

Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil)¹

PATRICIA BULBOVAS^{2,4}, MIRIAN C.S. RINALDI³, WELINGTON B.C. DELITTI² e
MARISA DOMINGOS³

(recebido: 18 de novembro de 2004; aceito: 13 de outubro de 2005)

ABSTRACT – (Seasonal variation in antioxidants in leaves of young plants of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood)). The urban environmental factors generate conditions of oxidative stress in plants. Cellular antioxidants, such as ascorbic acid (AA), thiols (Ti), peroxidases (POD) and superoxide dismutase (SOD) are induced to different levels depending on their capacity to tolerate stressing conditions. In the first part of this study we determined the profile of these defenses in leaves of different ages of young plants of *C. echinata*. The levels of antioxidants were similar in all leaves analyzed, independently of the age. Secondly, we evaluated the same antioxidants and glutathione (GSH) in 130 young plants kept in a greenhouse with constant monitoring of temperature, relative humidity and irradiance during 18 months, in order to establish the seasonal variations occurring in response to climatic factors. During this period, leaf antioxidants were analyzed every three months. In general, AA concentrations and POD activity in *C. echinata* were higher than the levels reported for other tropical tree species. Seasonal variations were observed. GSH concentration and POD activity were significantly influenced by temperature and SOD by temperature and humidity.

Key words - ascorbic acid, *Caesalpinia echinata*, glutathione, peroxidases, superoxide dismutase, thiols

RESUMO – (Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil)). O ambiente urbano pode gerar condições de estresse oxidativo nas plantas, levando à estimulação de antioxidantes como ácido ascórbico (AA), tióis (Ti), peroxidases (POD) e superóxido dismutase (SOD), em diferentes níveis, de acordo com sua capacidade de tolerar tais condições. Este estudo, em sua primeira fase, buscou conhecer o perfil destas defesas em folhas de plantas jovens de *C. echinata* com diferentes graus de desenvolvimento. Os níveis dos antioxidantes foram similares em todas as folhas analisadas. Em uma segunda fase, tais antioxidantes e a glutatona (GSH) foram avaliados em 130 plantas mantidas em casa de vegetação com monitoramento constante de temperatura, umidade relativa e irradiância, por um período de 18 meses, para estabelecer se variações sazonais nessas defesas ocorrem em resposta a fatores climáticos. Nesse período, os antioxidantes foliares foram analisados a cada três meses. Em geral, a concentração de AA e a atividade da POD foram altas em *C. echinata*, quando comparadas com as de outras espécies arbóreas tropicais. Houve variações nas defesas ao longo do tempo. A concentração de GSH e a atividade da POD mostraram ser influenciadas por mudanças na temperatura e a SOD foi estimulada em resposta à temperatura e à umidade relativa.

Palavras-chave - ácido ascórbico, *Caesalpinia echinata*, glutatona, peroxidases, superóxido dismutase, tióis

Introdução

A exploração descontrolada do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae - Caesalpinioideae), nos primeiros séculos da colonização, contribuiu significativamente para a redução de suas populações naturais. Apesar de seu valor, tanto histórico quanto econômico, na atualidade essa espécie está em perigo de extinção. Uma possível forma de conservação

ex situ da espécie seria a expansão do seu uso em ambientes urbanos para fins de arborização e paisagismo, tendo em vista seu potencial ornamental, por apresentar porte elegante, copa arredondada, folhas cor verde-brilhante e flores em cacho amarelo-ouro suavemente perfumadas (Lima *et al.* 2002, Rocha 2004).

No entanto, tal ação somente será bem sucedida se *C. echinata* for tolerante ao estresse oxidativo imposto pelas condições do ambiente urbano, que induz, nas células vegetais, a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem atacar e modificar quase todas as moléculas orgânicas, resultando em sérios danos às células e aos tecidos. Por outro lado, as plantas podem mobilizar enzimas e substâncias antioxidantes para protegê-las contra o excesso ou a produção inapropriada dessas espécies. Esses compostos antioxidantes

1. Parte da tese de doutorado de P. Bulbovas.
2. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia Geral, Rua do Matão, Travessa 14, 321, 05508-900 São Paulo, SP, Brasil.
3. Instituto de Botânica, Seção de Ecologia, Caixa Postal 4005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil.
4. Autor para correspondência: pbulbovas@hotmail.com

interagem entre si formando um sistema de resposta antioxidativa, que pode minimizar as conseqüências do estresse e manter o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante (Muggli 1993, Bray *et al.* 2000).

Nas células vegetais, enzimas como superóxido dismutase (SOD) e peroxidases (POD) e moléculas solúveis em água como ácido ascórbico (AA) e compostos orgânicos contendo grupos sulfidríla (SH), denominados tióis (Ti), são importantes antioxidantes. A glutatona reduzida (GSH), um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, é geralmente o mais abundante entre os tióis. Todas são substâncias-chave integrantes do ciclo ascorbato-glutationa, o mais estudado sistema antioxidante (Kocsy *et al.* 2001). A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Rank 1997), o qual pode ser eliminado pelas POD (Meloni *et al.* 2003). O AA, além de eliminar o H_2O_2 , também remove $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ (radical hidroxila) e 1O_2 (oxigênio singlete) e, ainda, inibe reações desencadeadas por espécies reativas de oxigênio e protege os lipídios da membrana (Muggli 1993). A GSH funciona como substrato para a remoção de H_2O_2 pela glutatona peroxidase, convertendo-se para forma oxidada, o que previne a peroxidação dos lipídios e reage com o $\cdot OH$ e 1O_2 , protege os grupos SH das enzimas essenciais ao metabolismo da célula, sendo oxidada no lugar destas, e tem o papel importante de regenerar o AA (Foyer *et al.* 1994).

Muitas vezes, plantas expostas à situação estressante do ambiente urbano não apresentam injúrias visíveis, mas seu sistema antioxidante pode ser bastante alterado, de modo que, por meio da quantificação de antioxidantes, pode-se detectar se as condições de temperatura, umidade relativa, irradiância, poluição atmosférica, entre outros, são capazes de agir sobre as plantas (Arndt & Schweizer 1991, Fangmeier *et al.* 1994). Certamente, alguns fatores de variação devem ser previamente conhecidos para que se tenha certeza da ativação do sistema de respostas antioxidativas em plantas que crescem em ambientes urbanos, pois se sabe que tais defesas variam não somente entre espécies, como também entre plantas da mesma espécie em diferentes estádios de desenvolvimento e entre folhas da mesma planta, em fases distintas de desenvolvimento (Klumpp *et al.* 2000). Além disso, as espécies também respondem às variações ambientais ao longo das estações do ano (Chaitanya *et al.* 2002, Kuk *et al.* 2003, Lee *et al.* 2004, Rivero *et al.* 2004, Zhou & Zhao 2004).

Sendo assim, este trabalho buscou, em uma primeira fase, determinar as variações na atividade de

SOD e POD, e nas concentrações de AA e de Ti, em folhas de diferentes estádios de desenvolvimento, de plantas jovens de *C. echinata* e, em uma segunda fase, determinar a variação sazonal intrínseca da espécie no que diz respeito a esses antioxidantes, incluindo glutatona, e verificar se esta poderia ser induzida por condições climáticas, sem a influência da poluição atmosférica. Para tanto, um lote de plantas foi mantido em casa de vegetação com ar filtrado, isento de partículas e gases tóxicos, por um período de 18 meses. Os resultados deste trabalho podem subsidiar estudos sobre perturbações ambientais urbanas em plantas de *C. echinata*, como por exemplo, as causadas por poluentes atmosféricos, definindo um ponto de comparação para delimitar mudanças nos antioxidantes nestes estudos.

Material e métodos

As plantas de *Caesalpinia echinata* Lam. utilizadas na primeira fase de experimentos eram provenientes do mesmo lote de produção, tinham a mesma idade (cerca de quatro anos) e, em média, 23 cm de altura e pelo menos quatro folhas no caule principal. Foram cultivadas em sacos de mudas, com terra vegetal disponível comercialmente, irrigadas diariamente e mantidas em viveiro com sombreamento de 50%, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, São Paulo, e trazidas ao Instituto de Botânica, na cidade São Paulo, SP, duas semanas antes do início das análises.

Na fase inicial, a amostragem das folhas com diferentes graus de desenvolvimento foi feita de acordo com sua posição no caule principal, tomando por base seus diferentes nós de crescimento. Estabeleceu-se que a folha mais jovem, no ápice da planta, pertencia ao primeiro nó do caule principal e as demais, com graus de desenvolvimento crescentes, ao segundo nó em diante. Para determinação de cada antioxidante, cinco plantas de *C. echinata* foram analisadas. Esse ensaio foi realizado em duplicata (ensaios 1 e 2).

Para a segunda fase do estudo, determinaram-se os mesmos antioxidantes, com o acréscimo da glutatona entre os Ti, em plantas jovens de *C. echinata* mantidas em casa de vegetação com ar filtrado, isento de partículas grossas e finas e de gases, construída na sede do Instituto de Botânica, São Paulo, SP. Para esta fase, cento e trinta mudas de *C. echinata*, produzidas em tubetes com substrato Plantmax do tipo hortaliça da Eucatex, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, foram transplantadas para vasos plásticos com o mesmo substrato, acrescido de adubação adequada (adubo encapsulado misturado ao substrato e aplicação semanal de solução preparada com adubos foliar e de enraizamento). Em abril de 2002, foram

levadas para a casa de vegetação e tinham, em média, dois anos de idade, 24 cm de altura e seis folhas no caule principal. As plantas foram irrigadas por capilaridade, segundo modelo proposto por Arndt & Schweizer (1991), através de barbantes de náilon inseridos na base dos vasos, sendo que uma de suas extremidades ficava em contato com as raízes e a outra metade mergulhada em caixas que serviam como reservatórios de água. Sobre estas caixas foram colocadas telas de arame galvanizado que permitiram apoiar os vasos e mergulhar os barbantes na água. Durante o experimento, as plantas de *C. echinata* foram adubadas mensalmente. A partir de três meses da transferência para casa de vegetação, quinze plantas foram retiradas trimestralmente: aos 3 meses de experimento: julho/02; 6 meses: outubro/02; 9 meses: janeiro/03; 12 meses: abril/03; 15 meses: julho/03; 18 meses: outubro/03. Desse modo, grupos distintos de plantas permaneceram na casa de vegetação por períodos crescentes de tempo. Nessa fase, foram usadas as folhas que mostraram respostas mais evidentes na etapa inicial acima. Assim, foram usadas folhas do segundo nó para a análise de Ti e GSH, do terceiro nó para AA e SOD, e do quarto nó para POD. Ao longo de todo o período de experimentação, foram tomadas, com um termohigrógrafo, medidas contínuas de temperatura e umidade relativa. O perfil da radiação fotossinteticamente ativa foi estabelecido por meio de medidas descontínuas realizadas em um dia por semana, ao redor das 12:00 h, com radiômetro portátil Li-Cor Li-185B. Esses dados do ambiente encontram-se sumarizados na tabela 1.

Em todos os ensaios, as coletas foram realizadas no período matutino. Primeiramente foram determinadas as concentrações de AA, de Ti e de GSH. Para a análise dos antioxidantes enzimáticos (SOD e POD), as folhas foram coletadas e congeladas a -40 °C. Após a coleta do material para análise, o restante das folhas foi retirado, imediatamente pesado e levado para estufa à 60 °C para obtenção do peso

seco. A razão entre peso fresco e peso seco foi utilizada para expressar a concentração ou atividade dos antioxidantes por unidade de massa seca.

Os antioxidantes de folhas de *C. echinata* foram analisados, conforme descrição abaixo, empregando-se métodos previamente definidos para plantas jovens de árvores nativas da Floresta Atlântica (Domingos *et al.* 1998, Klumpp *et al.* 2000) ou amplamente cultivadas no Brasil (Klumpp *et al.* 1997, Moraes *et al.* 2002).

Ácido ascórbico (AA) – Folhas frescas (0,2 g) foram homogeneizadas com 12 mL de solução aquosa de etileno diamina ácido tetracético - sal de sódio (EDTA-Na₂) (0,07%) e ácido oxálico (0,5%). O extrato resultante foi centrifugado (40.000 g, 30 min, a 2 °C). Leituras foram realizadas em espectrofotômetro ($\lambda = 520$ nm), após o acréscimo 2,5 mL de solução 2,6 diclorofenol-indofenol sal de sódio dihidratado (DCPIP) (0,02%) (primeira leitura) e 0,05 mL de ácido ascórbico 1% ao sobrenadante (segunda leitura). O conteúdo de ácido ascórbico foi estimado a partir da diferença entre o branco e o resultado da diferença dessas leituras (Keller & Schwager 1977).

Tióis (Ti) e glutathiona (GSH) – Folhas frescas foram homogeneizadas (0,7 g) com ácido ascórbico 0,15% e centrifugadas (44.000 g, 30 min, a 2 °C), sendo adicionados 0,2 mL de 3 carboxi-4-nitrofenil disulfeto (DTNB) 0,04% em tampão fosfato (0,02 M pH 7,0), 0,2 mL de tampão fosfato (0,02 M pH 7,0) e 1,3 mL de tampão tris-HCl (pH 8,0) ao extrato resultante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em 415 nm. Para a determinação da GSH, na segunda fase deste estudo, os tióis não protéicos foram obtidos a partir destes mesmos extratos, que foram aquecidos em banho-maria a 100 °C por 5 min e depois centrifugados (44.000 g, 10 min, a 2 °C), visando à desnaturação e separação das proteínas. Nesses extratos desproteinizados, foi realizada uma leitura como descrita acima e, em seguida, a eles foram adicionados

Tabela 1. Médias e valores máximos e mínimos de temperatura (T), de umidade relativa (UR) e de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), na casa de vegetação ao longo de 18 meses. Médias calculadas para o intervalo de três meses entre duas amostragens consecutivas.

Table 1. Average and maximum and minimum values of temperature (T), relative humidity (UR) and photosynthetic active radiation (RFA), in the greenhouse during 18 months. Average values were calculated for three month intervals between two consecutive samplings.

Tempo de exposição (meses)	Meses de exposição	T (max.-min.) (°C)	UR (max.-min.) (%)	RFA (max.-min.) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
0-3	Abr.-Jul./02	21 (35 - 13)	67 (95 - 45)	443 (816 - 74)
3-6	Jul.-Out./02	20 (32 - 9)	60 (90 - 39)	663 (1206 - 91)
6-9	Out./02-Jan./03	21 (35 - 14)	65 (91 - 42)	513 (936 - 90)
9-12	Jan.-Abr./03	22 (35 - 15)	64 (96 - 43)	814 (1620 - 314)
12-15	Abr.-Jul./03	20 (35 - 11)	72 (96 - 34)	533 (1500 - 151)
15-18	Jul.-Out./03	18 (33 - 12)	76 (92 - 42)	405 (414 - 107)

0,2 mL de DTNB 0,04% em tampão fosfato (0,02 M pH 7,0), 0,2 mL de tampão fosfato (0,02 M pH 7,0) e 1,1 mL de tampão tris-HCl (pH 8,0), 0,3 mL de albumina (1%), 0,01 mL de glioxalase I e 0,09 mL de metil-glioxal (0,1 M), e foram mantidos por 15 min em temperatura ambiente, visando a conversão da glutatona em S-lactonil glutatona. O conteúdo de GSH foi, então, calculado pela diferença entre as concentrações obtidas nos extratos desproteinizados e naqueles incubados com glioxalase I e metil-glioxal (De Kok *et al.* 1985).

Atividade das peroxidases (POD) – As folhas congeladas (0,3 g) foram homogeneizadas com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 2% e centrifugadas (40.000 g, 30 min, a 2 °C). Após adição ao sobrenadante de 2 mL de outro tampão fosfato (0,1 M, pH 5,5), 0,3 mL de fenilendiamina (1%) e 0,05 mL de peróxido de hidrogênio (0,3%), conforme descrito por Klumpp *et al.* (1989), realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro ($\lambda = 485$ nm). A absorbância do complexo H_2O_2 -POD formado foi medido em dois tempos, dentro de uma faixa linear da curva de reação. O delta da absorbância (ΔE) foi dividido pelo tempo em que ambas as medidas foram tomadas (aos 2,0 e 3,5 min), indicando a atividade da POD durante a redução do peróxido de hidrogênio.

Atividade da superóxido dismutase (SOD) – As folhas congeladas (0,4 g) foram homogeneizadas com PVPP e solução contendo tampão fosfato (50 mM, pH 7,5), EDTA- Na_2 1 mM, NaCl 50 mM e ácido ascórbico 1 mM e centrifugadas (22.000 g, 25 min, a 2 °C). Ao sobrenadante foram adicionados 0,5 mL de EDTA- Na_2 0,54 mM, 0,8 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), 0,5 mL de metionina 0,13 mM, 0,5 mL de azul *p*-nitrotetrazólio (NBT) 0,44 mM e 0,2 mL de riboflavina 1 mM, e a solução resultante foi exposta a luz fluorescente (80 W) por 20 min. Extratos preparados seguindo o mesmo procedimento foram mantidos no escuro. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro ($\lambda = 560$ nm) em ambos os tipos de extrato (iluminado e não iluminado) e a diferença entre as duas absorbâncias foi considerada para a determinação da atividade da SOD, que consistiu na inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido (Osswald *et al.* 1992).

Os resultados da primeira fase deste estudo foram analisados estatisticamente através de análise de variância com dois fatores (ensaios e folhas de diferentes nós), para verificar se houve interação entre os fatores e diferenças entre os resultados de cada indicador de estresse obtidos nas folhas provenientes dos diferentes nós. Os resultados da segunda fase deste estudo foram analisados estatisticamente através de análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida por testes de comparações múltiplas (teste Dunn ou Student-Newman-Keuls). Também foi realizada análise de componentes principais (ACP), objetivando verificar se o sistema de defesas antioxidantes variou ao longo dos dezoito meses de estudo e indicar os antioxidantes mais importantes para explicar qualitativamente tal variação. Análises de correlação de

Pearson foram realizadas para determinar se as variações nos antioxidantes estariam relacionadas às mudanças sazonais na temperatura e umidade relativa do ar.

Resultados

A análise estatística fatorial aplicada aos resultados da primeira fase mostrou que não houve interação entre os fatores ensaio e idade das folhas ($p > 0,05$), assim como não houve diferença significativa entre os resultados dos indicadores bioquímicos obtidos nas plantas dos dois ensaios utilizados e nas folhas dos diferentes nós, observando-se tendências, que apenas nortearam a escolha das folhas para análises ao longo do experimento realizado na casa de vegetação (figura 1).

Os níveis de AA nas plantas mantidas na casa de vegetação foram significativamente maiores aos 3 meses de experimento e menores aos 9 e 12 meses (figura 2A). A concentração de Ti foi maior aos 12 meses e mais baixo aos 6 e 9 meses (figura 2B). Ao longo dos 18 meses de estudo, houve grande variação na concentração e porcentagem de GSH (figuras 2C, D). Apesar da alta concentração de Ti aos 12 meses, neste mesmo período foi observada a mais baixa concentração de GSH e, conseqüentemente a menor porcentagem de GSH em relação ao total de Ti. Valores significativamente menores de GSH e de porcentagem de GSH também foram encontrados aos 15 meses. As maiores proporções desta substância em relação aos tióis foram verificadas nos primeiros 6 meses de experimento.

A atividade das POD também variou bastante durante o experimento (figura 2E). A maior atividade foi verificada aos 3 e 12 meses e as menores aos 6, 15 e 18 meses de estudo. Finalmente, a atividade da SOD oscilou menos ao longo do tempo, tendo sido maior aos 12 meses e menor aos 18 meses (figura 2F).

A análise de componentes principais resumiu 67% da variabilidade total dos dados nos dois primeiros eixos, sendo que o eixo 1 responde por 42% dos resultados e o eixo 2 por 25% (figura 3). GSH e porcentagem de GSH apresentaram forte relação com o eixo 1 ($r = 0,76$ e $r = 0,90$, respectivamente) e POD e Ti com o eixo 2 ($r = -0,67$ e $r = -0,66$, respectivamente). O gráfico também mostra que os períodos de coletas se separam, indicando que a concentração ou atividade dos antioxidantes foram diferentes ao longo dos 18 meses de amostragem e que, dependendo da época de amostragem, cada antioxidante contribuiu mais ou menos para explicar a variação total no sistema antioxidativo.

Por exemplo, aos 3, 6, 9 e 18 meses (unidades amostrais situadas do lado positivo do eixo 1), a GSH, tanto em concentração quanto em porcentagem do total de Ti, foi o antioxidante mais importante entre os analisados, e aos 12 e 15 (unidades amostrais situadas do lado negativo do eixo 1), as atividades de POD e de SOD prevaleceram.

A análise de correlação mostrou que a concentração de GSH e a porcentagem de GSH foram relacionadas negativamente com a temperatura. A atividade das enzimas POD e SOD, por outro lado, apresentou relação positiva com a temperatura, e a SOD, adicionalmente, esteve relacionada negativamente com a umidade relativa. As variações nos teores de AA e de

Ti, por sua vez, não foram relacionadas significativamente com a sazonalidade em ambos os fatores climáticos (tabela 2).

Discussão

Os resultados obtidos na primeira fase mostraram que os níveis de antioxidantes foram semelhantes em *C. echinata*, independentemente da idade da folha. Desse modo, as variações sazonais observadas ao longo da exposição das plantas em casa de vegetação, na segunda fase deste estudo (figura 3), não poderiam ser atribuídas ao estágio de desenvolvimento das folhas,

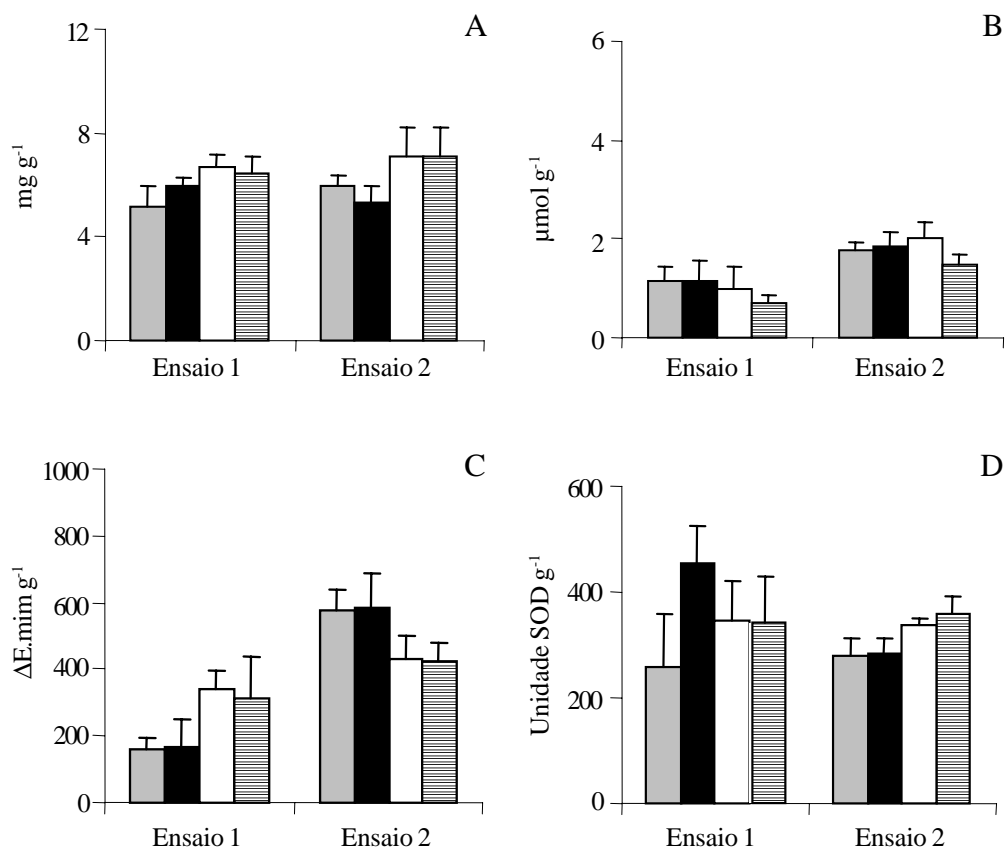


Figura 1. Valores médios para ácido ascórbico (A), tióis (B), peroxidases (C) e superóxido dismutase (D) e respectivos erros padrões (barras), em folhas do primeiro (■), segundo (■), terceiro (□) e quarto (▨) nós de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* utilizadas nos ensaios 1 e 2 da primeira fase do estudo (n = 5). As diferenças entre os resultados obtidos nos ensaios, para folhas de cada nó, e entre os resultados obtidos para as folhas dos diferentes nós, em cada ensaio, não foram significativas (p > 0,05).

Figure 1. Mean values for ascorbic acid (A), total thiols (B), peroxidases (C) and superoxide dismutase (D) and respective standard errors (bars) in leaves of the first (■), second (■), third (□) and fourth (▨) nodes of two distinct sets of *Caesalpinia echinata* saplings included in the assays 1 and 2 of the first step of the study. No significant differences were observed among the results obtained in both assays, for the leaves inserted in each node, and among the results obtained in the leaves inserted in the different nodes, in each assay (p > 0.05).

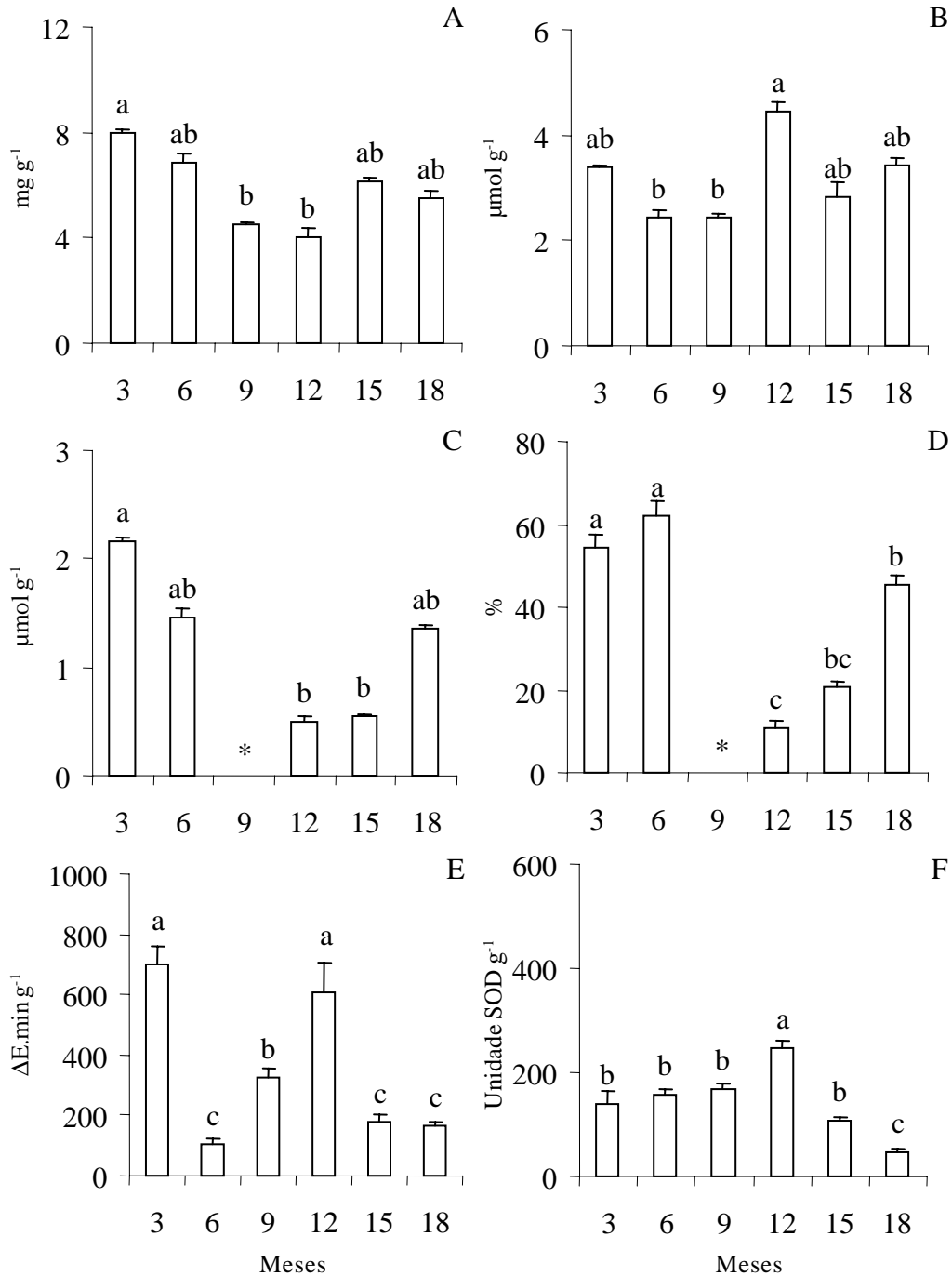


Figura 2. Valores médios para ácido ascórbico (A), tióis (B), glutatona (C), porcentagem de glutatona (D), peroxidases (E) e superóxido dismutase (F) e respectivos erros padrões (barras), em folhas de indivíduos jovens de *Caesalpinia echinata* mantidos em casa de vegetação por 18 meses. 3 meses: Jul./02; 6: Out./02; 9: Jan./03; 12: Abr./03; 15: Jul./03; 18: Out./03. As letras indicam diferenças estatísticas entre os resultados de cada período (n = 15, p < 0,05). *Não determinado.

Figure 2. Mean values for ascorbic acid (A), thiols (B) glutathione (C), percent of glutathione (D), peroxidases (E) and superoxide dismutase (F) in leaves of *Caesalpinia echinata* saplings grown in greenhouse for 18 months. 3 months: Jul./02; 6: Oct./02; 9: Jan./03; 12: Apr./03; 15: Jul./03; 18: Oct./03. A. For each antioxidant, mean values indicated with distinct letters are significantly different (n = 15, p < 0.05). *Not determined.

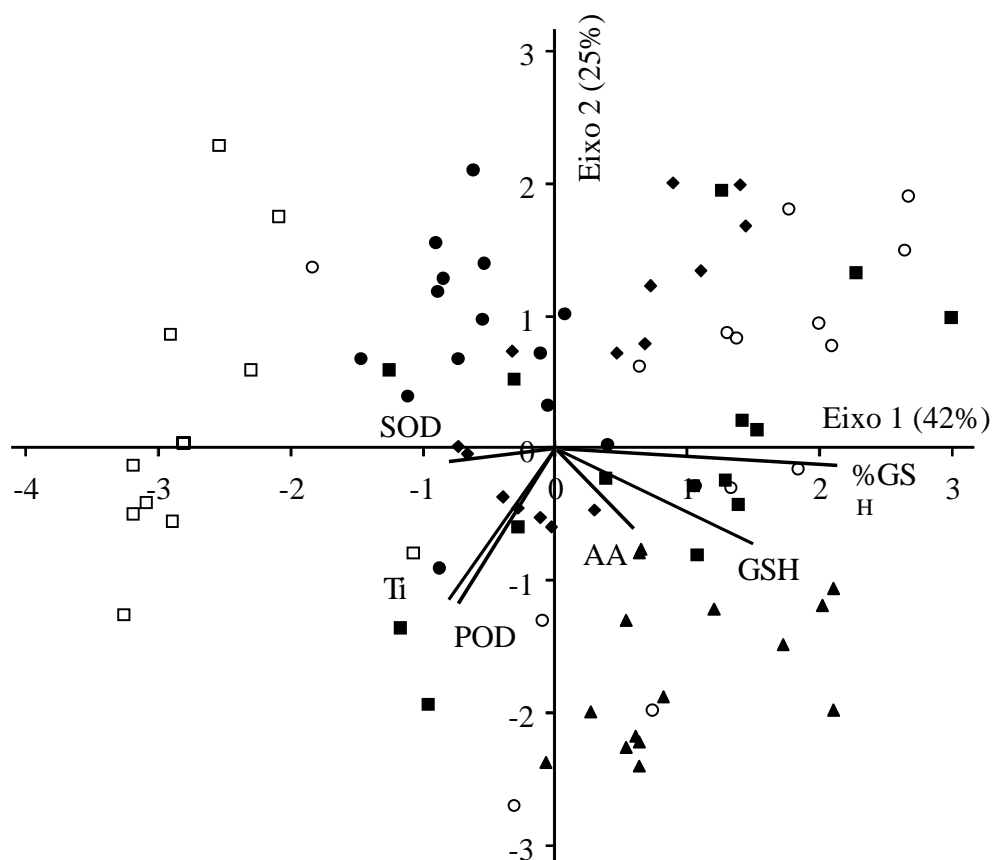


Figura 3. Análise de componentes principais (ACP) dos antioxidantes determinados em folhas de indivíduos jovens de *Caesalpinia echinata* mantidos em casa de vegetação, por 18 meses. 3 meses: Jul./02 (▲); 6: Out./02 (○); 9: Jan./03 (◆); 12: Abr./03 (□); 15: Jul./03 (●); 18: Out./03 (■). AA = ácido ascórbico, Ti = tióis, GSH = glutationa, % GSH = porcentagem de glutationa em relação ao total de tióis, POD = peroxidases, SOD = superóxido dismutase.

Figure 3. Principal component analysis (PCA) of antioxidants determined in leaves of *Caesalpinia echinata* saplings grown in greenhouse for 18 months. 3 months: Jul./02 (▲); 6: Oct./02 (○); 9: Jan./03 (◆); 12: Apr./03 (□); 15: Jul./03 (●); 18: Oct./03 (■). AA = ascorbic acid, Ti = total thiols, GSH = glutathione, % GSH = percentage of glutathione in relation to total thiols, POD = peroxidases, SOD = superoxide dismutase.

podendo-se excluir esta possível interferência na interpretação dos resultados posteriormente obtidos.

As quantidades médias de AA em *C. echinata*, nas diferentes amostragens (médias entre 4,0-8,0 mg g⁻¹; figuras 1, 2), além de muito conservativas, foram muito altas quando comparadas com as encontradas, utilizando os mesmos métodos analíticos, em outras espécies nativas da Floresta Atlântica ou cultivadas no Brasil (*Tibouchina pulchra* Cogn., *Psidium guajava* L. e *Psidium cattleianum* Weinw.), expostas em locais poluídos ou não (médias entre 0,3-1,1 mg g⁻¹). Por outro lado, essas espécies apresentaram quantidades foliares de Ti (0,8-4,5 μmol g⁻¹) semelhantes à de *C. echinata* (0,7-4,4 μmol g⁻¹). A atividade da POD, por sua vez, foi geralmente mais alta em *C. echinata* (103-697 ΔE.min g⁻¹) do que nas referidas espécies

(médias entre 27-250 ΔE.min g⁻¹) (Klumpp *et al.* 1997, Domingos *et al.* 1998, Klumpp *et al.* 2000, Moraes *et al.* 2002).

No entanto, não se pode inferir sobre o grau de tolerância de *C. echinata* ao estresse oxidativo com base no conteúdo ou na atividade basal dos antioxidantes, como preconizam Bray *et al.* (2000), devido a restrições metodológicas. O método empregado para análise de AA, por exemplo, não permite diferenciar o composto com função antioxidativa daquele sem tal função (ácido isoascórbico) (Speck *et al.* 1984). Do mesmo modo, determinou-se a atividade das peroxidases em geral, entre as quais se incluem não somente a ascorbato peroxidase e a guaicol peroxidase, com reconhecida função antioxidativa, como também outras que não têm esta capacidade. Assim, no presente estudo,

Tabela 2. Correlação de Pearson entre as variáveis temperatura e umidade relativa (médias para os intervalos de três meses entre amostragens), e os níveis de antioxidantes estudados nas plantas mantidas na casa de vegetação ao longo de 18 meses (n = 60).

Table 2. Pearson correlation between temperature or relative humidity (average for three month intervals between samplings), and levels of antioxidants in the plants maintained at the greenhouse during 18 months (n = 60).

Antioxidantes	Temperatura		Umidade relativa	
	Coefficiente de correlação	p	Coefficiente de correlação	p
Ácido ascórbico (AA)	-0,14	0,180	0,01	0,918
Tióis (Ti)	0,05	0,611	0,16	0,126
Glutathione (GSH)	-0,24	0,020	-0,03	0,791
% Glutathione (% GSH)	-0,27	0,011	-0,15	0,149
Peroxidases (POD)	0,48	<0,001	-0,16	0,137
Superóxido dismutase (SOD)	0,54	<0,001	-0,48	<0,001

o perfil dos compostos analisados ao longo do tempo foi considerado um indicador mais adequado da capacidade de *C. echinata* tolerar o estresse oxidativo do que seus níveis basais. Nesse caso, partiu-se do princípio de que a intensificação das defesas em resposta ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio induzido por fatores ambientais poderia ser percebida por intermédio de mudanças nesse perfil.

As figuras 2 e 3 indicam que as variações nos antioxidantes das plantas de *C. echinata* não pareceram estar relacionadas ao tempo crescente de exposição ou à idade das plantas. Caso isso fosse evidente, tais figuras apresentariam gradientes de concentração ou atividade dos antioxidantes ao longo do período de exposição. O perfil dos antioxidantes não aponta, igualmente, indícios de aclimação das plantas às condições de exposição da casa de vegetação, o que seria verificado caso os níveis dos mesmos variassem pouco ao longo das amostragens (Barnes *et al.* 1999). Assim, as mudanças nos antioxidantes dessas plantas possivelmente aconteceram em função de mudanças sazonais de fatores do ambiente. Conforme indicado pelas análises de correlação (tabela 2), a temperatura foi o fator mais importante, entre os monitorados, a comandar os níveis dos antioxidantes. Nos períodos mais quentes, como o que corresponde ao intervalo entre o 9^o e 12^o mês, enquanto o nível de GSH, tanto em termos de concentração quanto em termos de proporção do total de Ti, foi baixo, a atividade das enzimas foi alta. O inverso ocorreu nos períodos mais frios, como os correspondentes aos intervalos de tempo entre 3^o e 6^o mês e entre o 15^o e 18^o mês (tabela 1; figuras 2, 3).

Estudos realizados por outros autores também já mostraram que a temperatura do ambiente pode causar

mudanças na concentração de GSH e na atividade dos antioxidantes enzimáticos em plantas como *Morus alba* L., sob altas temperaturas, e *Zea mays* L. e *Cucumis sativus* L., sob baixas temperaturas (Chaitanya *et al.* 2002, Lee *et al.* 2004, Takac 2004).

A SOD, nas plantas de *C. echinata*, pareceu ser mais influenciada por variações nos fatores ambientais do que os demais antioxidantes estudados, pois apresentou relação significativa com a temperatura e com a umidade relativa (tabela 2). Assim, esta enzima, a primeira a atuar no ciclo ascorbato-glutathione (Bray *et al.* 2000), pode exercer um papel importante na defesa das plantas jovens de *C. echinata* contra o estresse oxidativo induzido por fatores ambientais. Resposta semelhante foi observada por Rivero *et al.* (2004), que verificaram que essa enzima foi a única a ser estimulada em plantas de *Lycopersicon esculentum* L. cv. Tmknvf (2) expostas à alta temperatura, enquanto POD, catalase e glutathione reductase foram inibidas.

Na verdade, em ambiente natural, as respostas antioxidativas de plantas às variações abióticas são induzidas por mecanismos similares, que resultam em adaptações a épocas mais secas ou mais úmidas, a dias de maior ou menor incidência luminosa, como também a baixas e altas temperaturas. Isso porque todos esses fatores ambientais extremos levam ao aumento das concentrações das espécies reativas de oxigênio, e, conseqüentemente, estimulam do mesmo modo os antioxidantes (Bray *et al.* 2000, Kuk *et al.* 2003). Por exemplo, Zhou & Zhao (2004) verificaram que gramíneas forrageiras que crescem em regiões montanhosas e frias podem produzir grande quantidade de antioxidantes e assim tolerarem um período de condições climáticas extremas. Por outro lado, os

antioxidantes podem, também, ser estimulados nessas gramíneas, em períodos favoráveis ao crescimento, quando há aumento na produção de espécies reativas de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons dos cloroplastos.

Os resultados obtidos neste estudo permitiram padronizar metodologia de amostragem e de análises de antioxidantes em plantas jovens de *C. echinata* e caracterizar o perfil dos mesmos para a espécie. A concentração de AA e a atividade da POD foram altas, quando comparadas com as de outras espécies arbóreas tropicais. Verificou-se, ainda, que as variações nos antioxidantes nessas plantas ocorreram em resposta a variações sazonais nos fatores do ambiente monitorados. A concentração de GSH e a atividade da POD variaram significativamente em resposta às mudanças na temperatura. A SOD foi mais sensível às mudanças ambientais.

Agradecimentos – À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado concedida à primeira autora (Processo 00/11051-5) e pelo auxílio financeiro (Processo 00/06422-4).

Referências bibliográficas

- ARNDT, U. & SCHWEIZER, B. 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *In* Biological monitoring. Signals from the environment (H. Ellenberg, ed.). Vieweg, Eschborn, p.199-298.
- BARNES, J., BENDER, J.B., LYONS, T. & BORLAND, A. 1999. Natural and man-made selection for air pollution resistance. *Journal of Experimental Botany* 50:1423-1435.
- BRAY, E.A., BAILEY-SERRES, J. & WERETILNYK, E. 2000. Responses to abiotic stresses. *In* Biochemistry & Molecular Biology of Plants (B.B. Buchanan, W. Gruissen, & R.L. Jones, eds.). American Society of Plant Physiologists, New York, p.1158-1203.
- CHAITANYA, K.V., SUNDAR, D., MASILAMANI, S. & REDDY, A.R. 2002. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation* 36:175-180.
- DE KOK, L.J., BOSMA, W., MAAS, F.M. & KUIPER, P.J.C. 1985. The effect of short-term H₂O fumigation on water-soluble sulphydryl and glutathione levels in spinach. *Plant, Cell and Environment* 8:189-194.
- DOMINGOS, M., KLUMPP, A. & KLUMPP, G. 1998. Air pollution impact on the Atlantic forest in the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50:230-236.
- FANGMEIER, A., BRUNSCHÖN, S. & JÄGER, H.J. 1994. Time course of oxidant biomarkers in flag leaves of wheat exposed to ozone and drought stress. *New Phytologist* 126:63-69.
- FOYER, C.H., DESCOURVIÈRES, P. & KUNERT, K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17:507-523.
- KELLER, T. & SCHWAGER, H. 1977. Air pollution and ascorbate. *European Journal of Forest Pathology* 7:338-350.
- KLUMPP, G., GUDERIAN, R. & KÜPERS, K. 1989. Peroxidase- und Superoxiddismutase- Aktivität sowie Prolingehalte von Fichtennadeln nach Belastung mit O₃, SO₂ und NO₂. *European Journal of Forest Pathology* 19:84-97.
- KLUMPP, A., KLUMPP, G. & DOMINGOS, M. (resp.) 1997. Vegetation module. *In* Air pollution and vegetation damage in the tropics - the Serra do Mar as an example - Final report 1990-1996 (D. Klockow, H.T. Targa & W. Vautz, eds). GKSS - Forschungszentrum Geesthacht GmbH, Geesthacht, p.V.1-V.47.
- KLUMPP, G., FURLAN, C.M., DOMINGOS, M. & KLUMPP, A. 2000. Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *The Science of the Total Environment* 246:79-91.
- KOCSY, G., GALIBA, G. & BRUNOLD, C. 2001. Role of glutathione in adaptation and signaling during chilling cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* 113:158-164.
- KUK, Y.I., SHIN, J.S., BURGOS, N.R., HWANG, T.E., HAN, O., CHO, B.H., JUNG, S.Y. & GUH, J.O. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science* 43:2109-2117.
- LEE, M.A., CHUN, H.S., KIM, J.W., LEE, H., LEE, D.H. & LEE, C.B. 2004. Changes in antioxidant enzyme activities in detached leaves of cucumber exposed to chilling. *Journal of Plant Biology* 47:117-123.
- LIMA, H.C., LEWIS, G.P. & BUENO E. 2002. Pau-brasil: uma biografia. *In* Pau-Brasil (E. Bueno, ed.). Axis Mundi Editora, São Paulo, p.39-76.
- MELONI, D.A., OLIVA, M.A., MARTINEZ, C.A. & CAMBRAIA, J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49:69-76.
- MORAES, R.M., KLUMPP, A., FURLAN, C.M., KLUMPP, G., DOMINGOS, M., RINALDI, M.C.S. & MODESTO, I.F. 2002. Tropical fruit trees as bioindicators of industrial air pollution in southeast Brazil. *Environment International* 28:367-374.
- MUGGLI, R. 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. *In* Free radicals and antioxidants in nutrition (F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi & C. Rice-Evans, eds.). Richelieu Press, London, p.189-250.
- OSSWALD, W.F., KRAUS, R., HIPPELI, S., BENZ, B., VOLPERT, R. & ELSTNER, E.F. 1992. Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Physiology* 139:742-748.

- RANK, B. 1997. Oxidative stress response and photosystem efficiency in trees of urban areas. *Photosynthetica* 33:467-481.
- RIVERO, R.M., RUIZ, J.M. & ROMERO, L. 2004. Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79:560-564.
- ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam. Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SPEEK, A., SCHRIJVER, J. & SCHREURS, W.H.P. 1984. Fluorometric determination of total vitamin C and total isovitamin C in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 32:352-355.
- TAKAC, T. 2004. The relationship of antioxidant enzymes and some physiological parameters in maize during chilling. *Plant Soil and Environment* 50:27-32.
- ZHOU, R. & ZHAO, H. 2004. Seasonal pattern of antioxidant enzyme system in the roots of perennial forage grasses grown in alpine habitat, related to freezing tolerance. *Physiologia Plantarum* 121:399-408.