantas de Congonhas (Figura 33) apresentaram proporções maiores de frutanos do que as plantas da casa de vegetação (Figura 34), ao contrário do observado nos resultados quantitativos. No local poluído, também se verificou uma redução na proporção de frutanos a partir das 14 horas durante esta estação, enquanto na casa de vegetação o padrão de distribuição desses carboidratos foi mais estável.

Figura 24. Variações diurnas no conteúdo de frutose total (mg/gMS) no caule de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses em (A) Congonhas e na (B) casa de vegetação, nas diferentes estações do ano. (▤) 8h; (□) 10h; (▥) 12h; (■) 14h; (▧) 16h e (▨) 18h. Letras comparam médias entre os horários de exposição em cada estação do ano. Os valores indicados com a mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Barras indicam o erro padrão. (*) Resultado não disponível.

Figura 25. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, em Congonhas: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h e **E** = 16h. Exposição realizada no **inverno/02**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 26. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, na casa de vegetação: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h e **E** = 16h. Exposição realizada no **inverno/02**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 27. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, em Congonhas: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada na **primavera/02**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 28. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, na casa de vegetação: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada na **primavera/02**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 29. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, em Congonhas: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada no **verão/03**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 30. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, na casa de vegetação: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada no **verão/03**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 31. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, em Congonhas: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada no **outono/03**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 32. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, na casa de vegetação: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada no **outono/03**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 33. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, em Congonhas: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada no **inverno/03**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 34. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros da parte aérea de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, na casa de vegetação: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada no **inverno/03**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

- *Raízes*

A Figura 35 mostra a variação de frutose total nas raízes de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses em Congonhas (Figura 35A) e na casa de vegetação (Figura 35B) nas estações de primavera e de outono. Observou-se que, no local poluído, não houve diferenças horárias significativas no conteúdo de frutose total nas estações do ano analisadas. Já no local de referência, as plantas apresentaram conteúdo de frutose total significativamente menor às 8 horas durante a primavera.

As análises qualitativas por HPAEC-PAD de raízes de plantas de *L. multiflorum* expostas em Congonhas (Figura 36), durante a primavera, mostraram que as proporções de frutanos foram constantes ao longo do dia e mais elevadas que aquelas da casa de vegetação (Figura 37), confirmando os resultados quantitativos. No local de referência, destacaram-se também as baixas proporções de mono e dissacarídeos às 8 horas, quando o conteúdo de frutose total foi significativamente menor (Figura 24B).

No outono (Figuras 38 e 39), as proporções de frutanos de baixo e médio peso molecular tenderam a ser bem maiores do que as da primavera (Figuras 36 e 37) e aquelas da parte aérea (Figuras 31 e 32). As plantas da casa de vegetação (Figura 39) apresentaram maiores proporções de mono e dissacarídeos na maioria dos horários de exposição.

Figura 35. Variações diurnas no conteúdo de frutose total (mg/gMS) em raízes de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses em (A) Congonhas e na (B) casa de vegetação, na primavera e outono de 2003. (◻) 8h; (◻) 10h; (◻) 12h; (■) 14h; (◻) 16h e (■) 18h. Letras comparam médias entre os horários de exposição em cada estação do ano. Os valores indicados com a mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Barras indicam o erro padrão.

Figura 36. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros das raízes de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, em Congonhas: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada na **primavera/02**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 37. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros das raízes de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, na casa de vegetação: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada na **primavera/02**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 38. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros das raízes de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, em Congonhas: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada no **outono/03**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

Figura 39. Análise por HPAEC/PAD em coluna Carbo-Pac PA 1 dos carboidratos solúveis neutros das raízes de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por dois meses, ao longo do dia, na casa de vegetação: **A** = 8h; **B** = 10h; **C** = 12h; **D** = 14h; **E** = 16h e **F** = 18h. Exposição realizada no **outono/03**. Amostras contendo o equivalente a 1,6 mg/ml de frutose total. **M** = monossacarídeos; **S** = sacarose; **F** = frutanos.

c) Elementos químicos

As concentrações diurnas de metais pesados e enxofre acumulados em folhas e raízes de plantas de *Lolium multiflorum*, expostas por dois meses nos dois locais de estudo e nas diferentes estações do ano, não variaram significativamente ao longo do dia, na maioria dos casos (dados não mostrados). Logo, procurou-se identificar estatisticamente apenas diferenças entre locais e entre estações do ano, conforme será mostrado na figura 40.

As concentrações de cobre (Figura 40A) em folhas de *Lolium multiflorum* expostas no local poluído foram maiores no inverno/03, enquanto que na casa de vegetação, os maiores valores foram observados durante a primavera e o verão. As plantas de Congonhas apresentaram teores de cobre mais elevados nos dois invernos analisados e, significativamente menores durante a primavera, em comparação às plantas do local de referência. Em relação às raízes, plantas expostas no outono acumularam mais cobre do que as plantas expostas na primavera, em ambos os locais de exposição.

O acúmulo foliar de zinco (Figura 40B) foi elevado nas estações de inverno e do verão nas plantas de Congonhas, e nas estações de primavera, verão e outono nas plantas da casa de vegetação. Com exceção da primavera, plantas do local poluído acumularam níveis significativamente maiores de zinco do que as plantas de referência. Nas raízes, as concentrações desse metal foram semelhantes entre os locais de estudo e as estações do ano.

Em Congonhas, os níveis de bário (Figura 40C) em folhas de *L. multiflorum* expostas no outono e no inverno/03 foram mais elevados do que aqueles encontrados nas demais estações. Na casa de vegetação, plantas expostas durante o inverno/02 e a primavera mostraram níveis mais reduzidos de bário. Comparando os dois locais de exposição, observou-se que não houve diferenças significativas no acúmulo foliar desse metal. Por outro lado, níveis de bário foram consideravelmente maiores nas raízes de plantas expostas na casa de vegetação. Em relação à estação do ano, raízes de plantas expostas no outono acumularam mais bário do que aquelas da primavera, em ambos os locais.

Plantas de *L. multiflorum* expostas no local poluído e nos dois invernos analisados apresentaram altos teores de ferro (Figura 40D). Nessas estações, ao contrário, plantas do local de referência mostraram os níveis mais reduzidos desse

metal. Nas plantas de Congonhas, o acúmulo foliar de ferro foi significativamente maior do que o das plantas de referência, em todas as estações do ano. Já o acúmulo de ferro nas raízes foi similar nas plantas expostas em ambos os locais e períodos de estudo.

As concentrações de alumínio (Figura 40E) nas plantas do local poluído expostas nos dois invernos foram mais elevadas do que às das demais estações e também em relação às plantas do local de referência. Em ambos os locais de estudo, raízes de plantas expostas no outono mostraram maior acúmulo de alumínio do que raízes de plantas expostas na primavera.

Em relação ao acúmulo foliar de enxofre (Figura 40E), níveis mais reduzidos desse elemento foram encontrados nas plantas de ambos os locais no inverno/02. Nesta estação e no inverno seguinte, as plantas do local poluído acumularam maiores teores de enxofre do que as plantas da casa de vegetação. Estas, por sua vez, apresentaram um maior acúmulo desse elemento durante a primavera. Na parte subterrânea, observou-se que plantas expostas na primavera mostraram conteúdos mais elevados de enxofre do que as de outono, em ambos locais. Nas duas estações estudadas, raízes de plantas do local poluído acumularam concentrações significativamente mais elevadas de enxofre do que raízes de plantas do local de referência.

Figura 40. Variação sazonal nos conteúdos de cobre ($\mu\text{g/gMS}$), zinco ($\mu\text{g/gMS}$), bário ($\mu\text{g/gMS}$), ferro ($\mu\text{g/gMS}$), alumínio ($\mu\text{g/gMS}$) e enxofre (mg/gMS) acumulados nas folhas e raízes de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por 2 meses, nos dois locais de estudo, nas estações de (□) inverno/02, (■) primavera/02, (▤) verão/03, (▥) outono/03 e (▧) inverno/03. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as médias obtidas nas estações do ano, em cada local. (*) Mostra o local significativamente diferente do outro, em cada estação do ano. Barras indicam o erro padrão.

Excluído:

d) Relações entre variáveis biológicas e ambientais

- Parte aérea

As análises de correlação de Pearson entre as variáveis biológicas e ambientais ao longo do dia (Tabela 13) foram negativas e significativas para cobre, ferro, alumínio e dióxidos de enxofre e de nitrogênio nas plantas expostas em Congonhas, e para o enxofre nas plantas da casa de vegetação. No local poluído também foram verificadas correlações positivas e significativas com a temperatura e a irradiância. Já na casa de vegetação, temperatura, dióxido de enxofre e material particulado influenciaram positivamente o acúmulo de frutose total.

Tabela 13. Coeficiente de correlação de Pearson (R) entre os dados biológicos e ambientais em folhas de *Lolium multiflorum* expostas por 2 meses em Congonhas e na casa de vegetação.

	Frutose Total			
	Congonhas		Casa de Vegetação	
	R	p	R	p
Cobre	-0,74	< 0,01	-0,35	0,06
Zinco	-0,30	0,11	0,19	0,32
Ferro	-0,73	< 0,01	0,01	0,94
Alumínio	-0,65	< 0,01	-0,24	0,21
Bário	-0,35	0,06	-0,15	0,45
Enxofre	0,17	0,37	-0,46	0,01
Dióxido de Enxofre	-0,66	< 0,01	0,60	< 0,01
Dióxido de Nitrogênio	-0,44	0,02	0,26	0,16
Material Particulado (10μm)	-0,24	0,21	0,60	< 0,01
Temperatura Média	0,58	< 0,01	0,42	0,02
Umidade Relativa	-0,06	0,75	0,12	0,54
Irradiância	0,61	0,01	-0,23	0,41

A Figura 41 mostra a Análise Multivariada de Componentes Principais (ACP) considerando as variáveis biológicas (acúmulo foliar de frutose total, metais pesados e enxofre) e as variáveis do ambiente (temperatura média, umidade relativa do ar, irradiância, material particulado; dióxido de enxofre e dióxido de nitrogênio).

A ACP resumiu 67% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação, sendo o primeiro eixo o que mais contribuiu para a análise (53%). Quatro variáveis contribuíram mais ($r > 0,8$) para a ordenação do primeiro eixo, que foram: ferro, material particulado e dióxidos de enxofre e de nitrogênio (Tabela 15). Este eixo separou claramente os dois locais de estudo,

permanecendo as unidades amostrais da casa de vegetação do lado positivo do eixo e as unidades amostrais de Congonhas do lado negativo. Desse modo, as unidades amostrais do local poluído estão mais relacionadas com os metais pesados, enxofre, temperatura e poluentes gasosos do que as unidades amostrais da casa de vegetação, as quais estão mais relacionadas à frutose total, irradiância e umidade relativa do ar.

Tabela 15. Correlação das variáveis biológicas e ambientais (n = 58) com os componentes principais.

Variáveis	Eixo 1	Eixo 2
Frutose	0,615	-0,488
Cobre	-0,720	0,226
Zinco	-0,798	-0,280
Ferro	-0,910	0,080
Alumínio	-0,776	0,199
Enxofre	-0,125	0,093
Bário	-0,181	0,256
Temperatura	-0,079	-0,881
Umidade Relativa	0,138	0,481
Irradiância	0,085	-0,823
Material Particulado	-0,893	-0,101
Dióxido de Enxofre	-0,953	-0,058
Dióxido de Nitrogênio	-0,946	-0,132
Variação Explicada	53%	14%

A ACP também mostrou que as unidades amostrais de Congonhas, das estações de inverno, estão relacionadas às altas concentrações de metais, enxofre e de poluentes gasosos e às menores concentrações de frutose total, enquanto que as unidades amostrais da primavera, verão e outono estão mais relacionadas às altas condições de temperatura e de irradiância e aos maiores valores de frutose total. Na casa de vegetação, as unidades amostrais do inverno e da primavera relacionaram-se aos maiores valores de umidade, metais e de poluentes gasosos e aos baixos valores de temperatura e irradiância. As unidades amostrais do verão e do outono mostraram grande associação com a frutose total.

Figura 41. Análise multivariada de componentes principais (ACP) para a média diária das unidades amostrais em folhas de *L. multiflorum* ao longo do período de estudo nos dois locais de exposição: (▲) Congonhas e (△) casa de vegetação. Amostragens realizadas ao longo de um dia no **Inv** = inverno/02; **Pri** = primavera/02; **Ver** = verão/03; **Out** = outono/03 e **Inv/03** = inverno/03. **Fru** = frutose total; **Cu** = cobre; **Zn** = zinco; **Fe** = ferro; **Al** = alumínio; **Ba** = bário; **S** = enxofre; **NO₂** = dióxido de nitrogênio; **SO₂** = dióxido de enxofre; **MP** = material particulado; **Luz** = irradiância; **T°C** = temperatura e **U%** = umidade relativa.

A análise multivariada “stepwise” demonstrou que 90% da variabilidade no conteúdo de frutose total em plantas expostas em Congonhas foram significativamente explicadas por uma combinação linear dos efeitos dos níveis de dióxido de nitrogênio no ar e dos valores de temperatura e umidade relativa (Tabela 17). Assim, quanto maior os valores de temperatura e umidade, e menores as concentrações de dióxido de nitrogênio na atmosfera, mais intenso foi o acúmulo de frutose total no caule de plantas de *L. multiflorum* expostas em Congonhas (Tabela 17).

Tabela 17. Modelo previsto para a concentração de frutose total na parte aérea de *L. multiflorum* expostas no local poluído (Congonhas).

Variáveis	Coefficiente	<i>p</i>
Frutose Total		
Constante = -175,66		
Temperatura	15,70	<0,001
Umidade Relativa	3,85	<0,001
NO₂	-2,25	<0,001
$R^2 = 0,90$ ($p < 0,0001$)		

- *Raiz*

Nas raízes, as análises de correlação de Pearson entre as variáveis biológicas e ambientais ao longo do dia (Tabela 14) foram negativas e significativas para alumínio, bário e irradiância nas plantas expostas em Congonhas, e para ferro, enxofre e dióxido de nitrogênio nas plantas da casa de vegetação. Já relações positivas e significativas foram encontradas para enxofre, material particulado e dióxidos de enxofre e de nitrogênio nas plantas do local poluído, e para dióxido de enxofre, material particulado e temperatura nas plantas do local de referência.

Tabela 14. Coeficiente de correlação de Pearson (R) entre os dados biológicos e ambientais em raízes de *Lolium multiflorum* expostas por 2 meses em Congonhas e na casa de vegetação.

	Frutose Total			
	Congonhas		Casa de Vegetação	
	R	p	R	p
Cobre	-0,45	0,14	-0,16	0,61
Zinco	-0,24	0,45	-0,35	0,26
Ferro	-0,33	0,29	-0,62	0,03
Alumínio	-0,81	< 0,01	0,47	0,12
Bário	-0,68	0,01	0,53	0,09
Enxofre	0,69	0,01	-0,69	0,01
Dióxido de Enxofre	0,73	< 0,01	0,83	< 0,01
Dióxido de Nitrogênio	0,77	< 0,01	-0,83	< 0,01
Material Particulado (10μm)	0,86	< 0,01	0,83	< 0,01
Temperatura Média	0,54	0,07	0,79	< 0,01
Umidade Relativa	-0,16	0,61	-0,32	0,31
Irradiância	-0,84	0,04	0,70	0,12

A ACP incluída na Figura 42 resumiu 62% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação, sendo o primeiro eixo o que mais contribuiu para a análise (45%). Três variáveis contribuíram mais ($r > 0,8$) para a ordenação do primeiro eixo, que foram: material particulado e dióxidos de enxofre e de nitrogênio (Tabela 16). Assim como para os dados da parte aérea, esse eixo separou claramente os dois locais de estudo, permanecendo as unidades amostrais da casa de vegetação do lado positivo do eixo e as unidades amostrais de Congonhas do lado negativo. Desse modo, as unidades amostrais do local poluído estão mais relacionadas com o zinco, ferro, cobre, enxofre, poluentes gasosos, material particulado e umidade do que as unidades amostrais da casa de vegetação, as quais estão mais relacionadas à frutose total, temperatura, irradiância e aos demais metais pesados.

Tabela 16. Correlação das variáveis biológicas (raiz) e ambientais (n = 24) com os componentes principais.

Variáveis	Eixo 1	Eixo 2
Frutose	0,261	0,789
Cobre	-0,102	-0,279
Zinco	-0,157	-0,527
Ferro	-0,007	-0,623
Alumínio	0,546	-0,176
Enxofre	-0,750	-0,207
Bário	0,720	0,193
Temperatura	0,176	0,848
Umidade Relativa	-0,230	-0,465
Irradiância	0,514	0,488
Material Particulado	-0,943	0,269
Dióxido de Enxofre	-0,917	0,140
Dióxido de Nitrogênio	-0,923	0,171
Variação Explicada	45%	17%

Em Congonhas (Figura 42), as unidades amostrais da primavera ficaram separadas daquelas do outono, e estiveram mais relacionadas às altas concentrações de poluentes gasosos, assim como aos maiores valores de frutose, temperatura e bário. No outono, as unidades amostrais se relacionaram às altas condições de umidade e aos maiores valores de cobre, alumínio, ferro, zinco e enxofre. Na casa de vegetação, as unidades amostrais da primavera apresentaram baixa associação com os valores de poluentes gasosos, porém alta associação com a maioria dos metais.

A análise multivariada “stepwise” demonstrou que 61% da variabilidade no conteúdo de frutose total em plantas expostas em Congonhas foram significativamente explicadas por uma combinação linear dos efeitos do acúmulo de bário nas raízes e dos valores de temperatura e de umidade relativa do ar (Tabela 18). Assim, quanto maior os valores de temperatura e de umidade, e menores as concentrações de bário, mais intenso foi o acúmulo de frutose total nas raízes de plantas de *L. multiflorum* expostas em Congonhas (Tabela 17).

Tabela 18. Modelo previsto para a concentração de frutose total em raízes de *L. multiflorum* expostas no local poluído (Congonhas).

Variáveis	Coefficiente	p
Frutose Total (log10)		
Constante = -1,20		
Umidade relativa	0,014	0,010
Temperatura	0,085	<0,001
Concentração foliar de bário	-0,000	0,027
$R^2 = 0,61$ ($p = 0,0002$)		

e) Crescimento

A Figura 43 mostra os dados de crescimento das plantas de *Lolium multiflorum* expostas durante dois meses, nos dois locais de estudo, nas estações de primavera/02, outono/03 e inverno/03. De um modo geral, observa-se que os valores obtidos para as plantas dos dois locais de estudo foram semelhantes dentro de cada estação do ano, com algumas exceções que serão destacadas a seguir.

Em Congonhas, as plantas expostas na estação de primavera/02 apresentaram biomassa aérea significativamente superior em comparação às plantas expostas nas demais estações do ano e às plantas expostas na casa de vegetação. Ainda na primavera/02, a biomassa das raízes de *L. multiflorum* expostas em ambos os locais de estudo (Figura 43B) destacaram-se pelo desenvolvimento significativamente menor do que aquele observado nas plantas expostas nas outras estações do ano. Nessa estação, as plantas de Congonhas apresentaram biomassa subterrânea significativamente maior do que as plantas da casa de vegetação. Destaca-se também que, na primavera, a biomassa da parte aérea tendeu a ser maior que a da parte subterrânea nas plantas de ambos os locais, ao contrário do outono e do inverno/03, que apresentaram biomassa da raiz mais elevada que da parte aérea.

Plantas de *L. multiflorum* expostas em Congonhas (Figura 43C) alcançaram altura significativamente maior na primavera/02 e, em seguida, no inverno/03 e no outono/03. Já na casa de vegetação, a máxima altura atingida ocorreu no outono/03. Comparando os dois locais de exposição, dentro de uma mesma estação do ano, observa-se que os valores de altura máxima das plantas de Congonhas foram significativamente mais elevados que os valores do local de referência durante a estação de primavera/02, enquanto que os valores do outono/03 e do inverno/03 na casa de vegetação, foram significativamente maiores que os encontrados no local poluído. Em relação aos valores de altura mínima (Figura 43D), pode-se destacar que as plantas da casa de vegetação apresentaram maiores valores dessa medida na estação de outono/03, tanto em comparação às demais estações do ano, como ao outro local de estudo.

A razão de biomassa entre a raiz e a parte aérea de *Lolium multiflorum* (Figura 43E) foi maior nas plantas de Congonhas durante as estações de primavera e de outono em comparação às plantas da casa de vegetação. No local poluído, as plantas expostas na primavera apresentaram razão de biomassa raiz/parte aérea significativamente menor do que nas demais estações. Já no local de referência, essa razão também foi menor na primavera, seguida pelo outono e o inverno.

O número de plantas em cada estação do ano e local de estudo (Figura 43F) também variou significativamente. Em Congonhas, na estação de outono/03, verificou-se a menor quantidade de plantas, enquanto que na casa de vegetação, o número de plantas por vaso foi mais reduzido durante a primavera. No local de referência, também foi observado que o número de plantas durante a estação de outono/03 foi significativamente maior do que em Congonhas.

Figura 43. Biomassas aérea e subterrânea, alturas máxima e mínima, razão de biomassa e número de plantas de *Lolium multiflorum* expostas por 2 meses em Congonhas e na casa de vegetação nas estações de (■) primavera/02, (□) outono/03 e (▒) inverno/03. Letras comparam médias entre as estações do ano em cada local de estudo. Os valores indicados com a mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Barras indicam o erro padrão. (*) Mostra o valor significativamente mais elevado em um dos locais de estudo, em relação ao observado no outro local, dentro da mesma estação do ano.

Excluído: ¶

DISCUSSÃO

Em ambos os locais de estudo, as mudanças no conteúdo de frutose total ao longo das estações do ano foram evidentes (Figura 24). Destacou-se que plantas de Congonhas expostas no verão, caracterizado por altos valores de irradiância e níveis mais reduzidos de poluição atmosférica (Tabela 12), apresentaram as maiores concentrações daquele carboidrato, enquanto que as plantas expostas no inverno, destacado na literatura por propiciar condições climáticas ao acúmulo de frutanos em regiões de clima temperado (Pollock *et al.*, 1989), mostraram teores mais baixos de frutanos. Resultados semelhantes também foram mencionados no capítulo anterior. Além disso, a ação conjunta de fatores meteorológicos e de poluição aérea no ambiente urbano parece ter resultado na diminuição das concentrações de frutose total nas plantas de Congonhas, inclusive nos dois invernos analisados, quando comparados aos valores encontrados nas plantas da casa de vegetação.

De fato, ao se comparar os dois locais de estudo, fica evidente que as diferenças em relação aos fatores ambientais foram grandes. Congonhas, por exemplo, apresentou valores de poluentes consideravelmente mais elevados do que a casa de vegetação, o que poderia explicar os menores níveis de frutose total nas plantas daquele local (Darrall, 1989; Savitch *et al.*, 2000). Por outro lado, níveis reduzidos de poluição parecem ter contribuído para o acúmulo de frutanos nas plantas do local controle. Outro fator também importante foi a condição hídrica dos dois locais de estudo que, sendo menor na casa de vegetação, também pode ter contribuído para o aumento nas concentrações de frutose (De Roover *et al.*, 2000; Keles & Öncel, 2004). O efeito dos diferentes fatores ambientais no metabolismo de frutanos será melhor reportado ao longo desta discussão.

Contudo, a hipótese proposta de que também ocorreriam variações significativas nos níveis de frutose total ao longo do dia em função das oscilações horárias nos fatores ambientais não foi comprovada com a frequência esperada. Uma redução significativa nos níveis de frutose foi apenas observada em horários próximos do meio dia, nas plantas do local poluído expostas no inverno/02 e uma diminuição gradativa ao longo do dia nas plantas do local de referência expostas na primavera. Em Congonhas, esta redução parece estar mais associada com a irradiância, uma vez que os maiores valores de temperatura e os menores valores de umidade relativa do ar e de poluentes gasosos (NO_2 e SO_2) nestes horários, são condições aparentemente mais

propícias à produção de frutanos. Nesse caso, embora a irradiância não tenha sido medida nesta estação, sugere-se que uma provável redução em seus valores causada pela cobertura de nuvens, por exemplo, poderia ser o fator mais prontamente relacionado com o acúmulo de frutanos. Do mesmo modo, na casa de vegetação a diminuição gradual da irradiância ao longo do dia na amostragem da primavera poderia ter reduzido também os teores de frutose total. Na verdade, esses exemplos pontuais mostram que fatores ambientais específicos variam mais ou menos em cada dia dependendo da estação do ano. Por isso, ora poluentes parecem mais importantes na determinação do acúmulo de frutose e ora, menos importantes, assim como o clima. As análises estatísticas, que relacionaram os níveis de frutanos em folhas de *L. multiflorum* às mudanças ambientais, aliás, evidenciaram efeitos antagônicos de poluentes e de fatores climáticos sobre tais metabólitos. Isto poderia, inclusive, explicar as pequenas variações horárias ao longo de um único dia muitas vezes encontradas. De qualquer modo, a alta explicabilidade das oscilações nos níveis de frutose (90%), considerando todo o conjunto de dados, por fatores ambientais e por acúmulo foliar de metais (tabela 17) indica que a influência das mudanças hora a hora nessas variáveis independentes não pode ser desconsiderada.

Na literatura, os resultados encontrados para a variação diurna de carboidratos solúveis são os mais diversos. Ciavarella e colaboradores (2000) mostraram que os níveis de glicose, sacarose e de frutanos em *Phalaris aquatica* foram praticamente constantes ao longo do dia, diferentemente dos níveis de sacarose e de amido que tenderam a aumentar. Estes autores relacionaram o evento com a intensidade luminosa, as condições climáticas, a fertilidade do solo e os estágios de desenvolvimento das plantas. Em *Festuca arundinacea*, as concentrações dos carboidratos solúveis totais aumentaram linearmente ao longo do dia, enquanto que as concentrações de frutose e de frutanos não variaram (Lechtenberg *et al.*, 1972). Em um trabalho recente com diferentes cultivares dessa espécie, os autores relataram que picos de carboidratos não-estruturais e de sacarose ocorreram entre 16 e 18 horas (Shewmaker *et al.*, 2006). Já em *Lolium perenne*, os teores de carboidratos solúveis totais aumentaram somente na parte da manhã, mantendo-se estáveis à tarde e decaindo à noite. Nesta espécie, os frutanos variaram irregularmente ao longo do dia (Waite & Boyd, 1953). Assim, diferenças diurnas na produção, exportação e consumo de fotoassimilados em folhas parecem ser balanceados pela estocagem e mobilização da sacarose e do amido, principalmente (Sicher *et al.*, 1984), enquanto que os frutanos parecem ser a reserva usada

preferencialmente para o balanço sazonal devido a mudanças no desenvolvimento das plantas e nas condições climáticas (Pollock, 1979).

A concentração diurna de frutose total nas raízes (Figura 25) não acompanhou o mesmo padrão de variação da parte aérea, a qual apresentou o maior acúmulo de frutanos como mostrado pela literatura e já discutido no capítulo 2 (Volenec, 1986; Guerrand *et al.*, 1996). Na primavera, destacou-se o menor acúmulo de frutose total às 8h nas raízes da casa de vegetação, ao contrário da parte aérea, que apresentou neste horário a maior concentração desse carboidrato. Desse modo, parece que nesta estação ocorreu a mobilização de frutanos entre as diferentes partes da planta para permitir seu crescimento. Observou-se, ainda, que o acúmulo de frutose nas raízes foi diferente entre as duas estações do ano nos dois locais de exposição. Na primavera, as plantas do local poluído tenderam a acumular mais esse carboidrato, enquanto que no outono, foram as plantas do local de referência que tenderam ao maior acúmulo. De certa forma, tais resultados sugerem que os fatores ambientais influenciaram a partição de frutanos. Na literatura, muitos trabalhos sugerem que poluentes aéreos podem reduzir a alocação de carboidratos para a parte subterrânea em situações de estresse (Darrall, 1989; Wellburn and Wellburn, 1994; Szabo *et al.*, 2003), o que parece ter ocorrido no presente estudo.

As análises qualitativas dos carboidratos solúveis neutros (Figuras 26 a 39) apontaram a ocorrência de maiores proporções de frutanos de baixo e médio peso molecular nas plantas de *Lolium multiflorum*, ao contrário dos resultados encontrados na análise preliminar e incluídos no capítulo 3. Nesta análise, foi mostrado que plantas expostas por dois meses em Congonhas (Figura 8) apresentaram um aumento no peso molecular de seus frutanos. Desse modo, parece que, durante o estudo apresentado no presente capítulo, algum fator de estresse ambiental mais extremo, como alta temperatura, proporcionou a formação desses frutanos de tamanho intermediário ou, ainda, a hidrólise dos frutanos de alto peso molecular nos dois locais de estudo. Ainda, diferenças nas proporções de mono e dissacarídeos ao longo do dia entre os locais de exposição e as estações do ano foram observadas no presente capítulo, indicando que a mobilização de carboidratos, seja para a síntese ou para a hidrólise de frutanos, ocorreu em determinados horários do dia.

O acúmulo de metais pesados foi estável ao longo do dia, variando especialmente entre as estações. Este resultado era esperado uma vez que a absorção de metais pela planta acontece por vias mais lentas e indiretas do que a via de absorção de poluentes gasosos, que ocorre em paralelo às trocas gasosas. Conforme já mencionado,

a entrada de metais contidos no material particulado nas plantas pode-se dar via cutícula ou via raízes, sendo esta última a mais freqüente (Streit & Stumm, 1993; Wagner, 1993). Diferentemente do resultado obtido, poder-se-ia esperar, no máximo, um aumento crescente nas concentrações de metais pesados ao longo do dia, caso a planta tivesse uma capacidade extraordinária de acúmulo, o que parece não ser o caso da espécie em estudo. Assim, as poucas diferenças significativas encontradas entre os horários de exposição parecem refletir mais diferenças individuais nas plantas, do que diferenças no acúmulo daqueles compostos.

Os resultados também mostraram que o acúmulo de ferro e o alumínio foi preferencial nas raízes de *Lolium multiflorum* (Figura 52). Isto revela que o substrato foi a fonte predominante desses elementos para a planta, seja pela presença desses elementos no próprio substrato ou pela deposição de material particulado do ar no solo ao longo do período de exposição no ambiente poluído. Como colocado por Ouzounidou e colaboradores (1995), a retenção de metais tóxicos nas raízes pode conferir tolerância às plantas, uma vez que esse mecanismo impede seu transporte até as folhas.

Por meio da análise de componentes principais (Figuras 41 e 42), verificou-se que as relações entre concentrações de frutose total e variáveis ambientais foram muito distintas nos dois locais de exposição, tanto para a parte aérea como para as raízes. As unidades amostrais correspondentes a cada estação do ano ficaram próximas umas das outras, indicando que apresentam as mesmas características estacionais no acúmulo foliar de frutanos e de elementos químicos. Entretanto, é possível observar que, em determinados horários ao longo do dia, certas unidades amostrais se aproximaram mais ou menos de um dado fator biológico e/ou ambiental. Destaca-se também, que as variações ocorridas no acúmulo de frutose total nas plantas expostas no local poluído se relacionaram mais ao acúmulo de elementos químicos e à absorção de poluentes gasosos do ar do que as plantas do local de referência. Nestas, o acúmulo de frutanos associou-se mais às condições climáticas.

Avaliando as tendências gerais via correlações de Pearson e a análise multivariada, foi confirmada a ação conjunta de variações climáticas e de poluentes atmosféricos tanto entre os diferentes horários quanto entre as diferentes estações. Em Congonhas, de modo geral, metais e poluentes gasosos mostraram correlação negativa com o acúmulo de frutose total em folhas e raízes, enquanto que variáveis climáticas mostraram correlação positiva. A partir da análise multivariada, verificou-se que os

fatores ambientais, cujas oscilações determinaram conjuntamente as concentrações de frutose no caule de *L. multiflorum*, foram os meteorológicos (temperatura e umidade relativa) e o NO₂, que pode ser considerado como um indicador da poluição gasosa emitida pela extensa frota veicular que circula no local de exposição. Esses resultados são coerentes com os obtidos na ACP. Porém, as oscilações nas concentrações de metais pesados não foram suficientemente fortes a ponto de serem identificados pela análise multivariada, como causadores da variabilidade em frutose. Tal resultado reforça a idéia do capítulo anterior, em que os metais pesados possuem influência sazonal mais marcante no acúmulo de frutanos, enquanto que fatores climáticos e poluentes gasosos possuem rápida ação no metabolismo desses carboidratos, sendo capazes de alterar seus teores em curtos intervalos de tempo.

Em geral, os metais pesados exercem um efeito tóxico devido, principalmente, à sua interferência no transporte eletrônico da respiração e da fotossíntese e na inativação de enzimas vitais (Larcher, 2000). Ainda, alterações na taxa fotossintética podem ocorrer pelo sombreamento foliar causado pela deposição dos metais sobre as folhas, ou pelo aumento da temperatura foliar e da taxa de transpiração causados pela absorção de parte da radiação por esses compostos (Hirano *et al.*, 1995). Outras alterações também podem ser observadas em plantas expostas ao excesso de metais. No caso do cobre e do ferro, por exemplo, foram verificadas mudanças no estado óxido-redutor de substâncias vitais (Luna *et al.*, 1994; Kampfenkel *et al.*, 1995), enquanto que o alumínio inibiu o crescimento das raízes (Barcelo & Poschenrieder, 2002), reduziu a atividade fotossintética e a biomassa, além de causar deficiências nutricionais (Delhaize & Ryan, 1995). No caso de carboidratos solúveis, o único trabalho encontrado na literatura mostra que concentrações mais elevadas de metais pesados no solo aumentaram os conteúdos de sacarose e de frutanos em plantas de *Lolium perenne* (Frossard *et al.*, 1989), ao contrário do que foi encontrado no presente trabalho.

Em relação aos poluentes atmosféricos gasosos, sabe-se que o caminho da difusão do SO₂ e do NO₂ é o mesmo do dióxido de carbono, e também o gradiente de concentração entre a atmosfera e o ponto final da rota de transporte, os cloroplastos, é similar. Nas paredes das células vegetais, o SO₂ e o NO₂ são dissolvidos em água e seus produtos de reação, o ácido sulfuroso e o sulfito, e o ácido nítrico, respectivamente, são, então, distribuídos no interior da célula entre os cloroplastos, o citosol e o vacúolo. Com uma contínua absorção desses gases, a capacidade de tamponamento do citoplasma é ultrapassada, ocorrendo a acidificação das folhas (Larcher, 2000). Ainda, o SO₂ pode

ocupar o sítio de carboxilação da RuBP carboxilase, inibindo os processos secundários da fotossíntese (Pfanz *et al.*, 1987). Em relação aos efeitos nos carboidratos, Gould & Mansfield (1988) mostraram que os dióxidos de nitrogênio e de enxofre diminuíram o transporte de assimilados para as raízes, sendo esses acumulados nas partes mais jovens de trigo. Já Peace e colaboradores (1995), observaram uma redução nos níveis de carboidratos solúveis (sacarose e hexoses) em acículas de *Pinus sylvestris* e *Picea abies* expostas ao SO₂. Redução no nível de carboidratos e em sua alocação para as raízes também foi confirmada no presente trabalho, conforme já discutido.

No que diz respeito à influência dos fatores meteorológicos, os teores de frutanos realmente tendem a aumentar com o aumento da irradiância (Tabela 13), assim como os níveis de outros carboidratos (Savitch *et al.*, 2000). Entretanto, essas variações foram pontuais. Quando se avalia o conjunto de dados, os valores mais elevados de irradiância em Congonhas não contribuem para o aumento nos teores de frutose total nas plantas desse local nas diferentes estações do ano. Na verdade, a temperatura mostrou ser o fator climático mais relacionado com o acúmulo diurno e sazonal de frutanos. Assim, mais uma vez se confirma que as temperaturas elevadas das regiões subtropicais, quando comparadas às regiões de clima temperado, parecem ser um fator de estresse à espécie em estudo, acarretando aumento no teor desses compostos de reserva.

Os parâmetros de crescimento analisados (Figura 43) mostraram que as plantas de Congonhas apresentaram restrições em seu desenvolvimento, em relação ao comprimento das folhas, nas estações de outono e inverno, corroborando os dados da literatura que descrevem que a poluição atmosférica pode reduzir o crescimento de plantas (Darrall, 1989). Isto é um aspecto importante para uma planta indicadora de poluição aérea, como *Lolium multiflorum*, uma vez que sua eficiência em acumular metais pesados e enxofre pode ser influenciada por mudanças em seu crescimento. Mas, na primavera, as plantas de Congonhas cresceram mais do que as que estiveram na casa de vegetação, tanto em termos de biomassa da parte aérea e das raízes quanto em termos de comprimento de folhas. Parece que houve, assim, condições mais favoráveis à fotossíntese e ao crescimento no ambiente externo nesse período, como maior irradiância (Figura 23), que igualmente poderia resultar em mudanças na eficiência acumuladora da espécie. A infestação de pulgões ocorrida nesta época do ano nas plantas do local de referência pode ter causado, igualmente, restrições ao crescimento

das plantas mantidas na casa de vegetação e reduções no conteúdo de frutanos nas plantas durante esta estação (Figuras 24 e 25).

De acordo com Cooley & Manning (1987), era de se esperar que houvesse redução da biomassa de raízes em plantas expostas a poluentes gasosos, uma vez que a divisão celular é indiretamente afetada por este fator de estresse. No presente trabalho, no entanto, tal redução não foi verificada em plantas expostas no ambiente poluído, em comparação à biomassa radicial das plantas mantidas no ambiente não poluído. No entanto, ao verificar a razão de biomassa entre raiz e parte aérea (Figura 43), fica evidente que o ambiente poluído alterou essa partição, alocando proporcionalmente mais biomassa para as raízes do que para a parte aérea, na primavera e outono, o que resultou em aumento do valor dessa razão. Tais resultados mostram que a capacidade de acumular elementos tóxicos do ar e a eficiência biomonitora da cultivar Lema de *L. multiflorum* podem ser também afetadas devido a tais mudanças na partição de biomassa entre as partes das plantas, uma vez que suas concentrações são expressas de forma relativa à massa foliar seca. Logo, as concentrações dos elementos de interesse tendem a ser maiores no local poluído. Szabo e colaboradores (2003), trabalhando na região do pólo industrial de Cubatão, também observaram alterações significativas na razão raiz/parte aérea em plantas de *Tibouchina pulchra* mantidas em locais poluídos. Porém, ao contrário do que ocorreu no presente estudo, a razão foi reduzida em função da alocação proporcionalmente maior de biomassa para a parte aérea. Mudanças na razão de biomassa entre raízes e parte aérea também são freqüentes na literatura, conforme pode ser observado nos trabalhos de Rennenberg *et al.* (1996) e Yamaji *et al.* (2003).

Em ambos os locais de exposição, verificou-se também que nas estações de outono e de inverno as plantas alocaram mais biomassa nas raízes do que na parte aérea, ao contrário do verificado na primavera para as plantas da casa de vegetação. Desse modo, fica evidente a influência das condições climáticas na produção de biomassa em épocas mais favoráveis ao crescimento das plantas. Ainda, níveis mais reduzidos de frutose total nas raízes dessas plantas mostram que estes carboidratos poderiam estar sendo mobilizados para permitir o crescimento da parte aérea.

Os resultados do presente trabalho indicam que os metais pesados presentes no material particulado do ar afetaram os níveis de frutose total em plantas de *Lolium multiflorum* expostas à poluição aérea urbana da cidade de São Paulo em um período de tempo mais longo (sazonal), alterando o tamanho da molécula de frutano acumulado. Já

os poluentes gasosos (SO₂ e NO₂), a umidade relativa, a alta temperatura e irradiância, pareceram interferir na resposta horária (pontual) dos níveis daquele carboidrato, com mudanças, principalmente, na composição de outros carboidratos solúveis. Essas interferências chegaram também a influenciar a produção de biomassa e sua partição entre as partes da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 48, p. 75-92, 2002.
- BÜCHI, R.; BACHMAN, M.; KELLER, F. Carbohydrate metabolism in source leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.), a starch-storing and stachyose-translocating labiate. **Journal of Plant Physiology**, v. 153, p. 308-315, 1998.
- CETESB. **Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo**. Série Relatórios, 2003.
- CIAVARELLA, T.A.; SIMPSON, R.J.; DOVE, H.; LEURY, B.J.; SIMS, I.M. Diurnal changes in the concentration of water-soluble carbohydrates in *Phalaris aquatica* L. pasture in spring, and the effect of short-term shading. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 51, p. 749-756, 2000.
- COOLEY, D.R.; MANNING, W.J. The impact of ozone on assimilate partitioning in plants. A review. **Environmental Pollution**, v. 47, p. 95-113, 1987.
- DARRALL, N. M. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 12, p. 1-30, 1989.
- DE ROOVER, J.; VANDENBRANDEN, K.; VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). **Planta**, v. 210, p. 808-814, 2000.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v. 107, p. 315-321, 1995.
- FROSSARD, R.; STADELMANN, F.X.; NIEDERHAUSER, J. Effects of different heavy metals on fructan, sugar and starch content of ryegrass. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 180-185, 1989.

- GOULD, R.P.; MANSFIELD, T.A. Effects of sulphur dioxide and nitrogen dioxide on growth and translocation in winter wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 39, p. 389-399, 1988.
- GUERRAND, D.; PRUD'HOMME, M.P.; BOUCAUD, J. Fructan metabolism in expanding leaves, mature leaf sheaths and mature leaf blades of *Lolium perenne*. Fructan synthesis, fructosyltransferase and invertase activities. **New Phytologist**, v. 134, p. 205-214, 1996.
- HIRANO, T.; KIYOTA, M.; AIGA, I. Physical effects of dust on leaf physiology of cucumber and kidney bean plants. **Environmental pollution**, v. 89, p. 255-261, 1995.
- KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants. **Plant Physiology**, v. 107, p. 725-735, 1995.
- KELES, Y.; ÖNCEL, I. Growth and solute composition in two wheat species experiencing combined influence of stress conditions. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, p. 203-209, 2004.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMA Artes e Textos, 2000. 531p.
- LECHTENBERG, V.L.; HOLT, D.A.; YOUNGBERG, H.W. Diurnal variation in nonstructural carbohydrates of *Festuca arundinacea* (Schreb.) with and without N fertilizer. **Agronomy Journal**, v. 64, p. 302-305, 1972.
- LUNA, C.M.; GONZÁLEZ, C.A.; TRIPPI, V.S. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. **Plant Cell Physiology**, v. 35, p. 11-15, 1994.
- LUNN, J.E.; HATCH, M.D. Primary partitioning and storage of photosynthate in sucrose and starch in leaves of C4 plants. **Planta**, v. 197, p. 385-391, 1995.
- MAYER, H. Air pollution in cities. **Atmospheric Environment**, v. 33, p. 4029-4037, 1999.
- OUZOUNIDOU, G.; CIAMPOROVÁ, M.; MOUSTAKAS, M.; KARATAGLIS, S. Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress – I. growth, mineral content and ultrastructure of roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 35, p. 167-176, 1995.
- PEACE, E.A.; LEA, P.J.; DARRALL, N.M. The effect of open-air fumigation with SO₂ and O₃ on carbohydrate metabolism in Scots pine (*Pinus sylvestris*) and Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Cell and Environment**, v. 18, p. 277-283, 1995.
- PFANZ, H.; MARTINOIA, E.; LANGE, O.L.; HEBER, U. Flux of SO₂ into leaf cells and cellular acidification by SO₂. **Plant Physiology**, v. 85, p. 928-933, 1987.

- POLLOCK, C.J. Pathway of fructosan synthesis in leaf bases of *Dactylis glomerata*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 777-779, 1979.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J.; COLLIS, B.E.; WALKER, R.P. Direct effects of low temperature upon components of fructan metabolism in leaves of *Lolium temulentum* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 203-208, 1989.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J.; GALLAGHER, J.; CARVALHO, M.A.M.; KOCHHAR, A. The metabolism of sugars based upon sucrose. In: BRYANT, J.A.; BURRELL, M.M.; KRUGER, N.J. (Eds). **Plant carbohydrate biochemistry**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1999. p. 47-60.
- RENNENBERG, H.; HERSCHBACH, C.; POLLE, A. Consequences of air pollution on shoot-root interactions. **Journal of Plant Physiology**, v. 148, p. 296-301, 1996.
- SAVITCH, L.V.; HARNEY, T.; HUNER, N.P.A. Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. **Physiologia Plantarum**, v. 108, p. 270-278, 2000.
- SERVAITES, J.C.; FONDY, B.R.; LI, B.; GEIGER, D.R. Source of carbon for export from spinach leaves throughout the day. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1168-1174, 1989.
- SICHER, R.C.; KREMER, D.F.; HARRIS, W.G. Diurnal carbohydrate metabolism of barley primary leaves. **Plant Physiology**, v. 76, p. 165-169, 1984.
- SHEWMAKER, G.E.; MAYLAND, H.F.; ROBERTS, C.A.; HARRISON, P.A.; CHATTERTON, N.J.; SLEPER, D.A. Daily carbohydrate accumulation in eight tall fescue cultivars. **Grass and Forage Science**, v.61, p. 413-421, 2006.
- STREIT, B.; STUMM, W. Chemical properties of metals and the process of bioaccumulation in terrestrial plants. In: MARKERT, B. (Eds). **Plants as biomonitors**. Indicators for heavy metals in the Terrestrial Environment. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1993. p. 2-27.
- SZABO, A.V.; DOMINGOS, M.; RINALDI, M.C.S.; DELITTI, W.B.C. Acúmulo foliar de enxofre e suas relações com alterações no crescimento de plantas jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) expostas nas proximidades do pólo industrial de Cubatão, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 379-390, 2003.
- TABACNIKS, M.H.; MASSAMBANI, O.; ANDRADE, M.F.; GONÇALVES, F.L.T. Diagnóstico do ciclo diurno da concentração do aerossol atmosférico na Universidade de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METEOROLOGIA, 8, 1994, Belo Horizonte. **Anais**, v. 1, p. 108-109.

VOLENEC, J.J. Nonstructural carbohydrates in stem base components of tall fescue during regrowth. **Crop Science**, v. 26, p. 122-127, 1986.

WAGNER, G. Large-scale screening of heavy metals burdens in higher plants. In: MARKERT, B. (Eds). **Plants as biomonitors**. Indicators for heavy metals in the Terrestrial Environment. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1993. p. 425-434.

WAITE, R.; BOYD, J. The water-soluble carbohydrates of grasses. 1. changes occurring during the normal life-cycle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 4, p. 197-204, 1953.

WELLBURN, F.A.M.; WELLBURN, A.R. Atmospheric ozone affects carbohydrate allocation and winter hardiness of *Pinus halepensis* (Mill.). **Experimental Botany**, v. 45, p. 607-614, 1994.

YAMAJI, K.; JULKUNEN-TIITTO, R.; ROUSI, M.; FREIWALD, V.; OKSANEN, E. Ozone exposure over two growing seasons alters root-to-shoot ratio and chemical composition of birch (*Betula pendula* Roth). **Global Change Biology**, v. 9, p. 1363-1377, 2003.

Capítulo 5

Considerações finais e conclusões gerais

As plantas de *Lolium multiflorum* expostas por 2 meses em ambos os locais de estudo (capítulo 4) apresentaram teores muito mais elevados de frutanos do que as plantas expostas por 1 mês nos mesmos locais (capítulo 3), corroborando os resultados do experimento preliminar que mostrou que o acúmulo de carboidratos é maior quanto maior a idade das plantas. No entanto, um comportamento inverso no acúmulo de frutanos foi observado. Em plantas expostas por 1 mês à poluição aérea (capítulo 3), o conteúdo de frutanos foi maior e, nas plantas expostas por 2 meses (capítulo 4), foi menor, quando comparado com o observado nas plantas mantidas sob ar filtrado. Considerando tais informações, é sugerido que o acúmulo desses polímeros é influenciado pelo tempo de exposição das plantas de *L. multiflorum* às condições meteorológicas e de poluição aérea no ambiente urbano de São Paulo.

Nos capítulos 2 e 4, foi mostrado que o estolho contendo as bainhas foliares de *L. multiflorum* apresentou níveis elevados de frutose total, enquanto as raízes apresentaram níveis mais reduzidos desse carboidrato. Além disso, em todas as partes da planta (capítulo 2) e nas plantas de ambos os locais de estudo (capítulos 3 e 4), houve o acúmulo preferencial de frutanos de baixo peso molecular, que poderiam facilitar a rápida mobilização destes compostos pela planta, especialmente em situações de estresse, como a imposta pela poluição aérea. Neste caso, a poluição aérea poderia ter favorecido a síntese desses frutanos menores ou promovido a hidrólise de frutanos de alto peso molecular, a fim de sustentar o crescimento e partição de biomassa entre as partes das plantas, que, conforme observado no capítulo 4, foram afetados. Há que se considerar, também, que outros carboidratos solúveis, especialmente a glicose (monossacarídeo) e a sacarose (dissacarídeo), sofreram alterações quantitativas (capítulo 3) e qualitativas (capítulos 3 e 4).

Comparando os níveis de acúmulo dos elementos químicos entre os capítulos 3 e 4, observa-se que os níveis foliares de cobre, enxofre e zinco foram superiores nas plantas de *L. multiflorum* expostas por 1 mês (capítulo 3), enquanto que os níveis de ferro, alumínio e bário foram semelhantes entre as plantas dos dois períodos de estudo.

As variações sazonais no conteúdo dos carboidratos solúveis foram marcantes nos dois experimentos realizados (capítulos 3 e 4) e devem ter sido influenciadas pela sazonalidade ao longo do ano também marcante na concentração de metais pesados contidos no material particulado assim como em fatores meteorológicos. Adicionalmente, é esperado que o acúmulo foliar de metais pesados influenciem o conteúdo de carboidratos principalmente em escala sazonal e não diária, visto que esse acúmulo é um processo lento e, por isso, apenas capaz de alterar o metabolismo de frutanos de modo diferenciado em cada estação. Já as variações diurnas nos teores de frutanos, apesar de sutis (capítulo 4), foram suficientes para refletir significativamente as variações de irradiância, temperatura, umidade relativa e de alguns poluentes gasosos ao longo do dia, uma vez que esses fatores apresentaram variação diurna considerável e característica, além de poderem alterar rapidamente o metabolismo de frutanos.

Os resultados mostraram, ainda, que a capacidade de acúmulo de metais pesados e enxofre provenientes do ar nas folhas e raízes de *Lolium multiflorum* foi muita alta, mas foi acompanhada de defasagens no crescimento e mudanças na alocação de biomassa entre raízes e parte aérea. Visto que a concentração de um elemento em folhas é uma medida relativa entre a quantidade absorvida do elemento e a quantidade de biomassa produzida, pode ocorrer diluição do elemento no interior de uma planta que apresentar intenso crescimento. Esse efeito da diluição pôde ser verificado no presente estudo, na exposição de primavera, período em que foram registradas condições climáticas favoráveis à maior produção de biomassa foliar em plantas do local de referência (capítulo 4). Assim, parece que a concentração foliar de um elemento químico pode não ter refletido o nível de contaminação atmosférica durante o período de estudo, diminuindo o desempenho bioindicador de *L. multiflorum* em regiões de clima subtropical.

Deve-se destacar, também, que além de se caracterizar como uma espécie bioindicadora de poluição aérea, *Lolium multiflorum* também é uma gramínea forrageira muito utilizada no Sul do Brasil. Dessa forma, o acúmulo de metais pesados nessa espécie e a conseqüente redução no seu teor de frutanos têm importância econômica, além da ecológica, pois para um mesmo ganho em energia e carbono para o gado, se faz necessária uma maior ingestão de massa dessa gramínea forrageira. Acresce, também, o fato de que o aumento no consumo de massa digerível aumenta também a ingestão de metais tóxicos ao animal. Portanto, a variedade desta espécie em estudo não é indicada para fins forrageiros.

Conclusões Gerais

No presente trabalho pode-se concluir que:

- grande parte da fração dos carboidratos solúveis totais foi constituída por frutose, na forma livre e combinada, em todas as partes da planta; o estolho apresentou os maiores níveis de carboidratos, seguido pelas lâminas em alongamento, lâminas expandidas e raiz; em todas as partes das plantas de *L. multiflorum* houve maiores proporções de frutanos de baixo GP, especialmente nas raízes.
- a variação sazonal no conteúdo e na composição de frutanos foi determinada pela sazonalidade nos fatores meteorológicos em ambos os locais de estudo, porém foi exacerbada nas plantas expostas ao ambiente contaminado por poluentes aéreos. Neste local, os metais pesados contidos no material particulado e que também apresentaram sazonalidade marcante, foram provavelmente absorvidos lentamente e acumulados gradativamente ocasionando mudanças no metabolismo daqueles carboidratos;
- a variação ao longo de um dia no conteúdo e na composição de frutanos foi sutil em ambos os locais de estudo. No ambiente poluído, as alterações no acúmulo desses carboidratos foram explicadas pela ação combinada de poluentes gasosos, em especial o (NO₂), que é prontamente absorvido pelas plantas via estômatos, e de fatores meteorológicos (principalmente temperatura e umidade relativa);
- o potencial bioindicador da variedade “Lema” de *Lolium multiflorum* para a região tropical é limitado, uma vez que fatores ambientais reduziram o crescimento e a partição de carboidratos para a parte subterrânea, alocando proporcionalmente mais biomassa para as raízes do que para a parte aérea em plantas expostas ao local poluído.

ABSTRACT

The development of urban and industrial activities has caused a significant increase in the emissions of pollutants to the atmosphere. Air pollution, one of the most destructive factors of the environment, causes stress to plants, since certain compounds such as heavy metals are very reactive and dangerous to plant cells. The utilization of bioindicator plants is an usual practice to monitor the air quality and to diagnose the effects of air pollution on vegetation. The C₃ temperate grass *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* Beck var. Lema is usually employed as bioindicator of air pollution, due to its high capacity of accumulating heavy metals, fluorine and sulfur when growing in the presence of these chemical elements in the air. This species also accumulates fructan, a soluble carbohydrate, whose production can be altered by to many environmental perturbations. In the present work three experiments were performed aiming (1) to verify the partitioning of water total carbohydrates in five different parts of plants of *L. multiflorum* (upper stubble; under stubble; elongating leaf, expanded leaf and roots); (2) to analyze the seasonal and the diurnal relationships between the concentrations of urban air pollutants, mainly nitrogen and sulfur dioxides and particulate material, among other environmental factors, leaf concentrations of heavy metals and changes in fructan accumulation in plants of *L. multiflorum* exposed to different conditions of air pollution in São Paulo city; (3) to verify if the seasonal and diurnal variations in the content of fructans are determined by leaf accumulation of sulfur and heavy metals or by variations in the concentrations of gaseous pollutants or other environmental factors; and (4) to verify the bioindicator efficiency of the variety “Lema” of *Lolium multiflorum* in tropical areas. Plants were consecutively exposed during 28 days or two months in each season at Congonhas (site reached by high levels of air pollutants) and at a glasshouse with filtered air (reference situation). After each exposure, fructan composition as well as leaf concentrations of total fructose and of sulfur and metals (Al, Fe, Cu, Zn, Pb, Cd and Ba) were measured. Total fructose was quantified by the anthrone method and fructan composition was analyzed by HPAEC-PAD. Sulfur concentrations were determined by the turbidimetric method, whereas metal concentrations were measured using an atomic absorption spectrophotometer, after acidic digestion. Results showed that the stubble containing the leaf sheaths of *L. multiflorum* accumulated the highest levels of fructans, while the roots accumulated the lowest levels. Seasonal variations in the contents of soluble carbohydrates were evident

in the present work and seemed to be related with the climatic conditions but intensified by the air pollutants, especially heavy metals contained in the particulate matter, and accumulated in the leaves of *L. multiflorum* exposed in Congonhas. However the diurnal variations were tenuous, but reflected the variations of irradiance, temperature and of some gaseous pollutants during daytime. In the both seasonal and diurnal experiments, the fructans of high molecular weight seemed to be hydrolyzed and the accumulation of fructans of intermediary molecular weight was significant in the plants from both sites. The changes in the content and in the composition of fructans altered the biomass production and partition among roots and shoots, which might have been disturbed their characteristic of accumulating chemical elements from air pollution in the leaves. So, the use of the variety Lema of *L. multiflorum* for biomonitoring purposes in tropical areas should be carefully evaluated.

RESUMO

O crescimento das atividades urbano-industriais tem provocado um significativo aumento nas emissões de poluentes aéreos para a atmosfera. A poluição do ar, um dos principais fatores determinantes da destruição do meio ambiente, causa estresse às plantas, já que apresenta compostos altamente reativos e danosos, como os metais pesados. O uso de plantas bioindicadoras de poluição aérea é uma prática comum para o monitoramento da qualidade do ar e para o diagnóstico dos efeitos da poluição aérea na vegetação. Entre as plantas bioindicadoras mais utilizadas, destaca-se a gramínea C₃ de clima temperado *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* Beck var. Lema, que acumula metais pesados, fluoretos e enxofre quando se desenvolve na presença desses elementos químicos no ar. Além disso, esta espécie acumula frutano, um carboidrato solúvel cuja produção pode ser alterada por um número variado de perturbações ambientais. O presente trabalho foi dividido em três experimentos com os objetivos de (1) verificar a partição de carboidratos solúveis em cinco partes distintas (lâmina em alongamento, lâmina expandida, porção superior do estolho, porção inferior do estolho e raízes) de plantas de *L. multiflorum*; (2) analisar as relações sazonais e diurnas entre concentrações de poluentes aéreos urbanos, principalmente de dióxidos de enxofre e de nitrogênio e de material particulado, entre outros fatores ambientais, concentrações foliares de metais e mudanças no acúmulo de frutanos em plantas de *Lolium multiflorum* Lam ssp. *italicum* expostas a diferentes condições de poluição do ar na cidade de São Paulo; (3) verificar se as variações sazonais e diurnas no conteúdo de frutanos são determinadas por acúmulos foliares de enxofre e metais pesados ou por variações nas concentrações de poluentes gasosos; e (4) verificar a eficiência bioacumuladora da variedade “Lema” de *Lolium multiflorum* para a região tropical. Para isso, as plantas foram expostas durante períodos consecutivos de 28 dias ou 2 meses, em cada estação do ano, em Congonhas (local com altos níveis de poluentes aéreos) e em casa de vegetação com ar filtrado (local controle). Após cada exposição, a frutose total foi quantificada pelo método de antrona e os frutanos analisados qualitativamente por HPAEC-PAD. As concentrações de enxofre foram determinadas por turbidimetria, enquanto que as concentrações de metais pesados (Al, Fe, Cu, Zn, Pb, Cd e Ba) foram medidas utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica, após digestão ácida. Os resultados mostraram que o estolho contendo as bainhas foliares de *L. multiflorum* acumulou mais frutanos, enquanto que as raízes acumularam os menores níveis desse carboidrato. As variações

sazonais no conteúdo dos carboidratos solúveis foram marcantes no presente trabalho e pareceram estar relacionadas com as condições climáticas, mas intensificadas pelas concentrações de poluentes aéreos, especialmente de metais pesados contidos no material particulado, e acumulados nas folhas de *L. multiflorum* expostas em Congonhas. Já as variações diurnas foram sutis, mas suficientes para refletir as variações de irradiância, temperatura e de alguns poluentes gasosos ao longo do dia. Tanto no experimento sazonal como no diurno, os frutanos de alto peso molecular pareceram ter sido hidrolisados sendo o acúmulo de frutanos de peso molecular intermediário preferencial nas plantas dos dois locais de estudo. As interferências no conteúdo e na composição de frutanos influenciaram a produção de biomassa e a partição desta entre as partes da plantas, o que pode ter alterado a capacidade acumuladora da espécie de elementos provenientes da poluição atmosférica. Assim, o uso da variedade Lema de *L. multiflorum* para fins de biomonitoramento da qualidade do ar em regiões tropicais deve ser cuidadoso.

Anexo

Trabalho publicado no período do doutorado:

SANDRIN, C.Z.; DOMINGOS, M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Partitioning of water soluble carbohydrates in vegetative tissues of *Lolium multiflorum* Lam. ssp. *italicum* cv. Lema. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 299-305, 2006.