

## **Avaliação do estado redox, conteúdo fenólico e conteúdo de capsaicina nos frutos e folhas de pimenta *Capsicum baccatum* L. Var. *pendulum* expostas ao ozônio**

Rafael C. Bortolin<sup>a</sup>, Fernanda F. Caregnato<sup>a</sup>, Armando M. Divan Junior<sup>b</sup>, Flávio H. Reginatto<sup>c</sup>, Caroline F. Ortmann<sup>c</sup>, José C. F. Moreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035003 Porto Alegre-RS.

<sup>b</sup> Centro de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501970 Porto Alegre-RS

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis-SC.

### **Resumo**

Este estudo fez uma análise de parâmetros de estresse oxidativo, conteúdo fenólico e teor de clorofila em folhas e teor de capsaicina, conteúdo fenólico total e potencial antioxidante em frutos de *Capsicum baccatum* L. Var. *pendulum* expostas cronicamente ao ozônio em câmaras de topo aberto durante dois meses e meio. Como objetivo, visa avaliar como o aumento troposférico de ozônio interfere na bioquímica e fisiologia da planta e como isso se reflete na qualidade dos frutos. As plantas tratadas com ozônio (O<sub>3</sub>) mostraram uma significativa diminuição na atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) no tecido foliar, além de apresentar um aumento na quantidade de espécies reativa de oxigênio (ERO), uma diminuição nos grupamentos tióis totais reduzidos, um aumento no conteúdo fenólico total e uma diminuição tanto da clorofila **a** quanto da **b**, no tecido foliar. Em relação aos frutos tratados, observamos um aumento significativo na reatividade antioxidante total (TAR) e no conteúdo fenólico total, havendo também uma correlação entre eles. A capsaicina e dihidrocapsaicina mostraram uma diminuição significativa no seu conteúdo em frutos tratados. Estes dados sugerem que a toxicidade do ozônio afeta negativamente esta planta. Porém, frutos resultantes desta planta exposta cronicamente ao ozônio mostram uma qualidade maior de seus antioxidantes.

Palavras-chave: *Capsicum baccatum* L. Var. *pendulum*, Pimenta-dedo-de-moça, ozônio, estresse oxidativo, clorofila, compostos fenólicos, capsaicina, potencial antioxidante reativo total (TRAP), reatividade antioxidante total (TAR), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

## 1. Introdução

O ozônio (O<sub>3</sub>) é um gás presente naturalmente tanto na estratosfera quanto na troposfera. Na estratosfera, tem um papel de filtragem dos raios ultravioletas e forma-se a partir da fotodissociação da molécula de O<sub>2</sub> em dois átomos de oxigênio que posteriormente se combinam com O<sub>2</sub> para formar o O<sub>3</sub> (Halliwell e Gutteridge, 2007). Na troposfera, camada na qual estamos, exerce um efeito nocivo aos organismos vivos devido ao seu alto poder oxidativo e forma-se a partir da reação entre o O<sub>2</sub> e poluentes primários, como óxidos de nitrogênio, óxidos de enxofre, óxidos de carbono e hidrocarbonetos, na presença de luz solar (Crutzen e Lelieveld, 2001). Atualmente, as principais fontes de poluentes primários são a queima de combustíveis fósseis, os processos industriais e as queimadas florestais (Fowler *et al.*, 1999). Devido à emissão

destes gases, a concentração de ozônio troposférico aumentou 36% desde os tempos pré-industriais e projeções mostram que a concentração atual tende a aumentar (Karnosky, *et al.*, 2007; IPCC, 2001).

No Brasil as concentrações de ozônio vêm aumentando principalmente na Amazônia em épocas de queimada (Kuhn *et al.*, 2010) e em grandes centros urbanos como São Paulo e Porto Alegre, onde excede o limite estabelecido pelo conselho nacional do meio ambiente (CONAMA) de 160 µg.m<sup>3</sup> (~80 ppb), em monitoramento contínuo de 1 hora, várias vezes ao ano (CETESB, 2009; PETROBRAS, 1998).

O O<sub>3</sub> é um forte agente oxidante capaz de reagir com lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos quando absorvido por animais e plantas, além de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Desta maneira, pode causar danos oxidativos

às biomoléculas e alterar o perfil oxidativo das células, assim, levando a uma série de problemas relacionados tanto a saúde humana quanto à produção agrícola (Iriti e Faoro, 2007).

Atualmente o O<sub>3</sub> é considerado o poluente que causa mais danos à produção agrícola do que todos os outros somados, (Ashmore e Bell, 1991; US EPA, 1996 apud Elagöz e Manning, 2005). Além disso, estudos sobre o impacto econômico do ozônio na agricultura têm indicado perdas de 2 a 4 bilhões de dólares nos Estados Unidos da América e de 4 bilhões de euros na Europa (Ashmore, 2005).

Em plantas, o O<sub>3</sub> é absorvido pelos estômatos presentes nas folhas, gerando ERO nos ambientes intra e extracelulares, podendo ter dois efeitos opostos: ser responsável pelo efeito prejudicial ou servir como sinalizador para a resposta de hipersensibilidade (RH). A resposta de hipersensibilidade é um mecanismo de defesa das plantas geralmente associado a infecções por patógenos e é desencadeada pelo desbalanço nos níveis de ERO presentes no ambiente celular. Assim, ao desencadear uma alteração redox nas células, o ozônio pode estimular uma resposta imune similar a de um

patógeno (Sandermann *et al.*, 1998), influenciando, assim, a produção de compostos secundários (Iriti e Faoro, 2009).

Os compostos secundários têm um papel importante no sistema de defesa das plantas (Bennett e Wallsgrave, 1994). São sintetizados durante o desenvolvimento normal dos tecidos vegetais, mas sua produção pode ser induzida em resposta a lesões físicas, infecções ou quando expostas a estressores abióticos, como ozônio, metais pesados, radiação UV, temperatura, entre outros (Lattanzio *et al.*, 2006; Mazid *et al.*, 2011). Nesses casos, produz moléculas protetoras, geralmente com um grande potencial antioxidante e uma boa atividade antimicrobiana, capazes de melhorar a tolerância da planta ao estresse, bem como melhorar a resistência a patógenos (Iriti e Faoro, 2009).

Um dos principais grupos de metabólitos secundários são os compostos fenólicos (Taiz e Zeiger, 2009). Muitos estudos têm mostrado que estes compostos geralmente apresentam um grande potencial antioxidante por possuírem capacidade de doar elétrons ou hidrogênios, quelar metais e capturar oxigênio singlete

(Rice-Evans *et al.*, 1996), e que o aumento do seu conteúdo em frutos está relacionado com um aumento no potencial antioxidante (Shan *et al.*, 2005; Kappel *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos confirmam que uma dieta composta de alimentos ricos em polifenóis está associada com a prevenção de várias patologias. Este resultado poderia ser justificado pelos efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos, prevenindo no organismo o desbalanço oxidativo associado à gênese de várias doenças degenerativas, tais como câncer, doenças cardiovasculares e as várias neuropatias (Pietta, 2000; Scalbert *et al.*, 2005). Esta ação antioxidante de diversos grupos de compostos fenólicos tem sido foco de estudos na procura por fitoquímicos benéficos à saúde (Yanishlieva e Marinova, 2001).

As pimentas do gênero *Capsicum* são boas fontes de compostos antioxidantes, como vitaminas, carotenoides, capsaicinoides e compostos fenólicos ao mesmo tempo em que são muito utilizadas em todo o mundo como tempero e conservantes. Por isso se tornam um interessante alvo de pesquisa (Wahyuni *et al.*, 2011). Além disso, produzem um

composto conhecido como capsaicina (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), um metabólito secundário característico deste gênero (Hoffman *et al.*, 1983), que apresenta importantes propriedades farmacêuticas, tais como potencial antiinflamatório, antioxidante, antiproliferativo e anticâncer (Oyagbemi *et al.*, 2010).

Apesar do gênero *Capsicum* ser nativo da América Latina (Nuez *et al.* 1996), os maiores produtores destes frutos são a China e a Índia (Reifschneider e Ribeiro, 2004; Than *et al.*, 2008). Estudos têm mostrado que a alta concentração de ozônio nestes países tem causado sérios danos a diversas cultivares e, assim, afetado negativamente a produção agrícola das mesmas. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos deste poluente sobre a produtividade de plantas do gênero *Capsicum*, principalmente em países latino-americanos (Tiwari *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

A espécie de pimenta *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*, mais conhecida como Pimenta-dedo-de-moça, é uma das pimentas mais consumidas no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Sua produção vem crescendo no Brasil,

especialmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (Carvalho *et al.*, 2003 e Reifschneider e Ribeiro, 2004).

Até hoje nenhum trabalho foi realizado descrevendo a influência da exposição ao ozônio sobre o perfil redox da planta, conteúdo de compostos fenólicos, teor de capsaicina e potencial antioxidante dos frutos de pimenta, em plantas da espécie *C. baccatum L. var. pendulum* que se desenvolvem na presença de ozônio.

Assim, pretendemos avaliar se a exposição de plantas de *C. baccatum L. var. pendulum* ao ozônio, durante o período de desenvolvimento do fruto, é capaz de alterar o perfil redox da planta e a composição bioquímica dos frutos, principalmente no que diz respeito ao conteúdo de capsaicina, compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante dos mesmos.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Desenvolvimento e exposição das plantas**

#### **2.1.1. Cultivo**

Sementes de *Capsicum baccatum L. var. pendulum* (Pimenta-dedo-de-moça) foram obtidas com a pesquisadora Rosa Lía Barbieri na EMBRAPA Hortaliças (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Estas sementes foram semeadas em vasos contendo substrato padronizado (vermiculita, turfa e areia grossa lavada na proporção 2:1:1) e cultivadas em casa de vegetação durante três meses e meio até serem expostas ao O<sub>3</sub>.

Nove plantas, divididas em três câmaras, foram expostas ao O<sub>3</sub> desde o surgimento dos primeiros botões florais até os frutos estarem completamente maduros. O mesmo foi feito com mais nove plantas, porém estas foram expostas ao ar troposférico normal, nos servindo de controle.

A geração de ozônio foi realizada através do método de descarga por efeito corona mediante emprego de um gerador de ozônio (modelo OZ Sop 33A, OZ-Engenharia) alimentado com ar ambiente.

As plantas foram submetidas ao sistema de exposição do tipo câmaras de topo aberto, baseadas no modelo desenvolvido por Heagle *et al.*, (1973), e aperfeiçoado por Aidar *et al.*, (2002), que consiste em uma estrutura

cilíndrica recoberta por material plástico transparente e inerte ao ozônio. O gás poluente é injetado em um fluxo de ar gerado por um circulador de ar, acoplado à base da câmara. O fluxo de ar circula continuamente no interior da câmara contendo as plantas saindo por uma abertura na porção superior da câmara (Fig. 1).

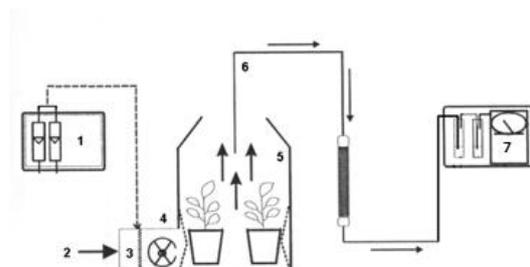
A fumigação foi realizada de segunda a sábado, das 10:00 às 16:00 horas (período no qual a soma das concentrações horárias acima 40 ppb (AOT<sub>40</sub>) é mais elevada) por dois meses e meio. Durante este período, os dados de temperatura e umidade dentro das câmaras de exposição foram coletados utilizando-se um *data logger*.

A concentração de ozônio no interior das câmaras foi monitorada por método colorimétrico (APHA, 1992) e mantida acima de 40 ppb, concentração considerada crítica, acima desta concentração efeitos adversos podem ocorrer com a vegetação, (Fuhrer *et al.*, 1997) tendo uma média de 65 ppb.

O cultivo das plantas foi de 06/12/2010 até 09/06/2011 e durante este período as plantas foram

adubadas três vezes com fertilizante Nutriverde Vitaplan 13-13-15 (%).

Em ambos os locais onde as plantas se desenvolveram havia redutores de radiação do tipo sombrite (redução de 30%).



**Fig. 1:** Diagrama esquemático de um sistema para cultivo de plantas em atmosferas enriquecidas com O<sub>3</sub>. 1. Ozonizador, 2. Entrada de ar para a câmara de topo aberto, 3. Câmara de homogeneização, 4. Ventilador homogeneizador de ar, 5. Câmara de topo aberto, 6. Tubulação para amostra de ar para medição, 7. Amostrador atmosférico para O<sub>3</sub>.

### 2.1.2. Material vegetal

Para a realização das análises foram utilizados tecido foliar e frutos. Para as análises não-enzimáticas das folhas dez discos de 0,30 cm<sup>2</sup> foram homogeneizados em tampão fosfato salina (0,27 mM; pH 7,4) enquanto que para as análises enzimáticas dez discos do mesmo tamanho foram homogeneizados em 1 mL de tampão de extração (Tampão fosfato 50 mM, pH 7,5; 5% PVP; 1 mM; 1 mM DTT; 1 mM PMSF). Com os frutos foi

preparado um extrato para a realização das análises.

### *2.1.3. Preparação do extrato*

Para preparação das amostras, frutos maduros de *C. baccatum* sem sementes foram submetidos à extração sob decocção com solução hidroalcoólica 40% (fruto:solvente, 1:10, w/v) durante 20 min. O extrato foi filtrado e em seguida o solvente foi eliminado em rota-evaporador. O extrato seco foi armazenado em geladeira para experimentos posteriores.

## ***2.2. Análises para avaliação dos aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de estresse oxidativo sobre a planta.***

### *2.2.1. Atividade da Catalase*

As amostras foram incubadas em um tampão fosfato 50 mM na presença de peróxido de hidrogênio. A atividade foi medida pela taxa do decaimento de absorbância correspondente ao nível de peróxido de hidrogênio, em espectrofotômetro 240 nm a 28°C. Os resultados foram

expressos em U CAT/mg de proteína (Aebi, 1984).

### *2.2.2. Atividade da superóxido dismutase*

As amostras foram incubadas em um tampão específico na presença de cloreto nitroazul de tetrazólio (NBT) e adrenalina a 37°C. A auto-oxidação da adrenalina em adenocromo gera radical superóxido, e esse é responsável por NBT em NBT-diformazan (azul). A atividade enzimática da SOD foi determinada pela inibição da formação de NBT-formazan e medida espectrofotometricamente a 560 nm. Na presença de SOD a taxa de formação do NBT-diformazan diminui, sendo a redução do aparecimento do NBT-diformazan uma medida de atividade da enzima presente nas amostras experimentais. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a formação NBT-formazan.

### *2.2.3. Estado redox de grupamentos tióis totais.*

As amostras foram incubadas com tampão fosfato 10 mM, tampão forte e ácido ditionitrobenzóico (DTNB). Os grupamentos tióis reduzidos foram marcados com DTNB e a marcação é lida em espectrofotômetro a 412nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol SH/mg}$  de proteína (Ellman, 1959).

#### 2.2.4. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Foi avaliada através do ensaio fluorimétrico de DCFH-DA (2',7'-diacetato de diclorofluoresceína). Para isso o tecido foliar homogeneizado é incubado diretamente com DCFH-DA, e posterior leitura do produto de oxidação desta sonda, a 2',7' - diclorofluoresceína (DCF), indicando a presença de ERO (excitação em 485 nm e emissão em 535 nm). Os resultados foram expressos em unidades relativas de fluorescência ( $\times 10^3$ )/mg de proteína (Mahalingam *et al*, 2006).

#### 2.2.5. Teor de clorofila.

Para quantificar o teor de clorofila, dez discos de  $0,30 \text{ cm}^2$  foram incubados em 10 mL de etanol durante

três semanas para extrair a clorofila. Após isso uma alíquota do álcool é lida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 649 e 665nm e ponderado pelo peso dos discos seco. Os resultados estão expressos em mg de clorofila/g de peso seco (Knudson *et al.*, 1977)

#### 2.2.6. Determinação do conteúdo fenólico total.

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos foram expressos tendo o ácido tânico como padrão de referência. Para a realização da técnica as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) em uma concentração final de 10%. Disso foram retirados 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, adicionado 1400  $\mu\text{L}$  de água, 100  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu e 100  $\mu\text{L}$  uma solução saturada de carbonato de cálcio. Após 10 minutos foi realizado a leitura em 725 nm e o conteúdo fenólico total foi expresso em mg de equivalentes de ácido tânico por mg de proteína (mg EAT/mg proteína) (Rossi e Singleton, 1965).

## 2.3. Análises para avaliação de aspectos bioquímicos do fruto

### 2.3.1. Determinação do conteúdo fenólico total.

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos foram expressos tendo o ácido tânico como padrão de referência. Para a realização da técnica foi utilizado 100  $\mu\text{L}$  de amostra, incubados com 1500  $\mu\text{L}$  de água, 100  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu e 100  $\mu\text{L}$  de uma solução saturada de carbonato de cálcio. Após 10 minutos foi realizada a leitura em 725 nm e o conteúdo fenólico total foi expresso em mg de equivalentes de ácido tânico por 100 g de peso seco (mg EAT/100 g PS) (Rossi e Singleton, 1965).

### 2.3.2. Defesas antioxidantes não enzimáticas.

Foram determinadas pelo potencial reativo antioxidante total (TRAP), o qual determina a quantidade de antioxidantes das amostras, e pela reatividade antioxidante total (TAR), a qual indica a qualidade dos

antioxidantes das amostras. Para isso, as amostras (concentração final de 17,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram colocadas para reagir com uma solução de luminol e AAPH (2,2-azobis [2-methylpropionamidine] dihydrochloride) em tampão glicina (0.1 M, pH 8.6), uma fonte geradora de radical peroxil, que irá oxidar o luminol gerando luz. Esse radical não pode ser degradado enzimaticamente, por isso essa é uma técnica para avaliar as defesas antioxidantes não enzimáticas. A diminuição na quimioluminescência é monitorada em cintilador 60 minutos após a adição da amostra ao sistema gerador de radicais luminol mais AAPH. Os resultados do TRAP estão expressos em  $I_0/I$  onde  $I_0$  é o valor da área sob a curva do sistema gerador de radicais antes da adição das amostras e  $I$  é o valor da área sob a curva do sistema gerador de radicais após a adição das amostras. Os índices de TAR estão expressos em  $I_0/I$ , onde  $I_0$  é a quimioluminescência antes da adição das amostras e  $I$  é a quimioluminescência imediatamente após a adição das amostras (Wayner *et al.*, 1985).

### 2.3.3. Análise Quantitativa de Capsaicina e dihidrocapsaicina

A análise dos teores de capsaicina e dihidrocapsaicina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando cromatógrafo líquido PerkinElmer Series 200, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), bomba quaternária e amostrador automático. Os dados foram processados usando o software TotalChrom® Workstation. As análises foram realizadas em temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C) usando como fase estacionária uma coluna Waters® Spherisorb ODS-2 (RP-C18, 5  $\mu$ m, 150 X 4.6 mm i.d.). A fase móvel foi constituída de 65% do solvente A (metanol) e 35% solvente B (ácido acético 1%) com fluxo de 1,0 mL/min na forma isocrática. A detecção foi realizada em 280 nm e os espectros de UV obtidos em 450-210 nm. As amostras foram injetadas na concentração de 10 mg/mL e o volume de injeção foi de 10  $\mu$ L. A identificação da capsaicina e dihidrocapsaicina foi baseada no tempo de retenção, co-injeção com padrões e respectivos espectros de ultravioleta. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 2.3.4. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP e analisados usando o programa GraphPad Prisma versão 5. O Teste-t foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos e as médias foram consideradas diferentes quando apresentarem o  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados e discussão

É sabido que o ozônio é um forte agente oxidante capaz de danificar biomoléculas e gerar ERO quando absorvido por animais e plantas (Iriti e Faoro, 2007). Nosso trabalho mostra uma série de alterações fisiológicas e bioquímicas desencadeadas em plantas *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* expostas a concentrações de ozônio acima de 40 ppb.

As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) representam a primeira linha de defesa antioxidante enzimática contra ERO. A SOD, encontrada em quase todos os compartimentos celulares, faz a dismutação do superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), enquanto que a CAT, encontrada principalmente nos peroxissomos,

converte o  $H_2O_2$  em água e  $O_2$  (Halliwell e Gutteridge, 2007). Nossos resultados

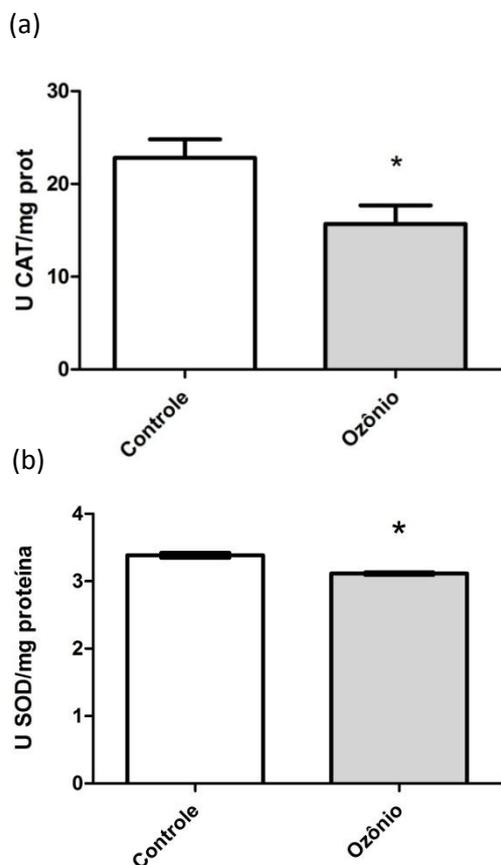


Fig. 2. Atividade enzimática da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) no tecido foliar de plantas *C. baccatum* L. var. *pendulum* não expostas e expostas cronicamente ao  $O_3$ : (a) Mostra a diminuição da atividade enzimática da CAT no grupo tratado. (b) Mostra uma diminuição da atividade enzimática da SOD no grupo tratado. \* indica diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  entre o grupo controle e o exposto ao  $O_3$  analisados com o teste-*t* de Student. Valores expressos como média  $\pm$  DP (n = 9).

demonstram uma diminuição na atividade destas duas enzimas antioxidantes no tecido foliar (Fig. 2), que pode ter ocorrido devido a dois fatores: à inibição da atividade

enzimática ou à diminuição no conteúdo enzimático, que pode ser causada tanto por uma diminuição na expressão gênica quanto por um aumento da degradação. Embora ainda não saibamos exatamente qual a forma de ação do ozônio sobre essas enzimas, a diminuição na atividade das mesmas pode comprometer a planta tanto a nível celular como tecidual (Bowler, 1992; Caregnato *et al.*, 2010).

Além das defesas enzimáticas, as espécies vegetais apresentam importantes defesas antioxidantes não enzimáticas como, por exemplo, ácido ascórbico, grupamentos tiois reduzidos,  $\alpha$ -tocoferol, compostos fenólicos, entre outros (Bartosz, 1997; Michalak, 2006). Os compostos fenólicos constituem um dos mais comuns e variados grupos de compostos secundários (Taiz e Zeiger, 2009). Comumente, sua produção é aumentada em condições de estresse como radiação UV, estresse hídrico e herbivoria (Dixon e Paiva, 1995; Lattanzio *et al.*, 2006). Podemos observar em nossos experimentos que há um aumento na produção de compostos fenólicos nas folhas de plantas expostas ao ozônio, possivelmente em resposta ao estresse desencadeado por este poluente (Fig.

3a). Outros estudos têm mostrado que

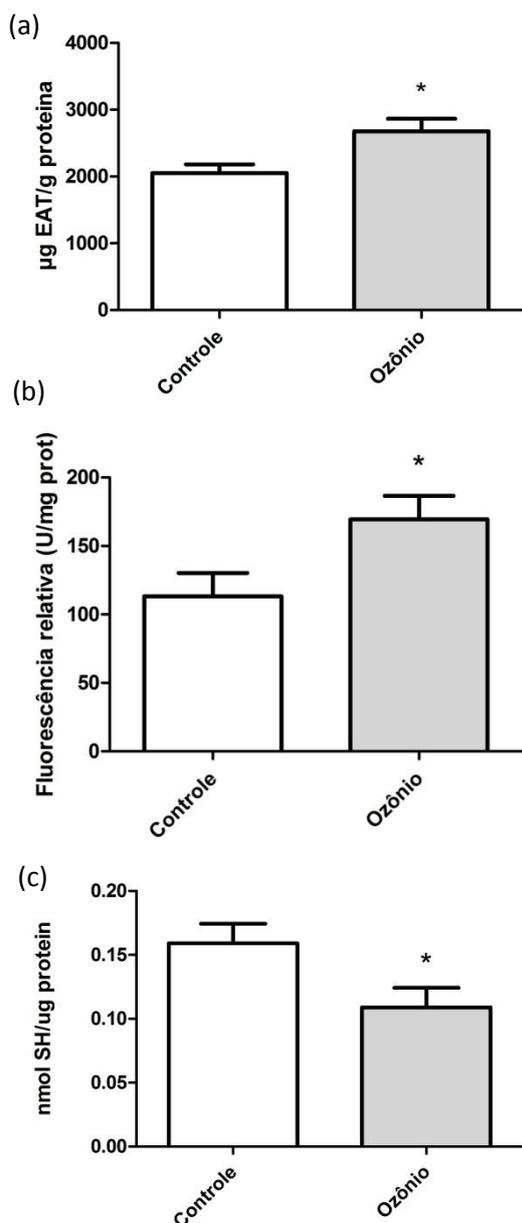


Fig. 3. Defesas antioxidantes não enzimáticas no tecido foliar de plantas *C. baccatum* L. var. *pendulum* não expostas e expostas cronicamente ao  $O_3$ : (a) mostra aumento nos conteúdo fenólico total. (b) mostra aumento nas ERO no grupo tratado. (c) mostra redução nos grupamentos tiois reduzidos no grupo tratado. \* indica diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  entre o grupo controle e o exposto ao  $O_3$  analisados com o teste-*t* de Student. Valores expressos como média  $\pm$  DP (n = 9).

o aumento do conteúdo de fenólicos em plantas que se desenvolveram na presença de  $O_3$  previne a perda de água e ajuda a aumentar a tolerância da planta ao estresse (Saleem *et al.*, 2001). Porém, no nosso caso, o aumento na produção de fenólicos parece não ser suficiente para proteger a planta contra o estresse, pois observamos aumento na produção de ERO através da leitura do DCF (Fig. 3b) e uma diminuição nos grupamentos tiois totais reduzidos (Fig. 3c), considerado um dos principais tampões redox celular (Halliwell e Gutteridge, 2007). Portanto, nossos dados mostram que o ozônio não só altera o sistema antioxidante enzimático, como também o não enzimático, criando assim um ambiente pró-oxidativo nas células.

Esse desbalanço no estado redox do tecido foliar, favorecendo a produção de ERO, pode ser o responsável pela perda no conteúdo de clorofila **a** e **b** representado na figura 4. A figura 4d exibe a razão entre a clorofila **a** e **b**, que se mostra mais baixa nas plantas expostas ao poluente, demonstrando que a clorofila **a** foi mais degradada do que a **b**. A clorofila **a** é o principal pigmento envolvido na fotossíntese, pois participa tanto das

antenas quanto dos centros de reação (Lodish *et al.*, 2000).

As concentrações atuais de ozônio em alguns países já causam danos significativos a diversas cultivares, levando a uma grande diminuição na produção agrícola dessas plantas. Estudos mostram que essas concentrações tendem a aumentar em muitos desses países, inclusive na China e na Índia onde há uma grande produção do fruto de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* (Ashmore, 2005; IPCC, 2001; Reifschneider e Ribeiro, 2004; Tiwari *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Than *et al.*, 2008). A baixa no conteúdo de clorofila e o estado pró-oxidativo encontrados sugerem que a planta apresenta uma reduzida capacidade de detoxificar as ERO geradas pela exposição ao O<sub>3</sub>, e isso, possivelmente, afetará a produção dos frutos em plantas expostas a esse poluente.

O ensaio de TRAP é amplamente utilizado e é comprovadamente um método simples, sensível e reproduzível, que permite determinar a capacidade antioxidante em misturas complexas tais como extratos vegetais (Desmarchelier *et al.*, 1997).

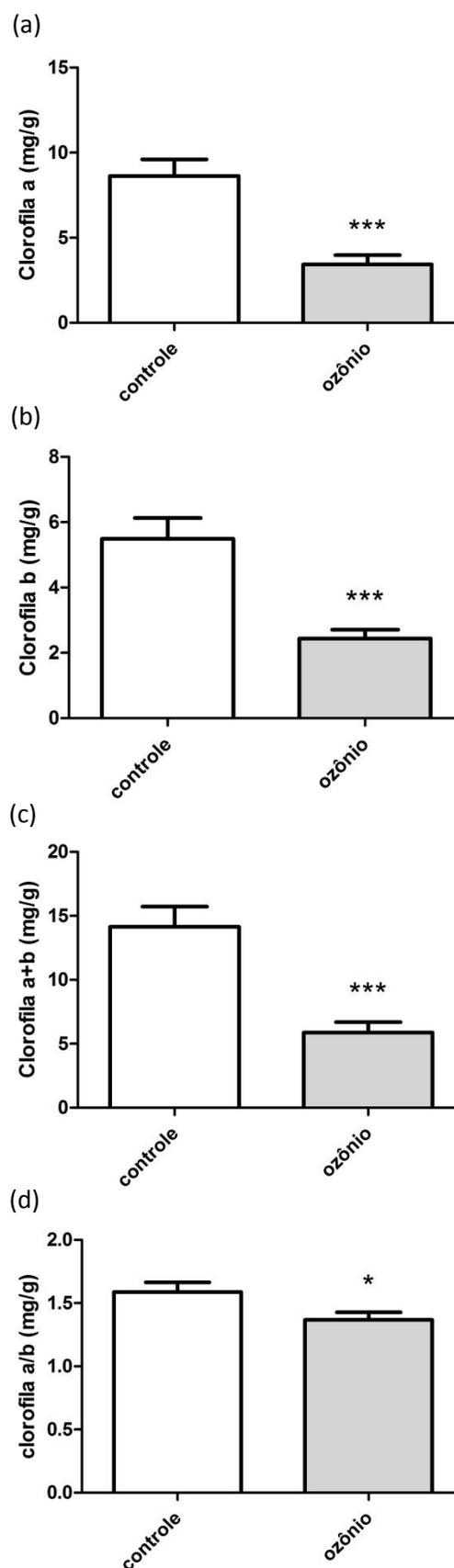


Fig. 4: Teor de clorofila do tecido foliar de plantas *C. baccatum* L. var. *pendulum* não expostas e expostas cronicamente ao O<sub>3</sub>: (a) mostra uma diminuição no teor de clorofila a. (b) mostra uma diminuição no teor de clorofila b. (c) mostra uma diminuição do

teor de clorofila total. (d) mostra uma diminuição da razão entre o teor de clorofila a e b. \* indica diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  e \*\*\* indica diferença estatística com  $p < 0,0005$  entre o grupo controle e o exposto ao  $O_3$  analisados com o teste-t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  DP (n = 9).

Todos os extratos analisados foram capazes de reduzir a luminescência derivada do sistema AAPH-luminol, indicando a presença de compostos com capacidade de eliminar o radical peroxil nos frutos (Fig. 5a). Estes resultados corroboram com dados da literatura que mostram que os frutos de plantas do gênero *Capsicum* apresentam um bom potencial antioxidante (Kappel *et al.*, 2008; Materska e Perucka, 2005; Shan *et al.*, 2005).

Foram encontradas diferenças no TAR dos frutos, indicando que os componentes do extrato dos frutos de plantas expostas ao ozônio têm uma reatividade antioxidante mais alta (Fig. 5b). Desta maneira, podemos inferir uma melhora na qualidade dos extratos destes frutos quando comparados com os das plantas não expostas. Embora a qualidade do extrato seja melhor, não houve diferença no potencial antioxidante total TRAP, que é um indicador da quantidade de antioxidantes (Fig. 5a).

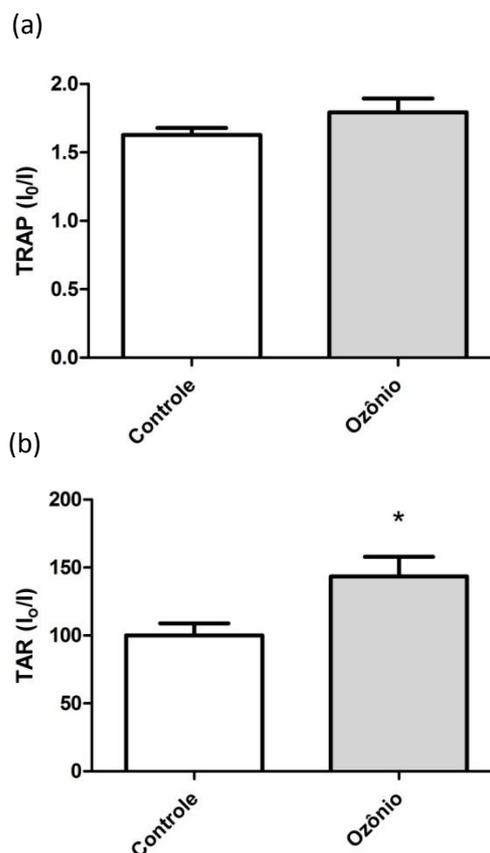


Fig. 5: Potencial antioxidante não enzimático total no fruto de plantas *C. baccatum* L. var. *pendulum* não expostas e expostas cronicamente ao  $O_3$ : (a) representa o TRAP. (b) mostra um aumento do TAR nos frutos tratados. \* indica diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  entre o grupo controle e o exposto ao  $O_3$  analisados com o teste-t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  DP (n = 9).

Além da alteração vista no conteúdo fenólico do tecido foliar, podemos ver, também, uma alteração no conteúdo fenólico dos frutos (Fig. 6). Sabe-se que muitos compostos fenólicos têm diferentes propriedades antioxidantes (Rice-Evans *et al.*, 1996; Burda e Oleszek, 2001). Portanto, uma alteração na proporção ou na quantidade dos diferentes compostos fenólicos poderia resultar em uma diferença na capacidade antioxidante

total ou na reatividade antioxidante total, como visto na avaliação do TAR.

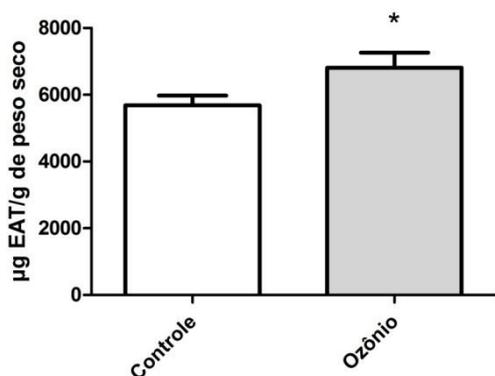


Fig. 6: Conteúdo fenólico total nos frutos de plantas *C. baccatum* L. var. *pendulum* não expostas e expostas cronicamente ao O<sub>3</sub>: mostra um aumento no conteúdo fenólico nos frutos tratados. \* indica diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  entre o grupo controle e o exposto ao O<sub>3</sub> analisados com o teste-t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  DP (n = 9).

Na figura 7 podemos observar a existência de correlação positiva tanto do TRAP quanto do TAR com a quantidade de compostos fenólicos totais, corroborando com dados da literatura (Shan *et al.*, 2005; Kappel *et al.*, 2008), o que nos indica que os compostos fenólicos podem ser os maiores responsáveis pelo potencial antioxidante deste fruto. Porém, em nossos experimentos, os extratos dos frutos tratados não mostraram um aumento no TRAP mesmo com um aumento dos compostos fenólicos totais. Assim, parece ter havido, também, uma mudança na composição química dos compostos fenólicos, uma vez que diferentes compostos

apresentam diferentes potenciais antioxidantes (Rice-Evans *et al.*, 1996; Burda and Oleszek, 2001).

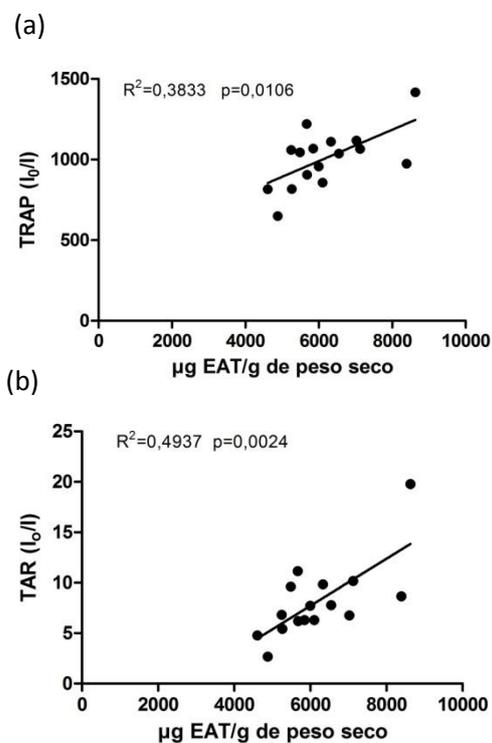


Fig. 7: Correlação entre o TRAP e o TAR com o conteúdo fenólico total: (a) mostra uma correlação positiva entre o TRAP e o conteúdo fenólico. (b) mostra uma correlação positiva entre o TAR e o conteúdo fenólico total. \* indica diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  entre o grupo controle e o exposto ao O<sub>3</sub> analisados com o teste-t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  DP (n = 9).

O conteúdo de capsaicina e dihidrocapsaicina dos extratos foi quantificado por HPLC. As diferentes co-injeções com extrato mais padrão, extrato mais fase móvel e padrão mais fase móvel nos permitem observar diminuição na área dos picos em relação à capsaicina em frutos de plantas expostas ao ozônio (Fig. 8c). A dihidrocapsaicina pôde ser encontrada

em quantidades baixas no fruto de plantas não expostas; porém não foi encontrada nos frutos do grupo tratado (Fig. 8b e 8c).

A biossíntese de capsaicina nas plantas é definida por duas vias: fenilpropanóides, que determina a estrutura fenólica, e o metabolismo de ácidos graxos, que determina a porção alifática da molécula (Prasad *et al.*, 2006). Frequentemente, mudanças nessa rota estão relacionadas a condições de estresse (Dixon and Paiva, 1995; Iriti e Faoro, 2009). O aumento no conteúdo fenólico total e a diminuição da capsaicina e dihidrocapsaicina nos sugere que pode estar havendo uma modulação na rota de fenilpropanóides.

Além disso, a ausência de diferença no TRAP juntamente com a diminuição da capsaicina e dihidrocapsaicina nos frutos tratados nos permite inferir que, apesar da capsaicina ter um bom potencial antioxidante (Kogure *et al.*, 2002; Materska and Perucka, 2005), não é a maior contribuinte para o potencial antioxidante total não enzimático. Outros estudos demonstram que a molécula de capsaicina tem

menor atividade antioxidante quando comparada a outros compostos fenólicos como, por exemplo, a quercetina (Materska and Perucka, 2005).

#### 4. Conclusão

As plantas tratadas com O<sub>3</sub> mostraram uma diminuição da atividade da CAT e da SOD no tecido foliar, além de apresentar um aumento na produção de ERO e uma diminuição nos grupamentos tióis totais reduzidos.

O aumento no conteúdo fenólico total no tecido foliar parece não ter conseguido reverter os danos derivados da ação dos ERO, uma vez que a planta mostrou uma diminuição tanto da clorofila **a** quanto da **b**, que são pigmentos imprescindíveis na fotossíntese e, conseqüentemente, para a geração de massa e energia.

Em relação aos frutos tratados, observamos um aumento no TAR e no conteúdo fenólico total, havendo também uma correlação entre eles. A capsaicina e dihidrocapsaicina mostraram uma diminuição no seu conteúdo em frutos tratados.



## 5. Agradecimentos

Agradeço à minha família, Rogério, Marta, Eduardo, José Niceas, Amélia pelo apoio incondicional durante toda minha trajetória acadêmica, sem eles tudo seria muito mais difícil. Ao meu orientador, José Cláudio e minha Co-orientadora, Fernanda que me proporcionaram um crescimento pessoal e profissional muito grande. Aos meus colegas de trabalho, Armando, Carlos Eduardo, João Paulo, Rafaela e Ricardo pelas ajudas, discussões e ensinamentos. Aos meus colegas da Universidade Federal de Santa Catarina, Flávio, Caroline, Ana por terem sido muito solícitos quando precisei e pelas contribuições com o trabalho. À minha namorada Camila pelas sugestões ao trabalho e pela compreensão das minhas ausências. Aos meus amigos de Uruguaiana; Arthur, Camila, Cassiano, Eduardo, Fabrício, Janaína, Marieli, Pâmela, Patrícia, Raquel, Renan, Rodrigo Mariano, Rodrigo Tubelo, Tobias; aos amigos da biologia Alan, André, Angela, Luana, Márcio, Valentina, Thayná, por tornarem minha vida a melhor do mundo.

## Referências

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- Aidar, M. P. M., Martinez, C. A., Costa, A. C., Costa, P. M. F., Dietrich, S. M. C., Buckeridge, M. S., 2002. Effects of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on the establishment of seedlings of jatobá. *Biota Neotropica* 2, 1-10.
- APHA, 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, eighteenth ed. Water Pollution Control Federation, Washington, DC.
- Ashmore, M.R., 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment* 28, 949-964.
- Bartosz, G., 1997. Review Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19, 47-64.
- Bennett, B.Y.R.N., Wallsgrave, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127, 617-633.
- Bowler, C., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 83-116.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2774-2779.
- Caregnato, F.F., Clebsch, C.C., Rocha, R.F., Feistauer, L.B.H., Oliveira, P.L., Divan Junior, A.D., Moreira, J.C.F., 2010. Ozone exposure differentially affects oxidative stress parameters in distinct *Phaseolus vulgaris* L. varieties. *Journal of Plant Interactions* 5, 111-115.

- Carvalho, S. I. C. de, Bianchetti, L. de B., Bustamante, P. G., Silva, D. B. da S., 2003. Catálogo de germosplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças, 49p. (Embrapa Hortaliças, Documentos, 49).
- CETESB, 2009. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo de 2008. Série Relatórios. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- Crutzen, P., Lelieveld, J., 2001. Human impacts on atmospheric chemistry. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 29, 17–45.
- Desmarchelier, C., Repetto, M., Coussio, J., Llesuy, S., Ciccía, G., 1997. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in southwest Amazonia (Bolivia and Peru). *International Journal Pharmacognosy* 35, 288–296.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant cell* 7, 1085-1097.
- Elagöz, V., Manning, W.J., 2005. Responses of sensitive and tolerant bush beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to ozone in open-top chambers are influenced by phenotypic differences, morphological characteristics, and the chamber environment. *Environmental Pollution* 136, 371-83.
- Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70-77.
- Fowler, D., Cape, J.N., Coyle, M., Smith, R.I., Hjellbrekke, a G., Simpson, D., Derwent, R.G., Johnson, C.E., 1999. Modelling photochemical oxidant formation, transport, deposition and exposure of terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100, 43-55.
- Fuhrer, J., Skärby, L., Ashmore, M. R., 1997. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution* 97, 91-106.
- Halliwell, B, Gutteridge, J. M. C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press Incorporated, New York, 851 p.
- Heagle, A. S., Body D. E., Heck W. W., 1973. An open-top field chamber to assess the impact of air pollution on plants. *Journal of Environmental Quality* 2, 365-368.
- Hoffman, P.G., Lego, M.C., Galetto, W.G., 1983. Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 1326–1330.
- IPCC, 2001. *Climate change 2001: the scientific basis*. Contribution of Working Group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate change. Cambridge University Press.
- Iriti, M., Faoro, F., 2007. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water, Air, and Soil Pollution* 187, 285-301.
- Iriti, M., Faoro, F., 2009. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *International*

- Journal of Molecular Sciences 10, 3371-3399.
- Kappel, V.D., Costa, G.M., Scola, G., Silva, F. a, Landell, M.F., Valente, P., Souza, D.G., Vanz, D.C., Reginatto, F.H., Moreira, J.C.F., 2008. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. *Journal of Medicinal Food* 11, 267-74.
- Karnosky, D.F., Skelly, J.M., Percy, K.E., Chappelka, A.H., 2007. Perspectives regarding 50 years of research on effects of tropospheric ozone air pollution on US forests. *Environmental Pollution* 147, 489-506.
- Knudson, L.L., Tibbitts, T.W., Edwards, G.E., 1977. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. *Plant Physiology* 60, 606-608.
- Kogure, K., Goto, S., Nishimura, M., Yasumoto, M., Abe, K., Ohiwa, C., Sassa, H., Kusumi, T., Terada, H., 2002. Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochimica et Biophysica acta* 1573, 84-92.
- Kuhn, U., Ganzeveld, L., Thielmann, A., Dindorf, T., Schebeske, G., Welling, M., Sciare, J., Roberts, G., Meixner, F., Lelieveld, J., others, 2010. Impact of Manaus City on the Amazon Green Ocean atmosphere: ozone production, precursor sensitivity and aerosol load. *Atmospheric Chemistry and Physics* 10, 9251-9282.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T., Cardinali, A., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* 661, 23-67.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000. Integrating cells into the tissue, *Molecular Cell Biology*.
- Mahalingam, R., Jambunathan, N., Gunjan, S. K., Faustin, E., Weng, H., Ayoubi, P., 2006. Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 29, 1357-1371.
- Materska, M., Perucka, I., 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annum* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1750-6.
- Mazid M, Khan TA, M.F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Review Literature And Arts Of The Americas* 3, 232-249.
- Michalak, A., 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15, 523-530.
- Nuez, F., Gil, R., Costa, J., 1996. *El cultivo de pimientos, chiles y ajies*. Mundi-Prensa, Madrid
- Oyagbemi, a a, Saba, a B., Azeez, O.I., 2010. Capsaicin: a novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. *Indian Journal of Cancer* 47, 53-58.
- PETROBRAS. 1998. Porto Alegre air quality study. Canoas. Ambient air measurements. Final Report. Projeto: O impacto dos combustíveis automotivos na qualidade do ar da região metropolitana de Porto Alegre.

- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042.
- Prasad, B.C.N., Kumar, V., Gururaj, H.B., Parimalan, R., Giridhar, P., Ravishankar, G. a, 2006. Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13315-20.
- Reifschneider, F. J. B., Ribeiro, C. S. C. Sistema de Produção de Pimentas (*Capsicum* spp.): Introdução e importância econômica. Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, 4 ISSN 1678 Versão Eletrônica Dezembro/2004. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm>. Acesso em: 20 de outubro de 2011.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Emergency Medicine Australasia*: EMA 23, 532-540.
- Rossi, Jr, J. A., Singleton, V. L., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Saleem, A., Lojonen, J., Pihlaja, K., Oksanen, E., 2001. Effects of long-term open-field ozone exposure on leaf phenolics of European silver birch (*Betula pendula* Roth). *Journal of Chemical Ecology* 27, 1049-1062.
- Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W., Langebartels, C., 1998. Ozone: An abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science* 3, 47-50.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M., 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of Clinical Nutrition* 81, 215S-217S.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H., 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7749-7759.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2009. *Fisiologia Vegetal*. fourth ed. Artmed, Porto Alegre, 820p.
- Than, P.P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P.W.J., Hyde, K.D., 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 9, 764-778.
- Tiwari, S., Agrawal, M., Manning, W.J., 2005. Assessing the impact of ambient ozone on growth and productivity of two cultivars of wheat in India using three rates of application of ethylenediurea (EDU). *Environmental Pollution* 138, 153-60.
- Wahyuni, Y., Ballester, A.-R., Sudarmonowati, E., Bino, R.J., Bovy, A.G., 2011. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72, 1358-1370.
- Wang, X., Manning, W., Feng, Z., Zhu, Y., 2007. Ground-level ozone in China: distribution and effects on crop yields. *Environmental Pollution* 147, 394-400.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Locke, S., 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy

radical-trapping antioxidant  
capability of human blood plasma  
by controlled peroxidation. FEBS  
Letters 187, 33-37.

Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., 2001.  
Stabilisation of edible oils with  
natural antioxidants. European  
Journal of Lipid Science and  
Technology 103, 752-767.