

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

EFEITO DO NO<sub>2</sub> ATMOSFÉRICO EM *Phaseolus vulgaris*  
(FABACEAE/PAPILIONOIDEAE) NO CAMPUS DO VALE/UFRGS

Carla Cristine Müller

BIO  
BIO  
295

Porto Alegre, dezembro de 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA

**EFEITO DO NO<sub>2</sub> ATMOSFÉRICO EM *Phaseolus vulgaris*  
(FABACEAE/PAPILIONOIDEAE) NO CAMPUS DO VALE/UFRGS**

Carla Cristine Müller

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Teresa Raya-Rodriguez  
Co-orientador: Dr. Armando Molina Divan Jr.

Trabalho apresentado  
como um dos requisitos  
para obtenção do grau  
de Bacharel no Curso de  
Ciências Biológicas  
Ênfase Ambiental.

Porto Alegre, dezembro de 2004.

UFRGS

Instituto de Biociências  
Biblioteca Setorial

Nº. Sist.: 461836

Registro: 16284

Nº. Obra: 9931

Data: 15/04/05

Nº Chamada: BIO 295

Cód. Barras: 05451826

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Maria Teresa, por ter me acolhido de forma tão repentina e por todo seu apoio.

Ao meu co-orientador, Dr. Armando, por todo auxílio durante as coletas, interpretação dos dados e na redação deste trabalho.

Às colegas do Laboratório de Bioindicação Vegetal, Carolina e Letícia, pelas idéias, ajuda nas análises de laboratório e de campo e, também, na análise estatística. Valeu, gurias, por "quebrarem meus galhos" tantas vezes!

Aos seguranças do Pórtico de entrada do Campus do Vale e do Bloco IV pelos "cafézinhos", por guardarem meu material e me receberem tão bem durante os dias de amostragem.

Ao Nelson, da Prefeitura Universitária, por permitir a escolha dos pontos de amostragem.

À minha família, dinda, "vós", Cris, por entenderem minhas ausências e todo o tempo que eu passei em frente ao computador.

Ao meu namorado, Matheus, pelas esperas nos finais de tarde, por toda ajuda, apoio e compreensão incondicional e a qualquer momento.

Aos meus pais, Sandra e Valdeni, por todo o apoio desde o início do trabalho. Obrigada pelas caronas, pai. Obrigada por acordar cedo comigo e pelos "almoços diferentes", mãe.

## ÍNDICE

Resumo.....	05
1. Introdução.....	06
1.1. Qualidade do Ar.....	06
1.2. Legislação.....	08
1.3. Efeitos sobre o Meio Ambiente e a Saúde.....	10
1.4. Efeitos sobre as Plantas.....	13
1.5. Objetivos da Monografia.....	15
1.5.1. Objetivo Geral.....	15
1.5.2. Objetivos Específicos.....	16
2. Material e Métodos.....	17
2.1. Dióxido de Nitrogênio (NO <sub>2</sub> ) atmosférico.....	17
2.1.1. Análise de NO <sub>2</sub> atmosférico.....	19
2.2. Exposição das plantas bioindicadoras.....	19
2.2.1. Atividade da enzima Nitrato Redutase.....	20
2.2.2. Biomassa total.....	22
2.2.3. Área Foliar.....	22
2.2.4. Atividade Fotossintética.....	23
2.2.5. Clorofila.....	24
2.3. Análise Estatística.....	24
3. Resultados e Discussão.....	25
3.1. NO <sub>2</sub> atmosférico.....	25
3.2. Atividade da enzima Nitrato Redutase.....	30
3.3. Biomassa.....	35
3.4. Área Foliar.....	38
3.5. Atividade Fotossintética.....	40
3.6. Clorofila.....	41

4. Conclusões.....	44
5. Referências Bibliográficas.....	45

## RESUMO

Os veículos automotores são responsáveis por emissões significativas de óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ). Dentre estes, o  $\text{NO}_2$  tem papel importante na formação de reações fotoquímicas causadoras de névoa, podendo ser prejudicial à saúde, agricultura e materiais, quando em concentrações elevadas. O  $\text{NO}_2$  penetra nas folhas através das trocas gasosas, dissolvendo-se nos fluídos intercelulares e incorporando-se ao metabolismo do nitrogênio das plantas. O objetivo deste trabalho foi quantificar o estresse produzido pela poluição atmosférica em *Phaseolus vulgaris* cv. Iraí, por meio da relação entre a atividade da enzima Nitrato Redutase (NR) e as concentrações atmosféricas do  $\text{NO}_2$ . Em 3 locais de amostragem, situados a distâncias crescentes da Avenida Bento Gonçalves, as plantas foram expostas e a concentração de  $\text{NO}_2$  no ar foi determinada através do método de Griess-Saltzman. O ponto mais próximo da Avenida apresentou a concentração mais elevada ( $40,25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Aos 20, 50 e 70 dias de exposição, as plantas foram analisadas quanto à atividade da enzima NR, biomassa total, área foliar, atividade fotossintética (curva de resposta à pressão parcial de  $\text{CO}_2$ ) e clorofila *a* e total. As concentrações encontradas de  $\text{NO}_2$  atmosférico não causaram efeito sobre os parâmetros analisados. Talvez estas não foram suficientes para elevar a atividade da NR e nem causar alteração na função e estrutura da espécie utilizada.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Qualidade do Ar

A rápida industrialização, bem como o aumento da produção, na sociedade contemporânea, provocam a emissão de grande quantidade de gases para a atmosfera, tanto pelas próprias indústrias, quanto pelos veículos automotores. Uma das conseqüências adversas desse processo é a redução da qualidade do ar nos grandes centros urbanos. Anualmente, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), três milhões de pessoas morrem devido aos efeitos da poluição atmosférica (Costa & Costa, 2004).

Poluir o ar significa lançar, na atmosfera, poluentes que possam comprometer a qualidade da saúde, a segurança e a tranqüilidade do homem (Costa & Costa, 2004) e dos demais organismos vivos. Os poluentes podem ser encontrados ao ar livre ou em ambientes fechados (casas, escritórios). Estes últimos podem sofrer influência do ambiente externo, uma vez que os poluentes ao ar livre podem atingir os ambientes fechados, alterando as concentrações de poluentes nestes locais. Entre os poluentes encontrados ao ar livre, os mais importantes são ozônio ( $O_3$ ), dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), dióxido de enxofre ( $SO_2$ ), monóxido de carbono ( $CO$ ) e partículas em suspensão (Knorst, 2000; Klumpp *et al*, 2001).

Os óxidos de nitrogênio, assim como o monóxido de carbono, dióxido de enxofre, oxidantes totais, hidrocarbonetos totais e partículas são parâmetros principais em medidas rotineiras de controle da qualidade do ar. Constituem-se indicadores potenciais da alteração da composição do ar (Branco & Murgel, 1997). A qualidade do ar pode ser avaliada através de estimativas de emissões, uso de

modelos matemáticos e medidas das concentrações ambientais dos principais poluentes utilizando métodos físico-químicos. Através dessas medidas, pode-se verificar se normas e valores limites para concentrações de poluentes no ar estão sendo respeitadas. Porém, estes resultados não permitem conclusões imediatas sobre os impactos das concentrações atuais de poluentes nos seres vivos. Assim, o uso de bioindicadores é a metodologia adequada para a detecção de efeitos de poluentes atmosféricos sobre os organismos (Klumpp *et al*, 2001).

A poluição atmosférica pode ser gerada por diversas fontes, que são, segundo SMAM (2000), as forças naturais, fontes fixas e móveis. As forças naturais são aquelas que emitem grandes quantidades de poluente, sem a interferência do homem, como ventos (dispersão de partículas em suspensão), erupções vulcânicas (liberação de gases tóxicos, compostos de enxofre e material particulado), queimadas. As fontes fixas são indústrias, atividades comerciais, queima de combustíveis e tantas outras envolvendo a ação direta do homem. Os tipos de poluentes emitidos por estas fontes variam de acordo com a matéria prima empregada no processo, combustível utilizado, subprodutos gerados e o próprio produto final.

Atenção especial merecem as fontes móveis, ou seja, os veículos automotores, pois são as mais poluidoras. A queima incompleta dos combustíveis utilizados libera para a atmosfera grande quantidade de substâncias, como gás carbônico ( $CO_2$ ), hidrocarbonetos,  $SO_2$ , etano, álcoois, CO e óxidos de nitrogênio (NO - monóxido de nitrogênio - e  $NO_2$ ). As concentrações emitidas de cada poluente dependem do motor do veículo. Atualmente, existem dois motores, os do ciclo Otto e os do ciclo Diesel.

Os motores do ciclo Otto equipam a maioria dos veículos leves movidos à gasolina, álcool ou gás natural, e são responsáveis pela emissão de altas concentrações de CO e, em menores quantidades, emitem óxidos de nitrogênio ( $NO_x$ ), hidrocarbonetos não queimados (HC), aldeídos, ácidos entre outros. Os

motores do ciclo Diesel, que equipam os veículos pesados movidos à óleo diesel (ônibus e caminhões), apresenta como característica maior pressão e temperatura na câmara de combustão, implicando uma maior produtividade de óxidos de nitrogênio. Os demais poluentes são emitidos em baixas concentrações (Branco & Murgel, 1997; Melchioris, 2000).

A regulagem dos motores é uma forma de controlar as emissões desses veículos. Na década de 70, os motores eram regulados para a potência máxima, ou seja, uma mistura de ar-combustível com excesso de combustível, causando grande emissão de CO e HC e baixa emissão de NO<sub>x</sub>. Em seguida, os motores passaram a ser regulados para serem econômicos, emitindo menos CO e mais NO<sub>x</sub> (Melchioris, 2000).

## 1.2. Legislação

A crescente preocupação com a integridade da qualidade do ar e da saúde, bem como do ambiente, resultou na elaboração de uma legislação voltada para os limites máximos permitidos para emissões de poluentes na atmosfera.

A Resolução CONAMA nº 003 de 28 de junho de 1990, define poluente atmosférico como qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar:

- 1 - impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde;
- 2 - inconveniente ao bem-estar público;
- 3 - danoso aos materiais, à fauna e flora;
- 4 - prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade.

Estabelece, também, que Padrões de Qualidade do Ar são as concentrações de poluentes atmosféricos que, ultrapassadas, poderão afetar a saúde, a segurança e o bem-estar da população, bem como ocasionar danos à flora e à fauna, aos materiais e ao meio ambiente em geral. Dessa forma, os Padrões Primários de Qualidade do Ar são as concentrações de poluentes que, ultrapassadas, poderão afetar a saúde da população. Os Padrões Secundários de Qualidade do Ar são as concentrações de poluentes abaixo das quais se prevê o mínimo efeito adverso sobre o bem-estar da população, assim como o mínimo dano à fauna, à flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral.

Assim, de acordo com a mesma Resolução, ficam estabelecidos os Padrões de Qualidade do Ar para os principais poluentes atmosféricos. A Tabela 1.1 apresenta os valores permitidos para o poluente Dióxido de Nitrogênio (NO<sub>2</sub>), pois constitui-se objeto de estudo nesta Monografia.

**Tabela 1.1.** Limites de concentração relacionados ao tempo de exposição para o poluente Dióxido de Nitrogênio (NO<sub>2</sub>), de acordo com a Resolução CONAMA 03/90.

POLUENTE	PADRÃO PRIMÁRIO	PADRÃO SECUNDÁRIO
NO <sub>2</sub>	100 µg/m <sup>3</sup> média aritmética anual	100 µg/m <sup>3</sup> média aritmética anual
	320 µg/m <sup>3</sup> média de 1 hora	190 µg/m <sup>3</sup> média de 1 hora

De acordo com Melchior (2000), grande parte dos poluentes primários emitidos nos grandes centros urbanos é gerada pelos veículos automotores. O

tipo de emissão e a concentração de poluentes emitidos dependem das características dos motores e do tipo de combustível utilizado, como citado anteriormente. Em função disso, a Resolução CONAMA 18/86 cria o PROCONVE (Programa Nacional de Controle de Poluição por Veículos Automotores) estabelecendo os limites de emissões de NO<sub>x</sub> para veículos leves novos (Tabela 1.2) e a Resolução CONAMA 08/93, para veículos pesados novos (Tabela 1.3).

**Tabela 1.2.** Limites de emissões de NO<sub>x</sub> para veículos leves novos, segundo a Resolução CONAMA 18/86.

Ano de fabricação	NO <sub>x</sub> (g/km)
Julho 1989	2,0
Janeiro 1992	1,4
Janeiro 1997	0,6

**Tabela 1.3.** Limites de emissões de NO<sub>x</sub> para veículos pesados novos, segundo a Resolução CONAMA 08/93.

Ano de fabricação	NO <sub>x</sub> (g/kWh)
Março 1994	14,4
Janeiro 1996	9,0
Janeiro 2000	7,0

### 1.3. Efeitos sobre o Meio Ambiente e a Saúde

O Dióxido de Nitrogênio (NO<sub>2</sub>) é resultante de processos de combustão a altas temperaturas, nos quais o oxigênio (O<sub>2</sub>) e o nitrogênio atmosférico combinam-se gerando o NO, que por sua vez combina-se com O<sub>2</sub> sob intensa radiação solar formando NO<sub>2</sub>, um composto altamente tóxico (Branco & Murgel, 1997; SMAM, 2000; Siegwolf *et al.*, 2001; Baird, 2002). Ocorre, em ar limpo, a uma concentração típica inferior a 7,5 µg/m<sup>3</sup> e, em ar poluído, a 376 µg/m<sup>3</sup>, tendo como tempo de residência médio na atmosfera de 5 a 10 dias (Larcher, 2000).

No meio ambiente, o  $\text{NO}_2$  é um dos principais compostos envolvidos na formação do *smog* fotoquímico (Cantelli, 1999; SMAM, 2000; Baird, 2002; Costa & Costa, 2004). Além deste, destacam-se  $\text{NO}$ , compostos orgânicos voláteis, dióxido de dissulfureto, aerossóis, ácidos, outros gases e material particulado. Os gases provenientes das indústrias, dos veículos automotores e, também das casas devido aos processos de combustão, reagem com a luz solar produzindo o *smog*. Este fenômeno constitui-se em uma névoa química (camada acinzentada sobre áreas urbanas) caracterizada pela presença de ozônio troposférico. Os produtos finais do *smog*, além do ozônio, são ácido nítrico e compostos orgânicos parcialmente oxidados, agentes potenciais de números problemas de saúde.

A fumaça carregada de agentes poluentes que sai das chaminés industriais e do escapamento dos veículos automotores pode atingir as nuvens, misturar-se com a água e, através do ciclo hidrológico, retornar a superfície terrestre sob a forma de chuva ácida. Isso ocorre porque alguns poluentes, entre eles o  $\text{NO}_2$ , reagem quimicamente com as moléculas da água. O  $\text{NO}_2$  pode ser hidrolisado, formando ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e/ou ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) freqüentes em precipitações ácidas (Branco & Murgel, 1997; Costa & Costa, 2004). O ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) também está presente nas chuvas ácidas e, junto com o  $\text{HNO}_3$ , provocam acidificação das águas de rios e lagos, com conseqüente mortalidade dos peixes e de toda a vida aquática, acidificação do solo, destruindo os microrganismos responsáveis pela sua fertilidade e provocando a morte das florestas.

Segundo Costa & Costa (2004), a chuva ácida constitui-se um dos principais temas ecológicos da atualidade, por causa do seu caráter nocivo à saúde humana, às plantas (destruição de florestas por queima das folhas), animais, solos, ambientes aquáticos, construções e monumentos (corrosão). Branco & Murgel (1997) sugerem que, provavelmente, a destruição da Mata

Atlântica, em São Paulo, também se deva, em parte, à acidez das neblinas que, quase permanentemente, envolve as árvores.

O efeito estufa, em se tratando de meio ambiente, é uma preocupação mundial (Costa & Costa, 2004). O aquecimento do Planeta decorre da elevação de gases poluentes lançados na atmosfera sem que a natureza consiga absorvê-los. Os gases de efeito estufa, como são denominados, absorvem a radiação térmica emitida da superfície da Terra, impedindo sua expansão para o espaço. Os principais gases de efeito estufa são  $\text{CO}_2$ , metano ( $\text{CH}_4$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ),  $\text{NO}_x$  e os clorofluorcarbonetos (CFC) (Baird, 2002).

O  $\text{NO}_2$  é de grande importância na formação do ozônio ( $\text{O}_3$ ) troposférico. Na presença da luz solar, o  $\text{NO}_2$  é transformado em NO e oxigênio atômico reativo. Este combina-se com o oxigênio atmosférico ( $\text{O}_2$ ), resultando em  $\text{O}_3$  (Larcher, 2000). A formação do ozônio troposférico está associada à ocorrência de *smog* fotoquímico e, da mesma forma que este, traz problemas para o ambiente. Este poluente, além de ser um dos gases de efeito estufa, causa danos em colheitas (culturas de feijão-branco não se desenvolvem satisfatoriamente) e afeta materiais (endurece borrachas, reduz o tempo de vida útil de pneus de automóveis e branqueia tecidos). Seus efeitos, na saúde humana, podem ser sentidos por pessoas fortes e saudáveis, assim como por pessoas que apresentam problemas respiratórios. Dentre eles, destacam-se irritação passageira do sistema respiratório, produzindo tosse, irritação da garganta e do nariz, respiração ofegante e dor no peito durante a respiração profunda. Em nível molecular, o  $\text{O}_3$  ataca substâncias que contenham a ligação C=C em sua estrutura, tais como as encontradas nos tecidos pulmonares levando à sua destruição. Por isso, há uma diminuição na resistência às doenças infecciosas (Baird, 2002).

Knorst (2000) aponta que a inalação, a ingestão e o contato com a pele ou mucosas são as rotas de exposição aos poluentes ambientais mais importantes

do organismo humano. Entretanto, a principal entrada de substâncias agressivas presentes no ar ocorre pela via aérea. Após inalação de gases poluentes, o local de deposição vai depender da concentração do gás, solubilidade, duração da exposição, frequência e profundidade da respiração e potencial reativo do gás. Já os seus efeitos no aparelho respiratório humano vão depender do tipo de poluente, do grau de exposição e da susceptibilidade individual. As pessoas mais suscetíveis aos problemas com poluentes do ar são crianças, idosos, portadores de asma ou doença pulmonar crônica, tabagistas e pessoas com cardiopatia crônica. O  $\text{NO}_2$  tem solubilidade baixa e penetra na periferia do pulmão, onde 60% do total inalado é depositado.

A emissão de  $\text{NO}_2$  acima dos limites definidos pela Resolução CONAMA 03/90 pode provocar irritação nos olhos e mucosas em geral, anemia devido à formação da meta hemoglobina, além de enfisema pulmonar. Nos pulmões, ele é precursor de substâncias cancerígenas, como as nitrosaminas, que podem levar ao câncer de pulmão (Branco & Murgel, 1997; SMAM, 2000). Em crianças, o  $\text{NO}_2$  produzido a partir de gás de cozinha em ambiente fechado, aumenta os sintomas e doenças respiratórias. Já em ambientes com excesso desse poluente, ou mesmo locais abertos, demonstram que o  $\text{NO}_2$  altera os mecanismos de defesa das vias aéreas contra patógenos respiratórios, causa inflamação destas vias e efeitos sobre os sintomas respiratórios e função pulmonar (Knorst, 2000).

#### **1.4. Efeitos sobre as Plantas**

O nitrogênio é obtido pelas plantas terrestres a partir do solo, sob a forma iônica  $\text{NO}_3^-$ , e utilizado na síntese de proteínas, incorporando-se aos compostos de carbono nos grupos amino, formando aminoácidos. A enzima

Nitrato Redutase (NR) desempenha papel decisivo na assimilação de nitrogênio: catalisa a redução de nitrato a nitrito. A atividade da enzima NR é específica de cada órgão (nas árvores ela é maior nas raízes e em plantas herbáceas, nas folhas) e é dependente da idade (a atividade é máxima nos estágios jovens e nos órgãos em crescimento). Esta enzima possui uma meia vida curta de cerca de poucas horas. Por isso, apresenta uma alta taxa de síntese, sendo regulada, ao nível de expressão gênica pela luz e pela concentração de nitrato (Larcher, 2000).

Em ambientes muito contaminados por  $\text{NO}_2$ , a síntese desta enzima tem sua taxa elevada. Dessa forma, é induzida a sua atividade, atuando como um mecanismo de detoxificação da planta. Um maior teor de proteínas solúveis é produzido, interferindo no metabolismo normal da planta. Assim, estes efeitos podem ser usados para quantificar o estresse produzido pela poluição atmosférica em plantas bioindicadoras, pois há relação entre a atividade da NR e as concentrações ambientais do poluente  $\text{NO}_2$  (Stulen *et al.*, 1998; Raya-Rodriguez, 2000; Siegwolf *et al.*, 2001).

O  $\text{NO}_2$  pode entrar nas folhas através das aberturas estomáticas e, também, difundir-se rapidamente pela cutícula. Quando em contato com a água, na parede celular, o  $\text{NO}_2$  é hidrolisado, formando os ácidos fortes  $\text{HNO}_2$  e  $\text{HNO}_3$ , que se dissociam em nitrito e nitrato, respectivamente. Estes íons podem ser absorvidos ativamente pelas células vivas e utilizados pela planta, como fonte de nitrogênio, na síntese protéica (Stulen *et al.*, 1998; Larcher, 2000; Raya-Rodriguez, 2000; Siegwolf *et al.*, 2001).

Assim, o  $\text{NO}_2$  é uma fonte de nitrogênio para as plantas, quando em altas concentrações (Stulen *et al.*, 1998; Siegwolf *et al.*, 2001), mas pode causar lesões, como a acidificação das folhas (Larcher, 2000). O  $\text{NO}_2$  também exerce efeito tóxico, inibindo o mecanismo da fotossíntese, através da redução da condutância estomática (Siegwolf *et al.*, 2001) e reduzindo, significativamente, a

resistência do vegetal ao ataque das pragas (Branco & Murgel, 1997). De acordo com Moraes *et al.* (2000), o processo fotossintético é um dos primeiros a ser afetado pela ação dos poluentes atmosféricos, ocorrendo sua redução antes que sintomas visíveis apareçam nas plantas. Os danos podem atingir os movimentos estomáticos, a captação de energia luminosa e a fixação bioquímica do  $CO_2$ . Embora a redução da fotossíntese possa resultar em redução de crescimento, essa relação não é linear, pois a exposição aos poluentes causa alteração na distribuição do carbono entre os órgãos da planta, ocorrendo maior produção de biomassa foliar (Siegwolf *et al.*, 2001).

Plantas expostas às fontes emissoras de  $NO_x$  podem apresentar concentrações foliares dos pigmentos fotossintéticos, clorofilas a e b, mais altas, pois o nitrogênio proveniente desses poluentes pode ser utilizado na síntese de clorofila. Isso não implica em aumento da taxa de fotossíntese, isto é, embora haja um maior teor de clorofila, ocorre diminuição da eficiência do uso desse pigmento na fotossíntese.

## 1.5. Objetivos da Monografia

### 1.5.1. OBJETIVO GERAL:

Quantificar o estresse produzido pela poluição atmosférica em plantas bioindicadoras, por meio da relação entre a atividade da enzima Nitrato Redutase (NR) e as concentrações atmosféricas do  $NO_2$ .

### 1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) identificar se existe um gradiente da concentração de  $\text{NO}_2$  atmosférico ao longo do Campus do Vale/UFRGS;
- b) determinar os efeitos deste poluente em plantas expostas, através da análise da atividade da enzima Nitrato Redutase;
- c) correlacionar a concentração de  $\text{NO}_2$  do ar com a atividade da enzima Nitrato Redutase;
- d) verificar e correlacionar os efeitos em períodos de curta duração (20 dias) e em períodos de longa duração (50 e 70 dias).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os pontos de amostragem foram localizados em três locais determinados, distribuídos no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, a saber (Figura 2.1):

PONTO 1 (P1): junto ao pórtico de entrada do Campus, próximo à guarita dos seguranças ( $30^{\circ} 04' 30,2'' S/051^{\circ} 07' 27,5'' W$ );

PONTO 2 (P2): portão de entrada da Prefeitura Universitária do Campus ( $30^{\circ} 04' 11,0'' S/051^{\circ} 07' 04,5'' W$ );

PONTO 3 (P3): junto à casa da segurança, no Bloco IV, próximo ao Morro Santana - ponto controle - ( $30^{\circ} 04' 02,0'' S/051^{\circ} 07' 16,4'' W$ ).

O ponto 1 situa-se a 100 metros da avenida expressa Bento Gonçalves, importante via de ligação entre as cidades de Porto Alegre e Viamão. Recebe um grande fluxo de veículos, tanto automóveis particulares como coletivos, transportando trabalhadores para ambas as cidades, e estudantes com destino à UFRGS.

O ponto 3, próximo ao Morro Santana, está a 1 km de distância do ponto 1, e sofre pouca ou nenhuma influência das emissões veiculares. Esta foi a razão da escolha deste ponto como controle.

O ponto 2 está localizado em uma posição intermediária entre os pontos 1 e 3, situado à distância de 800 metros do ponto 1 e 100 metros do ponto 3.

### 2.1. Dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) atmosférico

A análise do  $NO_2$  atmosférico foi realizada nos mesmos locais de exposição das plantas. No ponto 1, foram realizadas 30 horas de amostragem e nos outros pontos, 18 horas, determinando-se a concentração atmosférica desse poluente em  $\mu g/m^3$ . As amostragens foram realizadas nos seguintes dias,

constituindo-se repetições da análise: P1 em 20 de maio, 01 de junho, 25 de junho e 17 de agosto de 2004; P2, 27 de julho e 03 de agosto de 2004 e P3, 28 de julho e 05 de agosto de 2004.

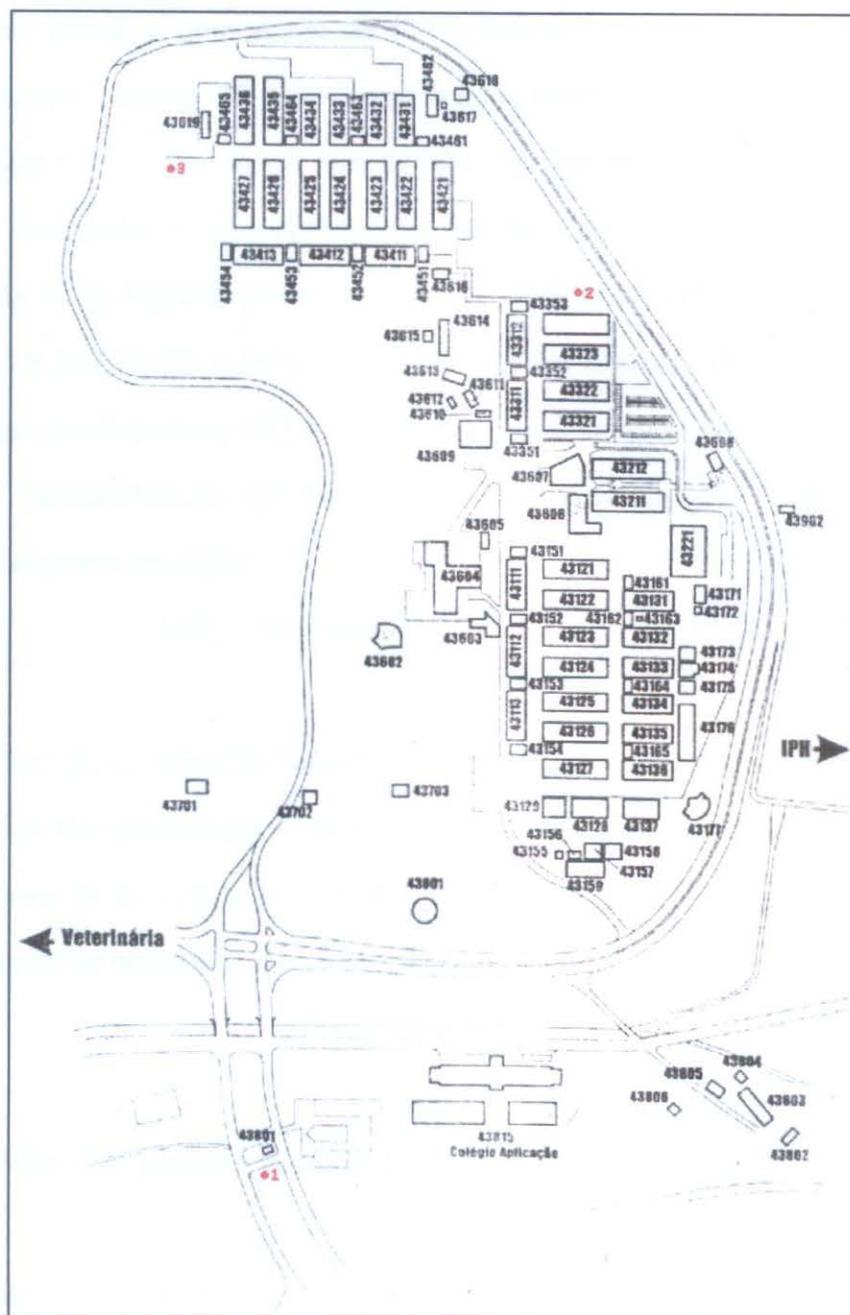


Figura 2.1. Representação esquemática do Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, indicando a localização dos três pontos de amostragem (vermelho).

### 2.1.1. Análise de NO<sub>2</sub> atmosférico

A concentração de NO<sub>2</sub> no ar ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) foi determinada através do método químico de Griess-Saltzman (ASTM, 1987). A amostra de ar foi aspirada, por bomba de vácuo, a uma vazão de 0,4 L/min através de um amostrador de ar (marca La Motte, modelo BD 1944), em frasco borbulhador de vidro com difusor sinterizado em intervalos de 45 min. O NO<sub>2</sub> foi absorvido em 10 mL de reagente específico, contendo ácido sulfanílico, ácido acético glacial, acetona e dicloridrato de N-(1-Naftil)-etilenodiamina a 0,1%, formando um azo-corante. A intensidade da coloração avermelhada foi lida em espectrofotômetro UV-Visível (marca Varian, modelo Cary 1E) a 550 nm, após um tempo mínimo de 15 min.

A concentração de NO<sub>2</sub> atmosférico, em  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , foi determinada através da seguinte equação:

$$\text{NO}_2 = (\text{absorbância} \times K \times 10^3 \times v) / V$$

onde:

K = fator de calibração (microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de NO<sub>2</sub> por mL de reagente de absorção, para dar absorbância de exatamente 1);

V = volume de ar coletado, litros;

v = volume de reagente de absorção utilizado, mL.

### 2.2. Exposição das plantas bioindicadoras

Nos três pontos de amostragem foram expostas seis plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Irai, feijoeiro. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos plásticos individuais, com 13 cm de diâmetro e 11 cm de altura. O solo utilizado foi coletado em várzea de um rio, na cidade de Feliz, misturado com areia, sendo que os vasos receberam 2/3 de solo e 1/3 de areia.

Após a germinação das sementes, as plantas permaneceram na casa de vegetação por 14 dias.

Os vasos foram encaixados em placas de isopor, de 9 cm de altura, com capacidade para seis vasos cada, e colocadas sobre bacia plástica com capacidade para 44 litros de água. Cada vaso recebeu duas cordas de nylon sedoso que saíam pelo fundo do vaso e imergiam na água. A água ao subir por capilaridade, umidificava o solo. Cada conjunto (seis vasos encaixados em placas de isopor sobre uma bacia plástica) foi colocado em um suporte de madeira com dimensões de 45 cm por 65 cm e 85 cm de altura do nível do solo.

As plantas foram expostas, nos locais acima citados, no dia 8 de junho de 2004. Neste momento, duas plantas, que permaneceram na casa de vegetação, foram submetidas ao conjunto de análises ao qual as plantas expostas também o foram. Estas plantas serviram como amostra controle, ou seja, uma referência para a comparação dos resultados obtidos com as plantas expostas nos diversos locais de avaliação.

Após 20 dias, 50 dias e ao final do ciclo de vida da planta, dois vasos foram retirados de cada ponto para avaliação dos seguintes parâmetros (em duplicata): biomassa total, área foliar, atividade fotossintética, clorofila, atividade da enzima Nitrato Redutase.

### **2.2.1. Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR)**

A análise da atividade da enzima NR foi determinada através da concentração de nitrito em solução, de acordo com o método Klumpp *et al.* (1989) modificado.

Vinte discos foliares (5 mm de diâmetro) foram cortados, em duplicata, da segunda folha trifoliolada e colocados em tubos de ensaio contendo

5mL de solução Tampão Fosfato de Sörensen pH 7,5 KNO<sub>3</sub> 0,1 M Isopropanol 1%. Os tubos foram para um dessecador no qual foi feito vácuo por 1 min, 3 vezes. Após, os tubos foram incubados à 30°C em banho-maria, no escuro, por um período de 10 a 30 min. Após cada um destes tempos, foi retirada uma alíquota de 1mL, a qual foi adicionado 1mL de Sulfonilamida 1% em HCl 1N e 1mL de N-(1-Naphtyl)etilenodiamina dihidroclorida 0,01%. A leitura foi feita em fotômetro (marca Merck, modelo SQ300) a 540 nm, após 30 min de reação.

A atividade da enzima, expressa em  $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ , foi obtida através da seguinte equação:

$$\text{ANR} = ((\Delta M_{30'} - M_{10'}) \times 3 / \text{MF}) / 1000$$

em que

$$(\Delta M_{30'} - M_{10'})$$

é igual a média entre as repetições 1 e 2 do tempo 30 min, subtraindo-se a média entre as repetições 1 e 2 do tempo 10 min, usando

$$((\text{AbsR} - K) / I) \times 5$$

onde:

ANR = atividade da enzima NR;

M<sub>30'</sub> = média entre as duas repetições da alíquota de 30 min;

M<sub>10'</sub> = média entre as duas repetições da alíquota de 10 min;

MF = média entre a massa fresca dos discos foliares das duas alíquotas;

AbsR = absorvância de cada repetição;

K = interceptação da curva de calibração no eixo Y;

I = inclinação da curva de calibração.

### 2.2.2. Biomassa total

A biomassa total das plantas foi obtida através de peso seco, em gramas (g). As plantas foram separadas em folhas, caule e raízes e, então, colocadas em estufa a 60°C por 7 dias. A seguir, foi feita a pesagem.

Com os dados da biomassa total foi analisada a taxa de crescimento relativo (RGR) de acordo com a equação proposta por Hunt (1990):

$$RGR = (\ln m_2 - \ln m_1) / (t_2 - t_1)$$

onde:

RGR = taxa de crescimento relativo, em  $g\ g^{-1}\ d^{-1}$

ln = logaritmo natural

$m_2$  = massa final, em g

$m_1$  = massa inicial, em g

$t_1$  = tempo inicial, em dias

$t_2$  = tempo final, em dias

### 2.2.3. Área foliar

A área foliar,  $mm^2$ , foi determinada através da medição direta das folhas, utilizando um medidor de área portátil LI-COR, modelo LI-3000. Também foram calculadas a razão de área foliar (LAR) e a área foliar específica (SLA), de acordo com as seguintes equações (Hunt, 1990):

$$LAR = ([L_{A1}/W_1] + [L_{A2}/W_2])/2$$

onde:

LAR = razão de área foliar, em  $mm^2\ mg^{-1}$ ;

$L_A$  = área foliar total por planta, em  $\text{mm}^2$ ;

$W$  = peso seco total por planta, em mg.

$$SLA = ([L_{A1}/L_{W1}] + [L_{A2}/L_{W2}])/2$$

onde:

$SLA$  = área foliar específica, em  $\text{mm}^2 \text{mg}^{-1}$ ;

$L_A$  = área foliar total por planta, em  $\text{mm}^2$ ;

$L_W$  = peso seco foliar total por planta, em mg.

#### 2.2.4. Atividade Fotossintética

A atividade fotossintética foi analisada com um analisador de gases por infravermelho (CIRAS-2), através da curva de resposta da fotossíntese à pressão parcial de  $\text{CO}_2$ , utilizando o software Ciras 2 - RCS V 1.01.

Os valores da atividade fotossintética máxima ( $A_{\text{máx}}$ ), do ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  ( $c$ ) e da eficiência de carboxilação foram obtidos a partir do ajuste dos dados da atividade fotossintética à equação proposta por Prado & de Moraes (1997), adaptada para a concentração interna de  $\text{CO}_2$ :

$$A = A_{\text{máx}}(1 - e^{-k(CI - c)}),$$

onde:

$A$  = assimilação

$K$  = convexidade da curva (variando de 0,001 a 0,009)

$CI$  = a concentração interna de  $\text{CO}_2$

$c$  = ponto de compensação de  $\text{CO}_2$ .

### 2.2.5. Clorofila

A análise do pigmento clorofila foi adaptada da metodologia proposta por Knudson *et al.* (1977). Cinco discos foliares (7 mm de diâmetro) foram cortados da segunda folha trifoliolada e acondicionados em frascos escuros. O pigmento foi extraído em álcool etílico 96%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro digital (marca Micronal, modelo B342II) a 649 nm e 665 nm, após um período de extração de 15 dias.

A concentração de clorofila, expressa em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de solução, foi determinada a partir das seguintes equações:

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,7 \times \text{Abs } 665 - 5,76 \times \text{Abs } 649$$

$$\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 25,8 \times \text{Abs } 649 - 7,6 \times \text{Abs } 665$$

onde:

Abs 665 = absorbância a 665 nm;

Abs 649 = absorbância a 649 nm;

Os resultados finais foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  de peso seco.

### 2.3. Análise Estatística

Os dados obtidos nas análises das plantas e os dados das amostragens do  $\text{NO}_2$  atmosférico foram submetidos à Análise da Variância (ANOVA) após aleatorização ( $p < 0,05$ ) mediante o emprego do software Multiv, versão 2.1.1.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. NO<sub>2</sub> atmosférico

O NO<sub>2</sub> atmosférico é um poluente diretamente relacionado com os veículos automotores, ou seja, a sua principal fonte emissora (Branco & Murgel, 1997; Melchioris, 2000).

A maior concentração de NO<sub>2</sub> atmosférico foi encontrada no ponto 1, devido à proximidade da Avenida Bento Gonçalves (100m). Entretanto, os resultados não mostraram a existência de um gradiente da concentração de NO<sub>2</sub> atmosférico ao longo do Campus do Vale (Figura 3.1), pois a diferença na concentração desse poluente entre os pontos foi baixa (Tabelas 3.1 e 3.2).

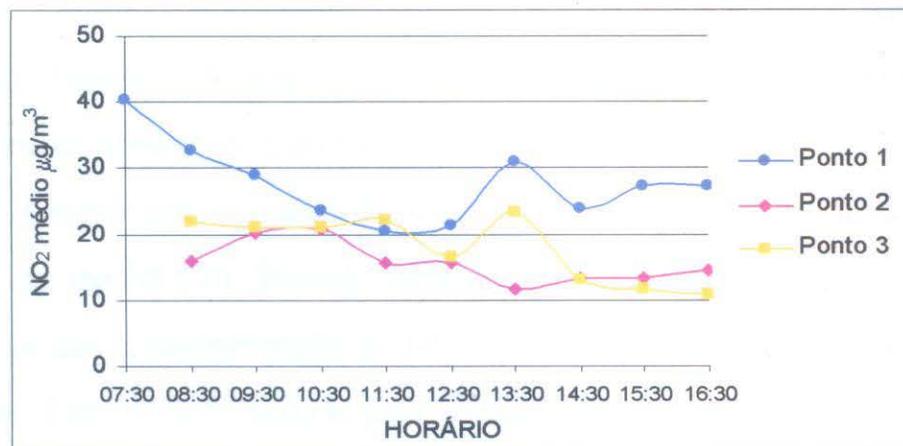
A localização dos pontos de amostragem pode ter influenciado os valores da concentração de NO<sub>2</sub> obtidos, pois, nos três pontos, procurou-se colocar os suportes com as plantas em um local seguro, para que não houvesse o ataque de vândalos. No ponto 1, o local mais apropriado seria no canteiro central da Avenida Bento Gonçalves, porém, ficava fora do alcance de visão dos seguranças do Pórtico. O mesmo ocorreu para o ponto 3. Um local mais próximo ao Morro Santana, afastado do anel viário, apresentaria menor influência do fluxo de veículos que circulam pelo Bloco IV.

**Tabela 3.1.** Concentração de NO<sub>2</sub> atmosférico no Ponto 1.

Hora	Concentração NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )			
	20/Mai	01/Jun	25/Jun	17/Ago
07:30			45,49	35,00
08:30	23,32	32,84	31,83	42,66
09:30	19,71	26,60	23,40	45,79
10:30	16,91	23,97	20,37	33,52
11:30	20,03	16,91	16,69	27,92
12:30		22,33	23,07	18,28
13:30		45,73	28,47	18,78
14:30			20,78	27,01
15:30			23,89	30,88
16:30			19,64	35,00

**Tabela 3.2.** Concentração de NO<sub>2</sub> atmosférico nos Pontos 2 e 3.

Hora	Concentração NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )			
	Ponto 2		Ponto 3	
	27/Jul	03/Ago	28/Jul	05/Ago
08:30	12,93	18,61	24,79	18,70
09:30	18,00	22,24	22,01	19,85
10:30	23,89	17,87	13,34	28,50
11:30	16,61	14,82	9,98	34,18
12:30	15,79	15,32	7,44	25,70
13:30	9,74	13,51	12,52	34,10
14:30	10,47	16,14	8,92	16,97
15:30	12,35	14,25	9,16	14,17
16:30	15,30	13,51	9,90	11,86



**Figura 3.1.** Concentração média, ao longo do dia, de NO<sub>2</sub> atmosférico nos três pontos de amostragem ao longo do Campus do Vale/UFRGS.

No ponto 3, a concentração de NO<sub>2</sub> encontrada não foi a mais baixa em relação aos outros pontos. Isso se deve, talvez, às obras de reparação de parte do Anel Viário e construção de uma rua de acesso interno aos prédios do Bloco IV, localizadas próximo ao ponto, durante o período de amostragem.

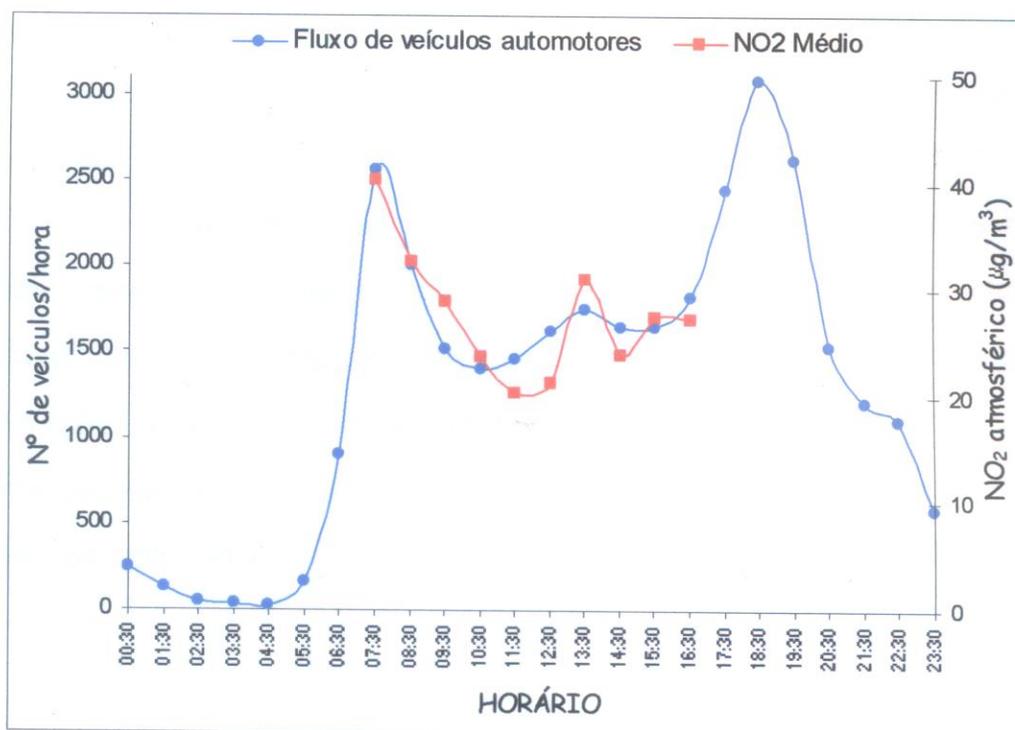
Hargreaves, *et al.* (2000) realizaram um estudo em relação à variação local e sazonal dos níveis de NO<sub>2</sub>, em Rothamsted/Inglaterra, e constataram que a concentração do NO<sub>2</sub> era maior próximo a uma estrada e, à medida que se distanciava desta, a concentração se reduzia. À 80m de distância da estrada, a concentração encontrada foi de 43,5 µg NO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> e no presente estudo, o ponto 1, localizado à 100m da Avenida Bento Gonçalves, apresentou concentração máxima de 40,25 µg NO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>. Além de estradas, indústrias também podem ser fontes emissoras deste poluente, em que sua concentração é maior nas proximidades da indústria e menor distante dela, como relatado por Klumpp *et al.* (1998).

O ponto 1 apresentou diferença significativa com os outros pontos ( $p=0,0001$ ) (Tabela 3.3), confirmando a relação direta entre o fluxo de veículos e a concentração atmosférica do  $\text{NO}_2$ , como mostra a Figura 3.2.

A maior concentração de  $\text{NO}_2$  coincidiu com o pico de fluxo de veículos no início da manhã (7h 30min). Antes desse horário, o fluxo é reduzido e, acredita-se que a concentração de  $\text{NO}_2$  também o seja, embora não tenha sido amostrada. Esta relação ocorre, pois, a maior parte do fluxo de veículos na Av. Bento Gonçalves deve-se às pessoas que partem de suas residências, em Viamão, em direção ao local de trabalho, em Porto Alegre, nesse horário. Esta avenida faz a ligação entre as cidades de Porto Alegre e Viamão (cidade-dormitório de Porto Alegre), e outro pico repete-se ao final da tarde (18h 30min), com o retorno dos trabalhadores às suas casas.

**Tabela 3.3.** Resultado da análise estatística entre os pontos de amostragem. (P1=ponto 1; P2=ponto 2; P3=ponto 3; letras diferentes indicam diferença significativa pela ANOVA, sendo  $p < 0,05$ .)

Relação entre pontos	p
P1xP2	0,0001 A
P1xP3	0,0003 A
P2xP3	0,4524 B



**Figura 3.2.** Concentração média de NO<sub>2</sub> atmosférico no Ponto 1 em relação ao fluxo de veículos na Av. Bento Gonçalves (dados do Parda Bento 01P, dia 09 de julho de 2004, fornecido pela EPTC/Porto Alegre).

Hargreaves *et al.* (2000) analisaram a influência das condições meteorológicas em relação à concentração de NO<sub>2</sub> atmosférico. A velocidade do vento apresentou correlação negativa com a concentração de NO<sub>2</sub>. Entretanto, deve-se ter cuidado na interpretação dos resultados, pois pode levar a uma subestimativa da concentração real do poluente, devido à mistura do ar. Porém, a direção do vento pode estar diretamente relacionada com os níveis de NO<sub>2</sub>.

O Campus do Vale está situado no Morro Santana, localizado no prolongamento mais a nordeste da Crista de Porto Alegre, e fica na direção dos ventos predominantes no município de Porto Alegre. Segundo Menegat *et al.* (1998), a frequência anual das principais direções do vento são leste (22%),

leste-sudeste (17%), sudeste (14%), sul (11%), oeste (8%) e sul-sudeste (7%). Portanto, os poluentes atmosféricos, entre eles o  $\text{NO}_2$ , podem ser transportados na direção dos pontos de amostragem, recebendo possível influência dos ventos.

Caso houvesse influência do vento, os três pontos de amostragem poderiam apresentar concentrações de  $\text{NO}_2$  equivalentes. Entretanto, a velocidade do vento propicia mistura do ar, ocorrendo uma diluição das concentrações dos poluentes. Assim, esta poderia ser a razão pela qual a concentração de  $\text{NO}_2$  só foi elevada no ponto 1, influenciada, diretamente, pelo  $\text{NO}_2$  emitido pelos veículos automotores que trafegam na Av. Bento Gonçalves.

### 3.2. Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR)

A enzima NR é fundamental para a planta no Metabolismo do Nitrogênio. O nitrogênio absorvido do solo, através das raízes, preferencialmente, sob a forma de nitrato ou amônio deve ser assimilado. O primeiro passo da assimilação é a redução do nitrato a nitrito, papel desempenhado pela NR (Larcher, 2000). Em plantas do gênero *Phaseolus*, a redução do nitrato ocorre, principalmente, nas folhas, com baixa atividade da NR em raízes e nódulos. A espécie *P. vulgaris* apresenta cerca de 95% da atividade total da NR localizada nas folhas (Silveira, *et al.*, 2001).

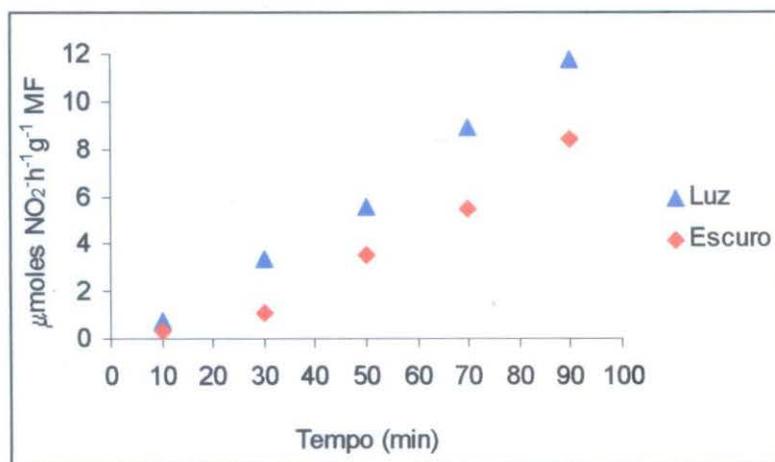
A atividade da NR é regulada pela disponibilidade de NADH, nitrato (seu substrato) e produtos finais da redução do nitrato, como a amônia ( $\text{NH}_3$ ). Entretanto, a expressão da sua atividade pode ser afetada pelas condições da análise. Por isso, a padronização das condições do ensaio para cada espécie torna-se fundamental, segundo Nievola & Mercier (2001).

Na tentativa de adequar a análise da atividade da NR para a espécie *P. vulgaris* utilizada neste trabalho, verificou-se o melhor tempo de incubação e a

melhor condição de luz para as plantas até a realização do ensaio (Tabela 3.4 e Figura 3.3).

**Tabela 3.4.** Atividade da enzima NR ( $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) em diferentes tempos de incubação para plantas que permaneceram em luz ou escuro até a realização do ensaio.

Folha	Tempo de incubação (min)					
	10	30	50	70	90	
Luz	Primária	0,699	2,728	5,539	9,365	12,947
	Trifólio	0,772	4,007	5,557	8,389	10,517
	Média	0,736	3,367	5,548	8,877	11,732
Escuro	Primária	0,130	0,854	2,803	4,612	7,109
	Trifólio	0,554	1,358	4,213	6,333	9,710
	Média	0,342	1,106	3,508	5,472	8,410



**Figura 3.3.** Atividade da enzima NR em diferentes tempos de incubação para plantas que permaneceram em luz e escuro até a realização do ensaio.

Assim como Nievola & Mercier (2001) encontraram para *Ananas comosus*, para *P. vulgaris*, o período de maior atividade da NR ocorreu quando as plantas permaneceram na presença de luz. Porém, o tempo de incubação, no intervalo de 10 a 30 minutos, já apresentou uma relação linear quanto à produção de nitrito, sendo este intervalo utilizado nas análises posteriores.

A NR pode ser induzida também por nitrato de origem atmosférica, através do  $\text{NO}_2$ , que entra nas folhas através das aberturas estomáticas (Zeevaart, 1974; Stulen *et al.*, 1998; Larcher, 2000; Raya-Rodriguez, 2000; Siegwolf *et al.*, 2001). Assim, a atividade da NR pode ser elevada nesses órgãos, devido ao aumento do aporte de nitrogênio provido pelo poluente (Stulen *et al.*, 1998; Raya-Rodriguez, 2000; Siegwolf *et al.*, 2001). A Figura 3.4 e a Tabela 3.5 mostram a atividade da enzima NR durante todo o período de exposição das plantas nos três pontos de amostragem.

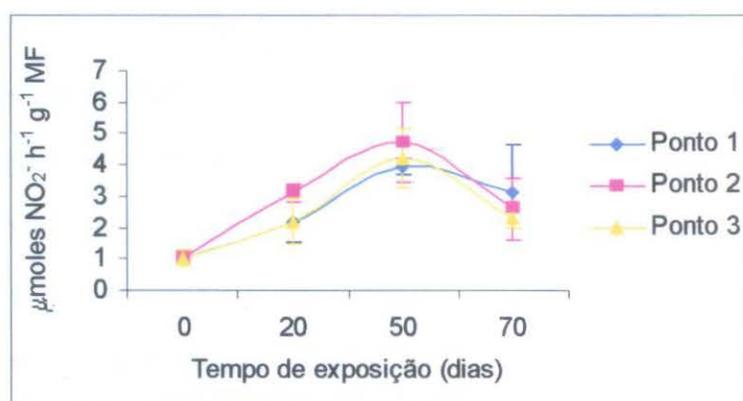


Figura 3.4. Atividade média da enzima Nitrato Redutase nos três pontos de amostragem durante todo o período de exposição das plantas.

**Tabela 3.5.** Atividade da enzima NR, em  $\mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$ , nos três pontos de amostragem durante todo o período de exposição, em dias.

Ponto	Atividade média da NR $\pm$ erro padrão			
	0 dias	20 dias	50 dias	70 dias
Controle	1,029 $\pm$ 0,271			
1		2,171 $\pm$ 0,653	3,958 $\pm$ 0,268	3,125 $\pm$ 1,508
2		3,091 $\pm$ 0,263	4,706 $\pm$ 1,272	2,596 $\pm$ 0,978
3		2,182 $\pm$ 0,746	4,201 $\pm$ 0,939	2,267 $\pm$ 0,310

No trabalho com *P. vulgaris* cv. Strike, Sánchez *et al.* (2004) concluíram que o feijoeiro é uma planta altamente sensível a níveis elevados de nitrogênio. Silveira *et al.* (2001) relatam que *P. vulgaris* apresenta uma resposta positiva entre a atividade da NR e o aumento dos níveis de nitrato exógeno.

Entretanto, após submeter os dados a análise estatística, verificou-se que não houve diferença significativa entre os pontos ( $p= 0,6420$ ) (Tabela 3.6). Isto ocorreu, talvez, porque os níveis de  $\text{NO}_2$  não foram suficientemente altos para elevar a atividade dessa enzima na espécie estudada, mesmo no ponto 1, onde a concentração de  $\text{NO}_2$  atmosférico foi, significativamente, mais alta.

Segundo De Temmerman *et al.* (2004), as plantas apresentam baixa sensibilidade ao  $\text{NO}_2$ , que, em alguns casos, ocorre junto com outros poluentes mais fitotóxicos. Os efeitos do  $\text{NO}_2$  podem ser observados somente quando as plantas são expostas a elevadas concentrações do poluente, como relatado por Zeevaart (1974). Em seu trabalho, a atividade da NR, em *P. vulgaris*, foi elevada quando submetidas à concentrações externas de 4 e 12 ppm. Donagi & Goren (1979) avaliaram o efeito do  $\text{NO}_2$ , em *P. vulgaris*, emitido por uma fábrica. As plantas apresentaram necrose nas folhas em concentrações ambientais de 2 ppm (máxima) e 0,3 ppm (mínima).

Tabela 3.6. Resultado da análise estatística (ANOVA) entre os pontos de amostragem e o controle. (P1=ponto 1; P2=ponto 2; P3=ponto 3.)

Relação entre pontos	p
ControlexP1	0,6145
ControlexP2	0,1697
ControlexP3	0,7342
P1xP2	0,5479
P1xP3	0,7476
P2xP3	0,3480

A atividade máxima da enzima ocorreu aos 50 dias de exposição das plantas, podendo ser considerado o tempo ótimo para a avaliação da sua atividade máxima (Figura 3.5), em *P. vulgaris*.

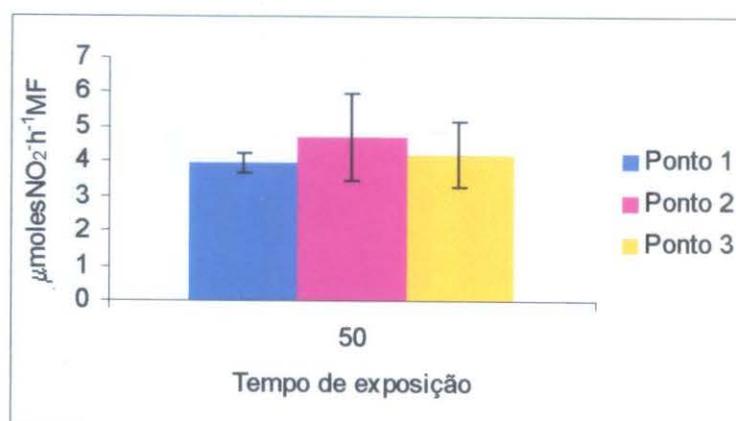


Figura 3.5. Atividade média da NR nos três pontos de amostragem em 50 dias de exposição das plantas.

### 3.3. Biomassa

O  $\text{NO}_2$ , que penetra nas plantas através das aberturas estomáticas e pode ser utilizado como fonte de nitrogênio (Stulen *et al.*, 1998; Larcher, 2000; Raya-Rodriguez, 2000; Siegwolf *et al.*, 2001), representa um maior aporte de nitrogênio para as plantas, podendo reverter-se em aumento da biomassa das plantas (Larcher, 2000; Raya-Rodriguez, 2000, Siegwolf *et al.*, 2001). A Figura 3.6 e a Tabela 3.7 apresentam a biomassa das plantas estudadas durante o período de amostragem.

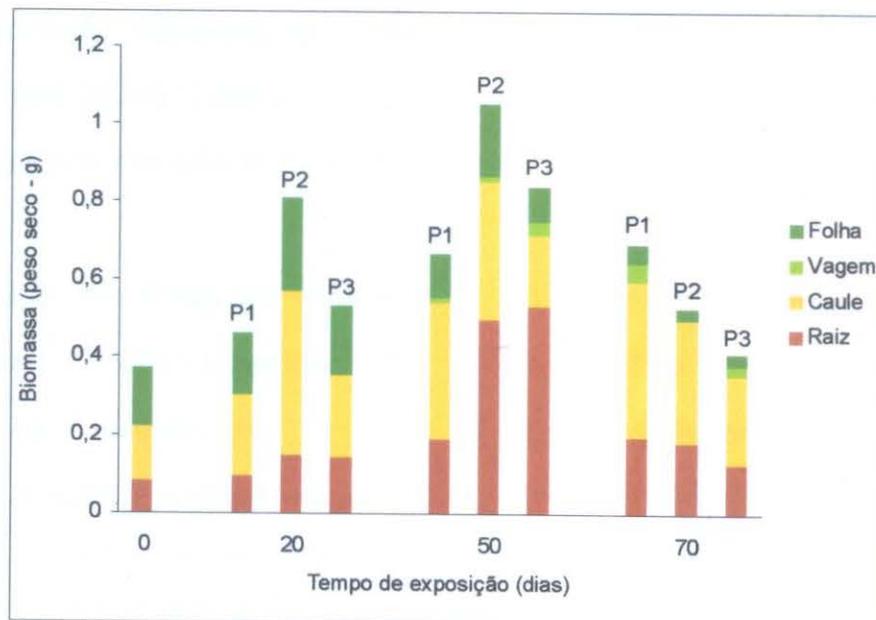


Figura 3.6. Biomassa total das plantas analisadas, relativo à raiz, caule, folha e fruto, nos três pontos de amostragem, durante o período de exposição.

**Tabela 3.7.** Biomassa total nos três pontos de amostragem durante todo o período de exposição, em dias.

Ponto	Biomassa em peso seco (g) ± erro padrão			
	0 dias	20 dias	50 dias	70 dias
Controle	0,3704 ± 0,0584			
1		0,4634 ± 0,0314	0,6654 ± 0,0384	0,6923 ± 0,2204
2		0,8059 ± 0,1231	1,0484 ± 0,1204	0,5282 ± 0,0672
3		0,5315 ± 0,0760	0,8372 ± 0,2384	0,3942 ± 0,0559

A análise estatística dos dados (Tabela 3.8) indica não ter havido diferença significativa ( $p=0,1573$ ) entre a biomassa das plantas nos três pontos de amostragem. Este resultado confirma a baixa concentração de  $\text{NO}_2$  encontrada, não tendo sido suficiente para incorporação nas estruturas das plantas. Contudo, observou-se diferença significativa entre os períodos de exposição ( $p=0,0324$ ) (Tabela 3.9). Esta diferença pode estar relacionada ao ciclo de vida da planta e ao efeito de outros fatores abióticos.

**Tabela 3.8.** Resultado da análise estatística (ANOVA) entre os pontos de amostragem e o controle. (P1=ponto 1; P2=ponto 2; P3=ponto 3; letras diferentes indicam diferença significativa pela ANOVA, sendo  $p < 0,05$ .)

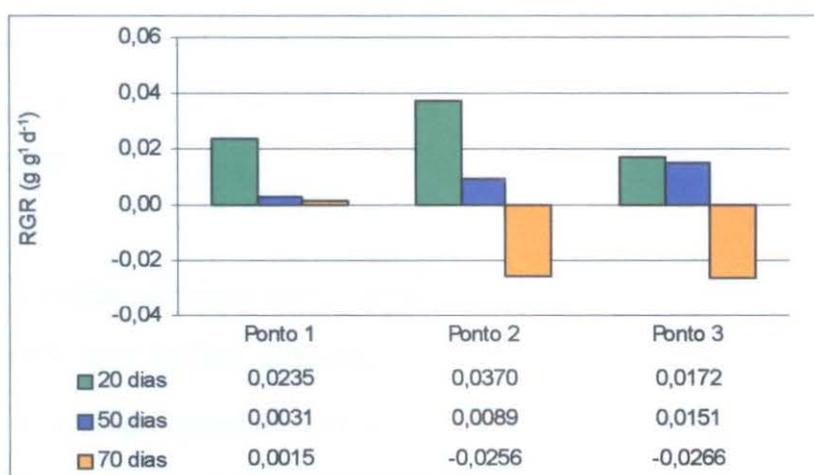
Relação entre pontos	P
ControlexP1	0,2415 B
ControlexP2	0,0316 A
ControlexP3	0,2941 B
P1xP2	0,1950 B
P1xP3	0,8939 B
P2xP3	0,1506 B

**Tabela 3.9.** Resultado da análise estatística (ANOVA) entre os períodos de exposição. (os números representam o período de exposição, em dias; letras diferentes indicam diferença significativa pela ANOVA, sendo  $p < 0,05$ .)

Relação entre períodos de exposição	p
0x20	0,2697 B
0x50	0,0149 A
0x70	0,4273 B
20x50	0,0809 B
20x70	0,6757 B
50x70	0,0254 A

O ciclo de vida de *P. vulgaris* cv. Irai é de, aproximadamente, 75 dias. Na fase adulta, encontramos a maior biomassa (representada em 50 dias de exposição), seguida da senescência, onde a biomassa é reduzida, uma vez que o ciclo da planta chegou ao fim (70 dias de exposição). Os fatores abióticos que poderiam ter influenciado a análise da biomassa foram a baixa temperatura, devido à época do ano em que as plantas ficaram expostas, e o encharcamento do solo.

A Figura 3.7 mostra a taxa de crescimento relativo (RGR) das plantas, nos três pontos de amostragem durante o período de exposição.



**Figura 3.7.** Taxa de crescimento relativo (RGR) das plantas, nos três pontos de amostragem em relação ao período de exposição.

O crescimento apresentado pelas plantas foi prejudicado pela ocorrência de geadas e precipitação excessiva durante o período de exposição. A época de exposição, segundo Aidar (2003), foi inadequada, uma vez que no período de outono-inverno, ou terceira época (maio a julho), o plantio só pode ser realizado em regiões onde o inverno é ameno, sem ocorrência de geadas. Na tentativa de minimizar os danos provocados pelo frio, as plantas foram cobertas

com plástico, principalmente, durante a noite. De acordo com Larcher (2000), o frio reduz a disponibilidade de energia metabólica, restringe a absorção de água e nutrientes, diminui a intensidade dos processos de biossíntese, reduz a assimilação e, conseqüentemente, interrompe o crescimento. Quando a temperatura aumenta, raramente as plantas recuperam-se imediatamente do estresse causado pelo frio.

Além disso, devido às chuvas excessivas, o solo permaneceu encharcado durante vários dias, impedindo a aeração e suprimento de oxigênio. Segundo Aidar (2003), o desenvolvimento vegetativo do feijoeiro é muito prejudicado em condições de excesso de água no solo, sendo estes, inadequados para o seu plantio.

### 3.4. Área foliar

As plantas apresentaram grande redução na biomassa foliar (necrose seguida de perda das folhas, principalmente) em função das diversas quedas de temperatura (incluindo geadas) entre os períodos de amostragem (Figura 3.8). Uma diferença significativa ( $p= 0,0005$ ) foi observada entre estes períodos (Tabela 3.10).

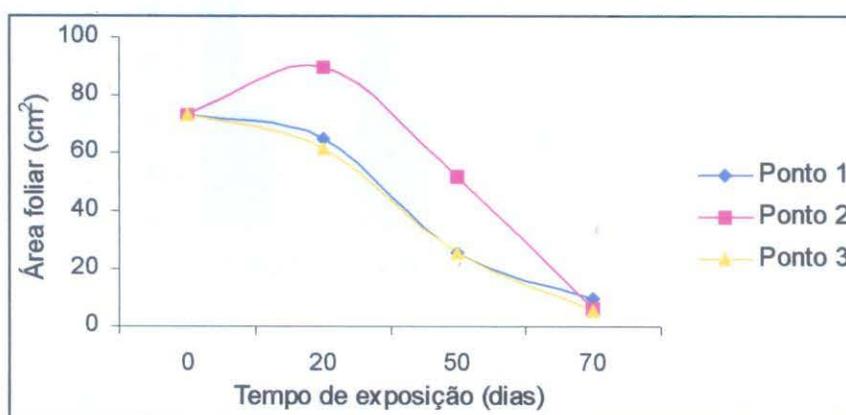
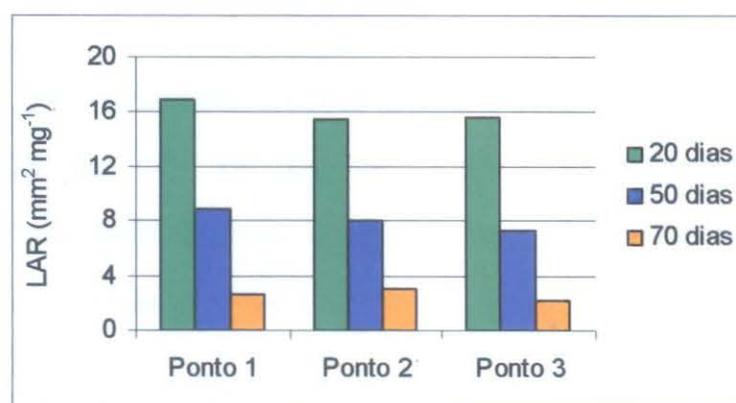


Figura 3.8. Área foliar média das plantas nos três pontos de amostragem durante o período de exposição.

**Tabela 3.10.** Resultado da análise estatística (ANOVA) entre os períodos de exposição. (os números representam o período de exposição, em dias; letras diferentes indicam diferença significativa pela ANOVA, sendo  $p < 0,05$ .)

Relação entre períodos de exposição	p
0x20	0,6892 A
0x50	0,1196 A
0x70	0,0088 B
20x50	0,1067 A
20x70	0,0003 B
50x70	0,1281 A

A taxa de crescimento relativo (RGR) depende da razão de área foliar (LAR), que é um índice da cobertura foliar da planta, ou seja, a área de superfície fotossintética e da área foliar específica (SLA), que representa a área foliar em relação à biomassa foliar (Bayuelo-Jiménez, 2003). Com isso, os baixos valores encontrados na RGR se devem aos baixos valores também encontrados em ambos os índices de área foliar (Figuras 3.9 e 3.10).



**Figura 3.9.** Razão de área foliar (LAR) por planta calculada para os três pontos de amostragem durante o período de exposição.

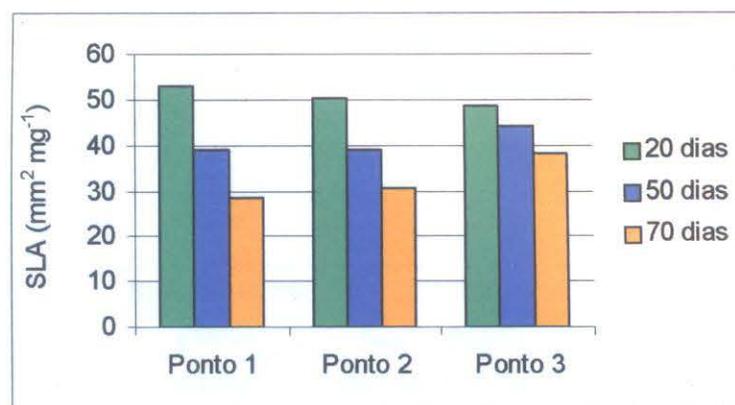


Figura 3.10. Área foliar específica (SLA) por planta calculada para os três pontos de amostragem durante o período de exposição.

### 3.5. Atividade Fotossintética

A concentração de  $\text{NO}_2$  atmosférico encontrada não causou efeito sobre a atividade fotossintética das plantas expostas. Os parâmetros avaliados, atividade fotossintética máxima, ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  e eficiência de carboxilação (Tabela 3.11), não apresentaram diferença significativa entre os pontos de amostragem durante todo o período de exposição (Tabela 3.12).

Tabela 3.11. Atividade fotossintética máxima ( $A_{\text{máx}}$ ), ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CCO}_2}$ ) e eficiência de carboxilação (EC) analisados nos três pontos de amostragem durante o período de exposição. (Valores médios  $\pm$  erro padrão)

	Ponto	$A_{\text{máx}}$	$P_{\text{CCO}_2}$	EC
		$\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol m}^{-1}$	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
20 dias	1	13,96 $\pm$ 0,9885	49,20 $\pm$ 7,5602	0,130 $\pm$ 0,0398
	2	13,11 $\pm$ 2,6957	34,57 $\pm$ 11,4086	0,131 $\pm$ 0,0156
	3	17,04 $\pm$ 1,0376	40,77 $\pm$ 0,4671	0,235 $\pm$ 0,0013
50 dias	1	13,74 $\pm$ 1,8854	64,89 $\pm$ 13,2085	0,077 $\pm$ 0,0053
	2	24,16 $\pm$ 6,7538	49,93 $\pm$ 10,2393	0,095 $\pm$ 0,0262
	3	15,75 $\pm$ 1,0884	53,86 $\pm$ 4,8688	0,147 $\pm$ 0,0108

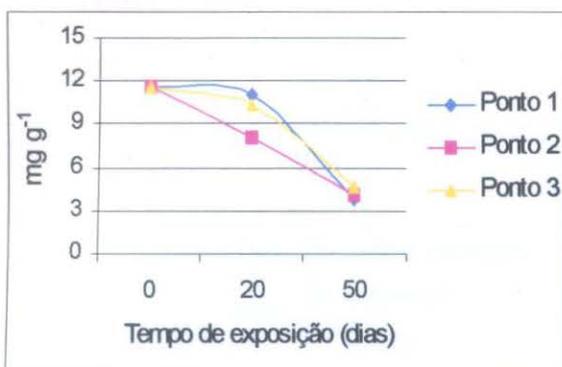
**Tabela 3.12.** Resultado da análise estatística (ANOVA) entre os pontos de amostragem. (P1=ponto 1; P2=ponto 2; P3=ponto 3; letras diferentes indicam diferença significativa pela ANOVA, sendo  $p < 0,05$ .)

Relação entre pontos	p		
	$A_{máx}$	$PCCO_2$	EC
P1xP2	0,2848	0,2257	0,4328
P1xP3	0,5848	0,9493	0,5030
P2xP3	0,6366	0,1957	0,1123

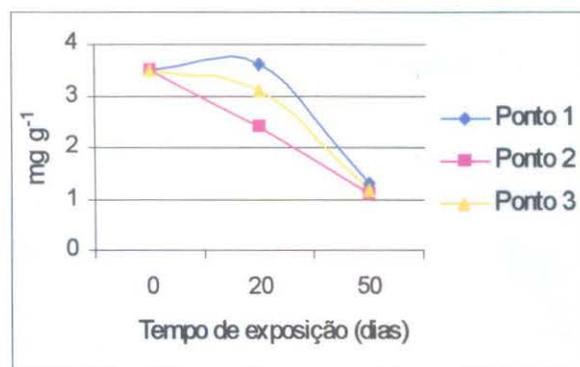
No tempo de exposição 70 dias, não foi possível medir a atividade fotossintética, pois as plantas não apresentaram área foliar suficiente para análise pelo equipamento.

### 3.6. Clorofila

A clorofila ( $a$  e total), pigmento fotossintético, foi analisada nos três pontos de amostragem (Figuras 3.11 e 3.12, Tabelas 3.13 e 3.14), não apresentando diferença significativa entre eles (clorofila  $a$ :  $p = 0,1028$ ; clorofila total:  $p = 0,5617$ ). Porém, houve diferença entre os períodos de exposição das plantas (Tabela 3.15).



**Figura 3.11.** Clorofila *a* média nos três pontos de amostragem durante o período de exposição.



**Figura 3.12.** Clorofila total média nos três pontos de amostragem durante o período de exposição.

**Tabela 3.13.** Clorofila *a*, em mg g<sup>-1</sup>, nos três pontos de amostragem durante todo o período de exposição, em dias.

Ponto	Clorofila <i>a</i> ± erro padrão		
	0 dias	20 dias	50 dias
Controle	3,48±2,0413		
1		3,59±0,0916	1,29±0,1009
2		2,38±0,7516	1,12±0,1917
3		3,11±0,0458	1,19±0,0395

**Tabela 3.14.** Clorofila total, em mg g<sup>-1</sup>, nos três pontos de amostragem durante todo o período de exposição, em dias.

Ponto	Clorofila total ± erro padrão		
	0 dias	20 dias	50 dias
Controle	11,61±6,8949		
1		11,10±0,3348	3,81±0,6440
2		8,06±2,4052	4,03±0,6669
3		10,34±0,1905	4,63±0,0316

**Tabela 3.15.** Resultado da análise estatística (ANOVA) entre os períodos de exposição. (Os números representam o período de exposição, em dias; letras diferentes indicam diferença significativa pela ANOVA, sendo  $p < 0,05$ .)

Relação entre períodos de exposição	Clorofila <i>a</i>		Clorofila total	
	p		p	
0x20	0,1880	B	0,6194	B
0x50	0,0001	A	0,0518	B
20x50	0,0122	A	0,0150	A

A diferença entre os períodos de amostragem ocorreu devido aos danos causados pelos mesmos fatores abióticos (frio e encharcamento do solo), os quais também prejudicaram o crescimento das plantas. O ciclo de vida da espécie utilizada é de, aproximadamente 75 dias e, à medida que ele foi chegando ao fim, ocorreu a senescência, quando a planta perde suas folhas. Assim, ocorreu redução acentuada na área foliar e, com isso, redução na concentração de clorofila.

No tempo de exposição 70 dias, não foi possível avaliar o teor de clorofila das plantas, pois estas não apresentavam área foliar suficiente para utilização na análise.

#### 4. CONCLUSÕES

→ Não existiu um gradiente de concentração do poluente atmosférico  $\text{NO}_2$  ao longo do Campus do Vale/UFRGS. Porém, o ponto 1 apresentou uma concentração, significativamente, mais elevada em comparação aos outros pontos.

→ O ar no Campus do Vale não apresentou contaminação pelo poluente  $\text{NO}_2$ . O valor máximo encontrado ( $40,25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) está abaixo do Padrão Secundário estabelecido pela Resolução CONAMA 03/90, não oferecendo riscos para a saúde e o ambiente.

→ Não houve relação entre a concentração de  $\text{NO}_2$  atmosférico e a atividade da enzima Nitrato Redutase, utilizando o feijoeiro, *Phaseolus vulgaris*, como planta terrestre bioindicadora, talvez devido às baixas concentrações encontradas de  $\text{NO}_2$ .

→ A atividade máxima da NR ocorreu no período de 50 dias de exposição das plantas.

→ As concentrações de  $\text{NO}_2$  atmosférico encontradas não provocaram alterações na função e estrutura das plantas analisadas, em termos de atividade fotossintética e teor de clorofila, biomassa, área foliar, respectivamente.

→ Não foi possível correlacionar os efeitos do  $\text{NO}_2$  atmosférico em períodos de curta duração (20 dias) e períodos de longa duração (50 e 70 dias), uma vez que as concentrações encontradas não provocaram efeitos sobre as plantas estudadas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDAR, H.(org.) 2003. *Cultivo do Feijoeiro Comum*. Embrapa, Sistemas de Produção. Acessado em 30 de outubro de 2004. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/>
- ASTM. 1987. *Standard Test Method for NITROGEN DIOXIDE CONTENT OF THE ATMOSPHERE* (Método Griess-Saltzman, segundo N-1214a de julho de 1987 da Refinaria Alberto Pasqualini) - D 1607 - 76.
- BAIRD, C. 2002. *Química Ambiental*. 2ª ed. Bookman, Porto Alegre.
- BAYUELO-JIMÉNEZ, J. S.; DEBOUCK, D. G. & LYNCH, J.P. 2003. Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crops Research*. 80:207-222.
- BRANCO, S. M. & MURGEL, E. 1997. *Poluição do ar*. Moderna, São Paulo.
- CANTELLI, M. 1999. *Controle das emissões de NO<sub>x</sub> por oxidação alcalina utilizando ferrato (VI) em solução*. Monografia de Qualificação de Doutorado. PPG-Saneamento Ambiental/UFRGS.
- CONAMA 18/86. Resolução CONAMA N° 18, de 06 de maio de 1986. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/> Acessado em 1º de agosto de 2004.

CONAMA 03/90. Resolução CONAMA N.º 003, de 28 de junho de 1990.  
Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/> Acessado em 1º de agosto de 2004.

CONAMA 08/93. Resolução CONAMA N.º 8, de 31 de agosto de 1993. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/> Acessado em 1º de agosto de 2004.

COSTA, M. A. G. & COSTA, E. C. 2004. *Poluição Ambiental: herança para gerações futuras*. Orium, Santa Maria.

DE TEMMERMAN L. *et al.* 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants - considerations for the future. In: Urban Air Pollutin, Bioindication and Environmental Awareness (A. Klumpp, W. Ansel & G. Klumpp, edits.). Germany, p. 337-373.

DONAGI, A. E. & GOREN, A. 1979. Use of Indicator Plants to Evaluate Atmospheric Levels of Nitrogen Dioxide in the Vicinity of a Chemical Plant. *Environmental Science & Technology*. 13(8):986-989.

HARGREAVES, P. R.; LEIDI, A.; GRUBB, H. J.; HOWE, M. T. & MUGGLESTONE, M. A. 2000. Local and sasonal variations in atmospheric nitrogen dioxide levels at Rothamsted, UK, and relationship with meteorological conditions. *Atmospheric Environment*. 34:843-853.

HUNT, R. 1990. *Basic Growth Analysis. Plant growth analysis for beginners*. Unwin Hyman, Londres.

KLUMPP, A.; KÜPPERS, K. & GUDERIAN, R. 1989. Nitrate reductase activity of needles of Norway spruce fumigated with different mixtures of ozone, sulfur dioxide and nitrogen dioxide. *Environmental Pollution*. 58:268-271.

\_\_\_\_\_; DOMINGOS, M.; MORAES, R. M. de; KLUMPP, G. 1998. Effects of complex air pollution on tree species of the Atlantic rain forest near Cubatão, Brazil. *Chemosphere*. 36:989-994.

\_\_\_\_\_; ANSEL, W.; KLUMPP, G. & FOMIN, A. 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede europeia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). *Revista Brasileira de Botânica*, v.24, n.4:511-518.

KNORST, M. M. 2000. Poluição Atmosférica e Saúde Humana. In: *A Qualidade do Ar em Porto Alegre* (M. L. L. Zurita & A. M. Toldo, orgs.). SMAM, p. 38-44.

KNUDSON, L. L.; TIBBITTS, T. U. & EDWARDS, G. E. 1977. Measurement of Ozone Injury by Determination of Leaf Chlorophyll Concentration. *Plant Physiology*. v.60, 606-608.

LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. RiMa, São Carlos.

MELCHIORI, D. J. 2000. A Qualidade do Ar e os Combustíveis. In: *A Qualidade do Ar em Porto Alegre* (M. L. L. Zurita & A. M. Toldo, orgs.). SMAM, p. 46-51.

MENEGAT, R.; PORTO, M. L.; CARRARO, C. C. & FERNANDES, L. A. D. 1998. *Atlas Ambiental de Porto Alegre*. Editora da Universidade, Porto Alegre.

- MORAES, R. M. de., DELITTI, W. B. C. & MORAES, J. A. P. V. de. 2000. Respostas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* Cong. à poluição aérea de Cubatão, SP: fotossíntese líquida, crescimento e química foliar. *Revista Brasileira de Botânica*, v.23, n.4:443-449.
- NIEVOLA, C. C. & MERCIER, H. 2001. Variações das da atividade *in vivo* da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) - Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v.24, n.3:295-301.
- PRADO, C. H. B. A. & de MORAES, J. A. P. V. 1997. Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of Cerrado vegetation under field conditions. *Photosynthetica*, v.33, n.1:103-112.
- RAYA-RODRIGUEZ, M. T. 2000. O Uso de Bioindicadores para Avaliação da Qualidade do Ar em Porto Alegre. In: *A Qualidade do Ar em Porto Alegre* (M. L. L. Zurita & A. M. Toldo, orgs.). SMAM, p. 67-76.
- SÁNCHEZ, E.; RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M. & ROMERO, L. 2004. Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  application rates. *Scientia Horticulturae*. 99:237-248.
- SIEGWOLF, R. T. W., et al. 2001. Stable isotope analysis reveals differential effects of soil nitrogen and nitrogen dioxide on the water use efficiency in hybrid poplar leaves. *New Phytologist*. 149:233-246.

- SILVEIRA, J. A. G. ET AL. 2001. Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. *Environmental and Experimental Botany*. 46:37-46.
- STULEN, I.; PEREZ-SOBA, M.; DE KOK, L. J. & VAN DER EERDEN, L. 1998. Impact of gaseous nitrogen deposition on plant functioning. *New Phytologist*. 139:61-70.
- SMAM. 2000. A Poluição Atmosférica. In: *A Qualidade do Ar em Porto Alegre* (M. L. L. Zurita & A. M. Toldo, orgs.). SMAM, p. 29-36.
- ZEEVAART, A. J. 1974. Induction of nitrate reductase by NO<sub>2</sub>. (Brief Communications) *Acta Bot. Neerl.* 23(1):345-345.