



FERNANDA TRESMONDI

**Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de *Psidium*
guajava ‘Paluma’ expostas em ambiente com ozônio**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2010

FERNANDA TRESMONDI

**Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de *Psidium*
guajava ‘Paluma’ expostas em ambiente com ozônio**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. EDENISE SEGALA ALVES

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Tresmondi, Fernanda

T798a Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de *Psidium guajava* 'Paluma' expostas em ambientes com ozônio / Fernanda Tresmondi -- São Paulo, 2010.

80 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010

Bibliografia.

1. Anatomia foliar. 2. Ozônio. 3. Estresse oxidativo . I. Título

CDU: 581.45

Aos meus pais,
À Fabiana e Irene,
dedico.

“A natureza é o único livro que oferece
um conteúdo valioso em todas as suas folhas”

(Johann Goethe)

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

À FAPESP pelo financiamento do Projeto Bioindicadores.

Ao Instituto de Botânica e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela infraestrutura e suporte oferecidos.

À Dra. Edenise Segala Alves, pela atenciosa orientação, pela confiança e cuidado e pela amizade divertida em tantos momentos que marcaram desde a iniciação científica até aqui. Muito obrigada!

À Dra. Marisa Domingos pela coordenação do Projeto Bioindicadores e pelas importantes contribuições científicas e por viabilizar o desenvolvimento desse estudo.

Às Dra. Silvia Ribeiro de Souza e Miriam Rinaldi pela condução de importantes etapas do projeto temático, e pelo fornecimento dos dados ambientais.

À querida Dra. Regina Maria de Moraes pelos valiosos conhecimentos passados e pelas informações a respeito da espécie de estudo.

À Dra. Andrea N. V. Pedroso por ter me ensinado as técnicas laboratoriais, desde a iniciação científica. Pela amizade, carinho e dedicação em todos os momentos.

À Ms. Bárbara B. Moura pelas conversas científicas, sempre tão produtivas, e pela colaboração em tantos momentos, principalmente aqueles que envolveram estatística e técnicas anatômicas.

Às Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros pela dedicação à Pós-graduação do Instituto de Botânica e pelos ensinamentos em Anatomia Vegetal.

À Dra. Adriana Hayashi por ter me ensinado técnicas, fornecido referências, auxiliado nos trabalhos de laboratório e pelas sugestões.

À Dra. Agnes Elisete Luchi pelos ensinamentos de anatomia vegetal e convivência durante esses anos.

Às Dras. Elisa Ayoama e Cynthia Hering pelas conversas, auxílios e companhias noturnas na seção.

À Maria Manoel pela disposição sincera em ajudar sempre.

À Dra. Silvia Rodrigues Machado e aos funcionários do Laboratório de Microscopia de Botucatu pelo orientação e preparo das análises ao MET.

À Dra. Juliana Pina pelas discussões e companhia nos infindáveis sábados de coleta, e pelo fornecimento de dados que enriqueceram o entendimento das respostas anatômicas encontradas.

Ao Francisco Ricardo pelo agradável companheirismo de sempre, e pela ajuda na manutenção das plantas.

Ao Julio Avanzo pela iniciativa e atitude de ajudar a encontrar um lar para as mudas de goiabeiras órfãs.

Ao Dr. Eduardo Luiz Longui pelos ilustres raciocínios e ajuda nas análises estatísticas.

Às funcionárias de apoio do Núcleo de Pesquisa em Ecologia Vegetal pelo auxílio em todos os plantios.

Às colegas Ana Paula, Daiane, Marcelle e Patrícia pelos momentos de colaboração nas disciplinas.

À Talita Amador por ter sido minha parceira em momentos tão difíceis e por ter alegrado tantos outros.

À Ana Livia Negrão pela ajuda e agradável companhia no período final da dissertação.

Ao Marcelo Machado pelo carinho e apoio em fases decisivas da minha vida, por me ajudar a enxergar de maneira simples coisas que, às vezes, parecem tão complexas.

Às queridas amigas Daniella Vinha, Gisele Areias, Ingrid Balesteros e Sabrina Latansio-Aidar pela ajuda principalmente na época das disciplinas, e acima de tudo pela inestimável amizade.

Ao Marcelo Furini pela colaboração em vários momentos e em boa parte das coletas.

Aos meus pais, minha irmã e minhas avós pelo amor e paciência, por entenderem os motivos de minha ausência e mesmo assim estarem sempre presentes.

Aos inseparáveis amigos de sempre Mariana, Almir, Vitória, Alex, Íris, Ivy, Elivânia e Adriano pela força que só a amizade verdadeira conhece.

A todos que de alguma maneira ajudaram mesmo que indiretamente.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Poluição nos centros urbanos.....	1
I.2. Ozônio troposférico	2
I.3. Espécies reativas de oxigênio (EROs) e o estresse oxidativo.....	5
I.4. Bioindicação	7
I.5. Justificativa	11
II. OBJETIVOS	13
II.1. Objetivos específicos.....	13
III. MATERIAL E MÉTODOS	14
III.1. Local de estudo.....	14
III.2. Monitoramento dos dados ambientais.....	15
III.3. Obtenção das plantas.....	15
III.4. Coleta das amostras.....	18
III.5. Análises em microscopia fotônica e eletrônica de transmissão	19
III.5.1. Densidade estomática	20
III.6. Testes histoquímicos	21
III.6.1. Avaliação de substâncias fenólicas	21
III.6.2. Localização do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	21
III.7. Sintomas foliares visíveis.....	22
III.8. Análises estatísticas.....	23
IV. RESULTADOS.....	24
IV.1. Caracterização do ambiente de estudo	24
IV.2. Anatomia foliar de <i>Psidium guajava</i> ‘Paluma’	27
IV. 3. Compostos fenólicos	28
IV.3.1. Acúmulo de antocianina.....	28
IV.3.2. Testes histoquímicos para localização de fenóis.....	29
IV.4. Acúmulo de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	31
IV.5. Densidade estomática.....	35
IV.6. Análises estruturais	36
IV.7. Análises ultraestruturais	43
V. DISCUSSÃO.....	52
VI. CONCLUSÕES	64
VII. RESUMO.....	65
VIII. ABSTRACT	66
IX. LITERATURA CITADA	67
ANEXO I.....	76

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACS – Senescência celular acelerada (Accelerated Cell Senescence)

AOT40 – Dose acumulada de O₃ acima de 40 ppb (Accumulated over threshold)

CH₄ – Metano

CO – Monóxido de carbono

CO₂ – Dióxido de carbono

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COVs – Compostos orgânicos voláteis

DAB – Solução com 3,3'-diaminobenzidina

ERO – Espécie reativa de oxigênio

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂S – Sulfeto de hidrogênio

HR – Resposta de hipersensibilidade

HR-like – Resposta semelhante à de hipersensibilidade

IAG – Instituto Astronômico e Geofísico

IIF – Índice de injúria foliar

MET – Microscópio eletrônico de transmissão

MF – Microscopia fotônica

NO – Monóxido de nitrogênio

NO₂ – Dióxido de nitrogênio

NO_x – Óxidos de nitrogênio

PAN – Nitrato de peroxiacetil

PCD – Morte celular programada (Programmed cell death)

PEFI – Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

RO₂ – Radicais orgânicos

SO₂ – Dióxido de enxofre

I. INTRODUÇÃO

I.1. Poluição nos centros urbanos

A população e o meio-ambiente dos grandes centros urbanos sofrem com o problema da poluição aérea. De acordo com Molina & Molina (2004), esse problema é observado nas grandes cidades ao redor do planeta, já que a expansão urbana está ligada ao aumento da industrialização e da frota automotiva, necessários para atender ao crescimento populacional dessas áreas, o que afeta negativamente o meio ambiente e os seres vivos aí presentes.

No Brasil, o Estado de São Paulo enfrenta uma situação particularmente preocupante, uma vez que reúne a maior população (41 milhões), cerca de 40% da frota automotiva do país, além do maior parque industrial. Esses fatores fazem com que São Paulo, especialmente a cidade - com mais de seis milhões de veículos, apresente grande quantidade e diversidade de poluentes atmosféricos, principalmente o ozônio (O_3) e seus precursores, fazendo com que as concentrações desse gás atinjam valores elevados em várias regiões (Cetesb 2009).

De acordo com a Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/1990, considera-se poluente atmosférico “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 impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade”.

Freedman (1995) classifica os poluentes em primários e secundários. Os poluentes primários são aqueles liberados diretamente da fonte de emissão, entre eles estão os óxidos de nitrogênio (NO_x), dióxido de enxofre (SO_2), amônia, sulfeto de hidrogênio (H_2S), metano (CH_4), monóxido de carbono (CO) e dióxido de carbono (CO_2); e os secundários são aqueles formados por meio de reações químicas entre os poluentes primários, como por exemplo, o ozônio (O_3) e nitrato de peroxiacetila (PAN).

I.2. Ozônio troposférico

Ao contrário do O_3 presente na estratosfera, formador da camada protetora que absorve parte da radiação ultravioleta que chega à Terra, o O_3 troposférico (figura 1), quando presente em atmosfera poluída, é danoso aos seres vivos, devido à sua ação oxidante. Além disso, atua como um gás de efeito estufa, devido à sua capacidade de absorver a radiação, contribuindo com aproximadamente 7% para o aquecimento global (Krupa *et al.* 2001).

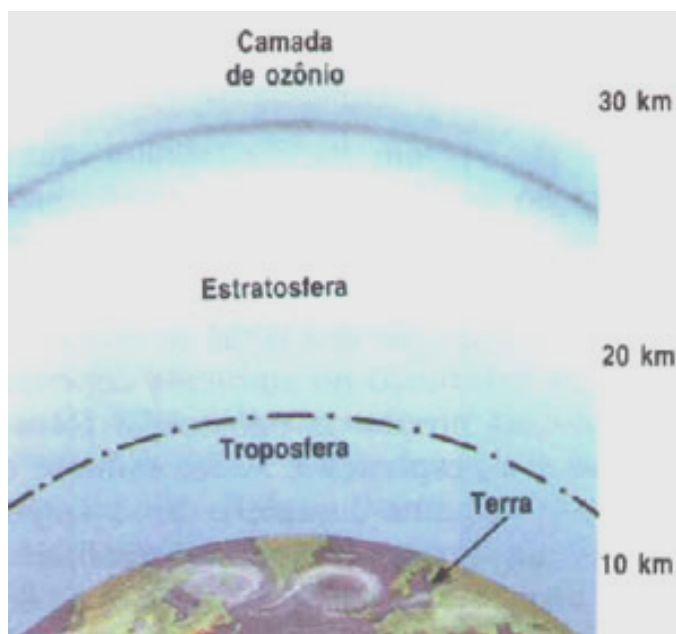
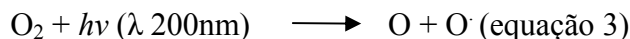
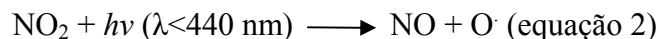


Figura 1. Desenho esquemático representando as camadas da atmosfera. Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/meio-ambiente-camada-de-ozonio>.

O O_3 tem como precursores compostos orgânicos voláteis (COVs) e óxidos de nitrogênio. Sua formação é um fenômeno predominantemente urbano o que faz desse gás o poluente mais importante nos grandes centros. O processo é iniciado pela ação da luz solar, que promove uma cadeia complexa de reações capazes de produzir, além do O_3 , nitrato de peroxiacetila, aldeídos, cetonas, peróxidos, entre outros (Sawyer *et al.* 2000).

O processo de formação desse poluente secundário formado por reações fotoquímicas na troposfera é descrito nas equações de 1 a 3.



(M = qualquer partícula, molécula ou átomo)

Na atmosfera poluída (equação 4) o monóxido de nitrogênio (NO) é convertido a dióxido de nitrogênio (NO₂), podendo reagir com radicais orgânicos (RO₂) (equação 5), havendo neste caso acúmulo de O₃ (equação 6) (Freedman 1995, Kley *et al.* 1999).



Na atmosfera limpa essas reações ocorrem, no entanto, não há o acúmulo prejudicial de O₃, pois ele reage com seus precursores na mesma proporção em que é formado por eles (equação 7) (Krupa & Manning 1988, Freedman 1995):



Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são importantes no processo de formação do O₃, uma vez que os hidrocarbonetos insaturados são dissipados para a atmosfera durante a queima veicular de combustíveis fósseis e também pela vegetação, por meio da liberação de gases (Roschina & Roschina 2003). Esses gases aumentam o potencial oxidativo da atmosfera ao reagirem com os NO_x, dificultando a conversão de O₃ e fazendo com que o mesmo se acumule na troposfera (Sawyer *et al.* 2000).

Por depender para sua formação de reações fotoquímicas, o O₃ apresenta maiores concentrações em períodos do dia com mais altas intensidades luminosas, ao contrário do que ocorre com seus precursores, que se concentram mais no início da manhã e ao final da tarde, períodos com maior tráfego veicular. Dessa maneira, o O₃ troposférico apresenta um perfil diário conforme representado abaixo (figura 2) (Krupa *et al.* 2001):

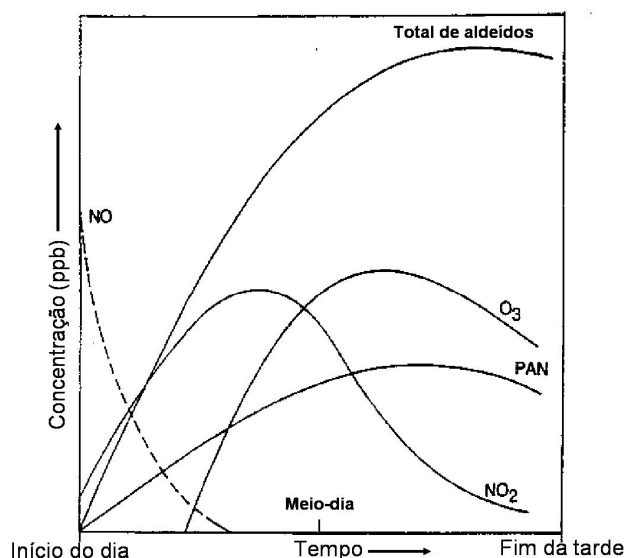


Figura 2. Perfil diário dos poluentes primários (NO_2 , NO, aldeídos e hidrocarbonetos) emitidos diretamente das fontes e precursores de poluentes secundários (PAN e O_3) que se formam por meio de reações fotoquímicas em atmosfera poluída (Krupa *et al.* 2001, modificado).

Tendo em vista o grande prejuízo que o O_3 pode causar em vegetação natural e áreas agrícolas, são sugeridos índices que buscam estabelecer limites para proteção da vegetação. A Cetesb (2009) utiliza como valor base a AOT40 (dose acumulada de O_3 acima de 40ppb) trimestral. Além da AOT, são propostas outras medidas de concentrações de O_3 como: SUM00 que é a soma total de todas as concentrações de O_3 em um ano; SUM60 é a concentração acima de 60ppb em um ano; NAs_t que é a soma das médias mais altas encontradas em três anos anteriores ao estudo, entre outros (Paoletti *et al.* 2007).

Efeitos dos poluentes fotoquímicos foram observados há mais de quatro décadas na vegetação de regiões dos Estados Unidos (Krupa *et al.* 2001). Investigações posteriores têm provado que o O_3 é o mais importante e frequente dos poluentes fotoquímicos gasosos; sendo muito fitotóxico, causa injúrias foliares em plantações e florestas (ICP Forest 2004).

Estudos realizados, em regiões onde o O_3 está presente em concentrações potencialmente danosas, têm a finalidade de conhecer os danos que esse gás causa à

vegetação e a dose específica necessária para desencadear determinadas respostas em diferentes espécies vegetais (Karnosky *et al.* 2007, ICP Forest 2007).

I.3. Espécies reativas de oxigênio (EROs) e o estresse oxidativo

O O_3 penetra na folha através dos estômatos e assim que entra em contato com a água dos espaços intercelulares acontece a ozonólise (quebra do O_3 pela água presente nesses espaços). Ocorre assim, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\cdot$), como mostrado na figura 3, no esquema proposto por Roschina & Roschina (2003). Os danos decorrentes da ação biológica da EROs, no entanto, dependem da eficiência do sistema celular antioxidativo, composto por substâncias capazes de capturá-las e neutralizá-las (Bray *et al.* 2000). Caso o sistema de defesa da planta não seja suficiente para promover tal neutralização, surge o estresse oxidativo que pode danificar moléculas vitais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Pellinen *et al.* 1999, Iriti & Faoro 2008).

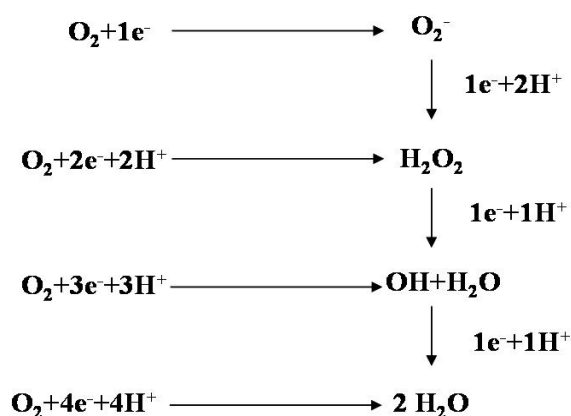


Figura 3. Reação sequencial de uma molécula de oxigênio, mostrando os produtos formados. Anion superóxido (O_2^-); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); radical hidroxila ($OH^\cdot$).

Algumas EROs são radicais livres, porém o H_2O_2 é um oxidante estável e sem carga, o que permite sua passagem pela camada bilipídica da membrana celular. Além disso, possui um tempo de vida mais longo em relação às outras EROs (Resende *et al.* 2003), o que o torna de grande interessante no estudo do efeito das EROs nas plantas.

Como já mencionado, as plantas possuem antioxidantes capazes de reagir com as EROs na tentativa de evitar ou diminuir o estresse oxidativo gerado. Alguns desses antioxidantes são as enzimas superóxido dismutase, peroxidase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase entre outros; e ainda metabólitos como a glutathione, carotenóides, ácido ascórbico e fenóis (Soares & Machado 2007).

As EROs são formadas também naturalmente pelo metabolismo vegetal devido à cadeia de elétrons, que liberam radicais livres (Resende *et al.* 2003). No entanto, em um ambiente contaminado, a formação de EROs é intensificada e pode causar desequilíbrio no sistema de defesa das plantas, resultando em injúrias ou sintomas visíveis. Portanto, as alterações se iniciam em nível bioquímico e caminham para os níveis ultraestrutural, estrutural e, ao final, morfológico.

Segundo Gunthardt-Goerg & Vollenweider (2007), a ação das EROs pode resultar em dois tipos de respostas: morte celular programada (em inglês Programmed Cell Death - PCD) ou senescência celular acelerada (em inglês Accelerated Cell Senescence - ACS). Tais respostas variam de acordo com a sensibilidade da espécie e normalmente não aparecem simultaneamente.

A PCD é utilizada como um mecanismo de defesa vegetal contra estressores de origem biótica ou abiótica. Morte celular rápida pode ser observada em decorrência do estresse oxidativo e resulta na chamada resposta de hipersensibilidade (Hipersensitive Response – HR), que é uma resposta específica a patógenos. Na ausência de patógenos, e quando o elicitor é um fator abiótico, esse processo recebe o nome de HR-like. O O₃ e os metais pesados são descritos como causadores de HR-like. Esse processo pode ser caracterizado microscopicamente observando-se a ausência de patógenos, a restrição da PCD a pequenos grupos de células, a desorganização do conteúdo celular, degradação do núcleo e alta condensação da cromatina, colapso de parede celular associado à sua incompleta degradação

e condensação em corpos apoptóticos como consequência da rápida morte celular (Gunthardt-Goerg & Vollenweider 2007).

A ACS é evidenciada pelo declínio na atividade fotossintética devido ao aumento do estresse oxidativo nos cloroplastos (Vollenweider *et al.* 2003). Estruturalmente, a ACS no mesófilo inclui aumento no tamanho dos vacúolos, a progressiva degeneração dos constituintes celulares como o aumento na condensação do citoplasma, núcleo e cloroplasto e acúmulo de compostos secundários (Gunthardt-Goerg & Vollenweider 2007). Esse processo é lento e idêntico ao processo de envelhecimento natural, porém ocorre em tecidos que ainda não estariam em processo de senescência (Vollenweider & Gunthardt-Goerg 2006).

Sendo assim, observar os sintomas microscópicos além de auxiliar no entendimento da expressão do sintoma visível, ajuda ainda, a observar estágios precoces da progressão sintomática (Vollenweider & Gunthardt-Goerg 2006).

I.4. Bioindicação

Plantas que apresentam respostas específicas ao O₃ podem ser utilizadas em programas de biomonitoramento e são consideradas como bioindicadoras desse gás. Contudo, o tipo de sintoma foliar visível depende da sensibilidade da espécie ao O₃ (Arndt & Schweizer 1991, Klumpp *et al.* 2001, De Temmerman *et al.* 2004)

De acordo com Klumpp *et al.* (2001), o biomonitoramento com plantas pode ser especialmente útil em locais que não contam com estações de monitoramento que empregam métodos físico-químicos e, além disso, complementa tais informações quando essas estão disponíveis. Sendo assim, o biomonitoramento com plantas é uma importante ferramenta alternativa para mapeamento espacial e temporal de riscos impostos pela poluição aérea aos sistemas biológicos (Arndt & Schweizer 1991, Mulgrew & Williams 2000, VDI 2003).

Os sintomas foliares visíveis causados pelo O₃ podem ser cloroses, necroses e pigmentações. As cloroses são decorrentes da degradação da clorofila (geralmente encontrada

em gimnospermas); as necroses são oriundas da morte de grupos isolados de células do parênquima paliçádico e acúmulo de diferentes compostos fenólicos nas células adjacentes; e a pigmentação indica o acúmulo de compostos fenólicos oxidados, na maioria do tecido foliar e mais frequentemente nas células epidérmicas da superfície adaxial e parênquima paliçádico (Vollenweider *et al.* 2003).

Contudo, para atribuir os sintomas foliares ao ozônio é necessário observar como e onde eles ocorrem. De acordo com Novak *et al.* (2003), sintomas foliares decorrentes do O₃ se apresentam somente na superfície adaxial, entre as nervuras primárias ou secundárias, surgindo inicialmente nas folhas mais velhas próximas à base.

De acordo com Vollenweider *et al.* (2003) é importante realizar análises microscópicas para validar os sintomas macroscópicos para afirmar qual o tipo de estresse que ocasionou o sintoma observado. Os autores reforçam que análises microscópicas dos tecidos foliares permitem identificar as características estruturais indicativas do estresse oxidativo causado pelo O₃, que por ser um gás reage diferentemente de outros estressores. A figura 4 abaixo indica os passos a serem considerados na identificação de sintomas decorrentes do ozônio.

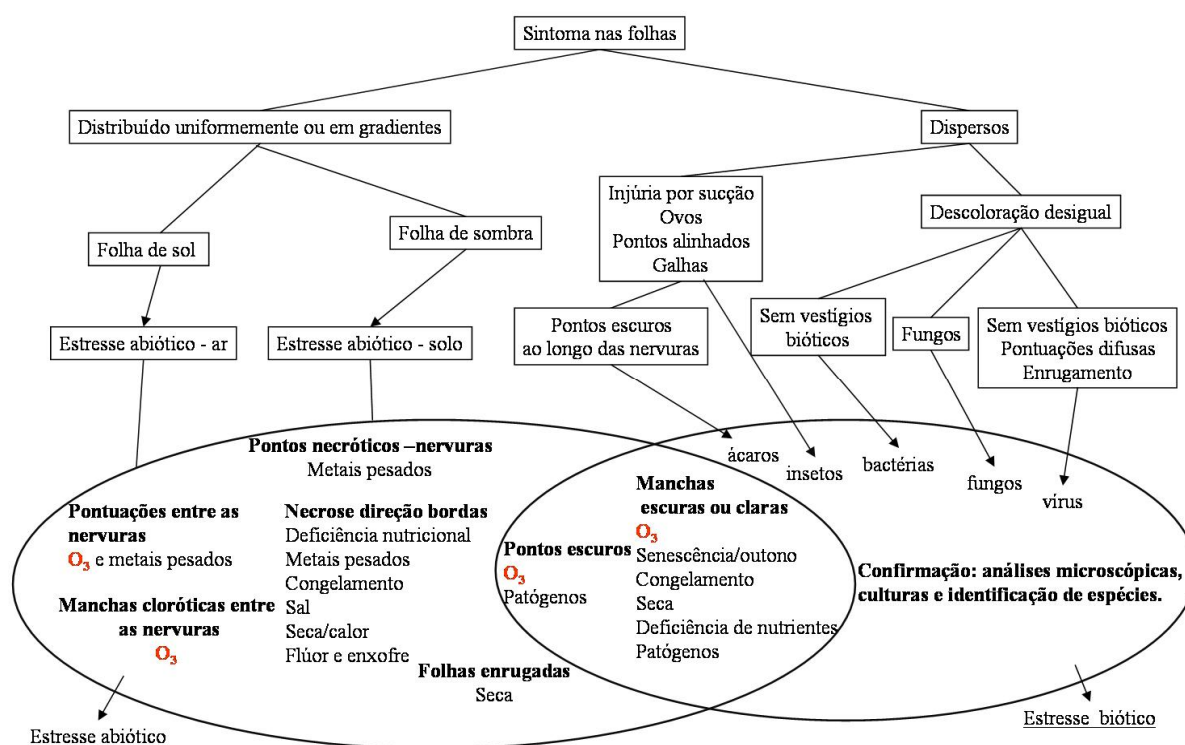


Figura 4. Esquema proposto por Vollenweider & Günthardt-Goerg (2006) para identificação de sintomas visíveis causados pelo O_3 .

A grande maioria dos estudos relacionados ao biomonitoramento com plantas utiliza espécies provenientes de regiões temperadas, nem sempre adaptadas às regiões tropicais. Assim, selecionar, testar e utilizar espécies tropicais no biomonitoramento do ar é um desafio crescente diante do aumento da quantidade de poluentes aéreos, especialmente o O_3 , presentes ambiente urbano.

São poucas as áreas florestais presentes nas áreas urbanas de São Paulo e, dentre elas, destaca-se o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), um dos mais significativos remanescentes de Mata Atlântica inserido em área urbana do país (Barbosa *et al.* 2002). Alguns estudos realizados no local já estabeleceram que a região é fortemente afetada por poluentes secundários, especialmente o O_3 (Domingos *et al.* 2002).

Na área do PEFI, as concentrações de O₃ podem alcançar níveis superiores a 100 ppb, excedendo várias vezes o padrão horário de qualidade do ar (80 ppb) estabelecido pela resolução CONAMA N^o 3/1990 (Cetesb 2008).

No hemisfério norte há estudos que avaliam sintomas macro e microscópicos em plantas arbóreas submetidas ao ozônio (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007), o primeiro passo no estabelecimento de plantas potencialmente indicadoras da presença desse gás. No Brasil, contudo, esses estudos ainda são incipientes e pouco se sabe sobre as respostas de espécies arbóreas tropicais.

De acordo com Günthardt-Goerg & Vollenweider (2007) espécies arbóreas apresentam, em comparação com as herbáceas, vantagens para serem utilizadas em programas de biomonitoramento devido a três fatores principais: i) crescimento vegetativo independente da floração, permitindo que os sintomas reflitam mais claramente os efeitos acumulativos do aumento na concentração dos poluentes; ii) desenvolvimento de maior quantidade de tecidos de suporte, transferindo importante função de desintoxicação às paredes celulares (estresse oxidativo ou acúmulo de metais pesados); iii) contam, nas folhas, com defesas químicas parcialmente diferentes, com o envolvimento mais freqüente de taninos condensados.

I.5. Justificativa

Psidium guajava ‘Paluma’ vem sendo investigada, sob condições experimentais, quanto ao seu potencial bioindicador de O₃. Furlan *et al.* (2007) observou nessa cultivar o aparecimento de injúrias foliares visíveis após cinco dias de fumigação (77 ppb/8 horas), sendo que as folhas mais velhas começaram a apresentar pontos de pigmentação avermelhada nas regiões intervenais, que aumentaram ao longo do tempo de fumigação. Posteriormente foram realizados experimentos em campo para verificar o aparecimento de sintomas visíveis, sendo investigados parâmetros bioquímicos como enzimas e metabólitos secundários (Pina & Moraes 2007, Dias *et al.* 2007). Pina *et al.* (2007) constataram sintomas visíveis na planta e afirmam que *P. guajava* ‘Paluma’ é uma espécie sensível ao ozônio. Alves (2006) observou algumas alterações nos tecidos de plantas dessa cultivar mantidas no Parque do Ibirapuera, local da cidade de São Paulo submetido a altas concentrações de ozônio (Cestesb 2008).

No entanto, ainda são necessários mais estudos com essa planta para se determinar a influência de outros fatores ambientais nas suas respostas e como as mesmas se iniciam e progridem.

O presente estudo está inserido no Projeto Bioindicadores, financiado pela FAPESP – Processo 05/51169-9 e coordenado pela Dra Marisa Domingos, que visa ao entendimento das respostas de três espécies de plantas bioindicadoras de O₃. *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ (tabaco, consagrada e muito utilizada em regiões temperadas), *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ (“morning glory”) e *Psidium guajava* ‘Paluma’ (goiabeira), buscando estabelecer as mais viáveis para serem utilizadas em programas de biomonitoramento do O₃ na cidade de São Paulo. Nesse projeto multidisciplinar foram avaliados, nas três espécies, diversos parâmetros biológicos como: crescimento, concentrações de antioxidantes e de pigmentos, alterações fisiológicas, ultraestruturais e estruturais, sendo as duas últimas apresentadas e discutidas no presente trabalho para *Psidium guajava* ‘Paluma’.

Assim, testa-se a hipótese de que *P. guajava* 'Paluma', quando exposta em ambiente com O₃ na cidade de São Paulo, apresenta alterações ultraestruturais e estruturais indicativas do estresse oxidativo provocado por esse gás.

II. OBJETIVOS

O objetivo geral é contribuir com informações que permitam afirmar se a planta é ou não indicada para o biomonitoramento do O₃ no PEFL.

II.1. Objetivos específicos

- Identificar em folhas de *P. guajava* ‘Paluma’ alterações estruturais, ultraestruturais, histoquímicas decorrentes da exposição em ambiente contaminado por O₃;
- Relacionar a intensidade da resposta da planta ao O₃ com parâmetros ambientais e se outros fatores abióticos, além do O₃, interferem nas respostas da planta;
- Investigar o comportamento da espécie estudada frente ao estresse oxidativo causado pelo O₃, por meio do acúmulo de espécies ativas de oxigênio (H₂O₂).

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Local de estudo

De acordo com Fernandes *et al.* (2002), o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) constitui uma grande área verde em meio intensamente urbanizado, com extensa porção de vegetação natural ainda preservada (figura 5). Situa-se na região sudeste do município de São Paulo, entre os paralelos 23°38'08''S e os meridianos 46°38'00''W, apresentando área total de 526,38 ha. De acordo com Barbosa (1993 *apud* Fernandes *et al.* (2002) o PEFI é uma área de grande importância ambiental e social, destacando-se o seu papel como repositório de biodiversidade, laboratório natural para pesquisas básicas e aplicadas, fator moderador do microclima local, fator mantenedor do lençol freático e laboratório natural para desenvolvimento de programas de educação ambiental em diversos níveis.

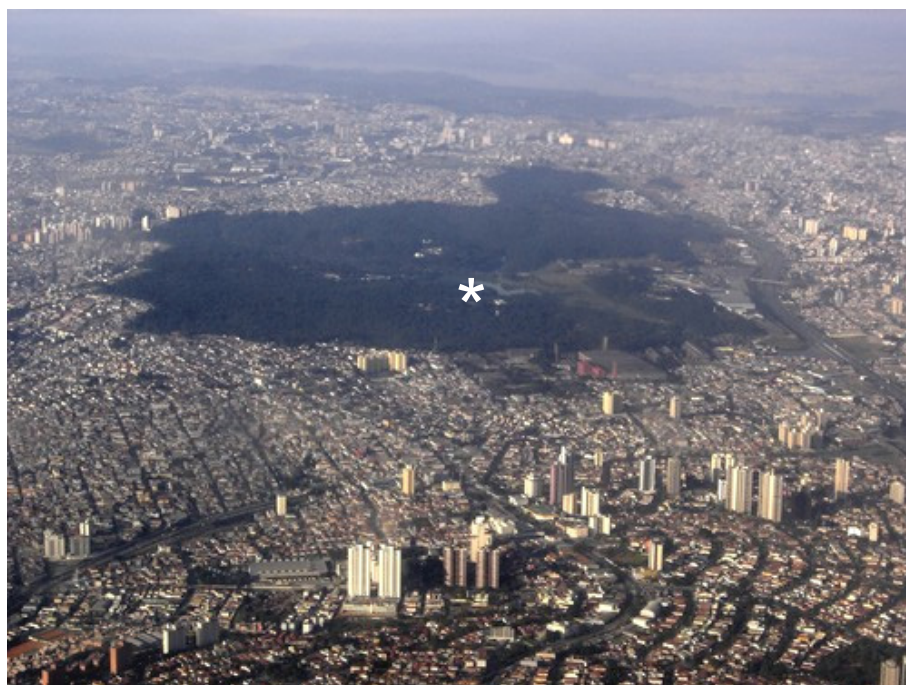


Figura 5. Vista aérea do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). (*) Área do Instituto de Botânica. Fonte: <http://maps.google.com.br/>

III.2. Monitoramento dos dados ambientais

Durante a condução da fase experimental do estudo foram monitorados por integrantes do projeto FAPESP 05/51169-9 os poluentes atmosféricos O₃, NO, NO₂ e NO_x, empregando-se monitores HORIBA. Foram ainda processados dados meteorológicos, disponibilizados pelo Instituto Astronômico e Geofísico (IAG) da Universidade de São Paulo (SP) localizado no PEFI.

III.3. Exposição das plantas

Mudas de *Psidium guajava* ‘Paluma’ foram adquiridas de produtor especializado. Trata-se de um clone cujo processo de produção é realizado retirando-se das plantas matrizes ramos com cerca de 70 dias. Após a poda, são confeccionadas estacas padronizadas contendo quatro pares de folhas, sendo o par superior mantido e os três pares inferiores retirados, restando apenas as gemas. As estacas são submetidas ao processo de nebulização intermitente (nebulizador 1min desligado e 15min ligado), por 60 dias para enraizamento utilizando-se como substrato vermiculita fina. Passado o período de enraizamento, as estacas com sistema radicular bem definido, são transplantadas em sacos para mudas de 1,5 L, passando-se a utilizar como substrato Rendmax (Eucatex) no qual permanecem durante cinco meses, sendo irrigadas periodicamente.

Após a aquisição, no Instituto de Botânica, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos contendo substrato padronizado (Plantimax[®], vermiculita e casca de coco 2:2:1). As mudas permaneceram por 15 dias em casa de vegetação com ar filtrado e controle de temperatura (figura 6), com temperatura média de 21°C e umidade relativa média de 75% durante todo o período do experimento. Após a aclimação, deu-se início à exposição de cerca de 110 mudas, para cada estação do ano, sendo que cada exposição teve duração de aproximadamente 80 dias. A cada seis dias foram coletadas seis plantas do total das 110 inicialmente expostas, sucessivamente até o final da exposição e consequentemente das

plantas. Informações sobre os períodos das exposições e respectivas coletas estão indicadas na tabela 1.



Figura 6. Casa de vegetação, instalada no Instituto de Botânica, onde foi mantido o material de referência.

Tabela 1. Datas das coletas nas quatro estações em que as plantas de *Psidium guajava* 'Paluma' foram expostas.

Coletas	Primavera	Verão	Outono	Inverno
1	8/10/2007	14/1/2008	8/4/2008	14/7/2008
2	12/10/2007	19/1/2008	19/4/2008	26/7/2008
3	20/10/2007	25/1/2008	17/5/2008	5/8/2008
4	27/10/2007	2/2/2008	31/5/2008	13/8/2008
5	10/11/2007	9/2/2008	7/6/2008	16/8/2008
6	22/11/2007	16/2/2008	21/6/2008	30/8/2008
7	24/11/2007	23/2/2008	28/6/2008	6/9/2008
8	1/12/2007	1/3/2008		13/9/2008
9	8/12/2007	8/3/2008		20/9/2008
10	15/12/2007	15/3/2008		27/9/2008
11	22/12/2007	22/3/2008		8/10/2008
12		29/3/2008		
13		5/4/2008		

As plantas foram expostas no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), em área do Instituto de Botânica, onde foram mantidas em suportes com caixas plásticas com água e cobertas com telas de arame galvanizado (figura 7). A irrigação das plantas foi realizada por capilaridade, por cordões de náilon, com uma das extremidades inserida nos vasos na altura das raízes e a outra em contato com a água da caixa plástica (VDI 2003).

Em cada exposição, as plantas foram dispostas lado a lado, portanto sob as mesmas condições de temperatura, precipitação, velocidade do vento e irradiância. Cerca de 10 mudas, para cada estação do ano, permaneceram em casa de vegetação e foram utilizadas como material de referência.



Figura 7. Mudas de *P. guajava* ‘Paluma’ expostas de no ambiente de forma padronizada.

Para evitar o aparecimento de alterações que pudessem interferir na identificação dos sintomas provocados pelo O_3 , como carência de nutrientes e herbivoria, as plantas foram adubadas mensalmente com 100 ml por vaso, de solução de Peters N:P:K(10:10:10) e foram pulverizadas com solução acaricida Actara[®].

III4. Coleta das amostras

Para a avaliação de respostas celulares das plantas foram coletas amostras de folhas para realização dos seguintes procedimentos: análises estruturais, ultraestruturais e histoquímicas (figura 8).

Para as análises estruturais realizadas em microscopia fotônica e a avaliação do acúmulo de H_2O_2 foram retiradas, semanalmente durante todas as estações, seis plantas das quais foram coletadas duas folhas adultas totalmente expandidas, dos segundos e terceiros nós (da base para o ápice), uma vez que a literatura informa serem as folhas adultas as mais sensíveis ao ozônio (Novak *et al.* 2003). A tabela 1 indica as datas das coletas realizadas durante todo o período experimental nas quatro estações do ano para essas análises.

A densidade estomática foi quantificada em amostras da região mediana de folhas que se expandiram no ambiente e na casa de vegetação (material de referência) e foram coletadas somente ao final das exposições.

Foram ainda coletadas, ao final das estações, folhas com sintomas visíveis dos primeiros e segundos nós (da base para o ápice), para as análises qualitativas de localização de compostos fenólicos. Sendo que, para a avaliação de antocianina foram selecionadas somente as plantas com sintomas visíveis, enquanto que para o teste de cloreto férrico e vanilina ácida foram retiradas folhas com e sem sintomas para comparação do conteúdo celular.

Para as análises de ultraestrutura, folhas do quarto nó (da base para o ápice) mantidas na casa de vegetação e no ambiente (sem sintomas), e ainda, folhas sintomáticas foram coletadas, ao final de cada exposição, e processadas conforme descrito a seguir.

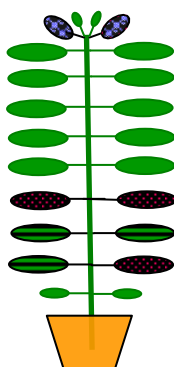


Figura 8. Representação que indica as folhas coletadas para as diferentes análises. ■ Folhas utilizadas para análises de ultraestrutura nas plantas expostas no ambiente e mantidas na casa de vegetação. ■ Folhas coletadas para estabelecimento de densidade estomática nas plantas expostas no ambiente e mantidas em casa de vegetação. ■ Folhas coletadas para as análises estruturais, acúmulo de H_2O_2 e testes para evidenciar compostos fenólicos nas plantas expostas no ambiente.

III.5. Análises em microscopia fotônica e eletrônica de transmissão

Para as análises estruturais, fragmentos da região mediana da folha foram fixados em solução de Karnovsky (1965). O material foi mantido sob vácuo por cerca de 30 minutos e permaneceu no fixador por 48 horas, após, foi lavado em solução tampão e armazenado em álcool a 70%. Foram realizados estudos em microscopia fotônica de material previamente incluído em glicol-metacrilato (GMA) (historesina marca Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. O material foi seccionado transversalmente em micrótomo rotativo (Olympus Cut 4055). Secções com cerca de 5 μm de espessura foram coradas com azul de toluidina 0,05 em tampão acetato 0,1M, pH 4,7 (O'Brien & McCully 1965) e analisadas ao microscópio Olympus BX41.

Para as análises ultraestruturais, as amostras fixadas em solução de Karnovsky (1965) foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas gradativamente em série acetônica, incluídas em Araldite e seccionadas em ultra-micrótomo (Leica UC6rt). Secções ultrafinas foram duplamente coradas com acetado de uranila a 2% por 15 minutos (Watson

1958) e citrato de chumbo por 15 minutos (Reynolds 1963) e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão modelo Philips CM 100. As análises ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica, UNESP-Botucatu, sob a supervisão da Dra Silvia Rodrigues Machado.

III.5.1. Densidade estomática

A análise da superfície paradérmica, em microscopia fotônica, foi realizada em material diafanizado (Arnott, 1959 *apud* Kraus e Arduin, 1997). Para tanto, fragmentos com cerca de 1 cm² do segundo nó – do ápice para a base (figura 8), fixados em Karnovsky (1965) foram clarificados, corados com azul de astra e safranina (9:1), submetidos à série alcoólica crescente e montados em resina sintética Permout[®].

A quantificação da densidade estomática foi realizada em área de 200 µm² com aumento de 400 vezes (n=30 por tratamento), utilizando-se microscópio equipado com sistema de captura de imagens e sistema semi-automático de medições, software Pro-Express versão 4.0.1, Media Cybernetics (figura 9). Realizou-se essa quantificação nas plantas que ficaram dentro da casa de vegetação, como material de referência, e nas plantas que ficaram expostas no ambiente em todas as estações, com exceção do outono, que teve somente as plantas do ambiente avaliadas quanto à densidade estomática devido à perda no material do tratamento de referência.

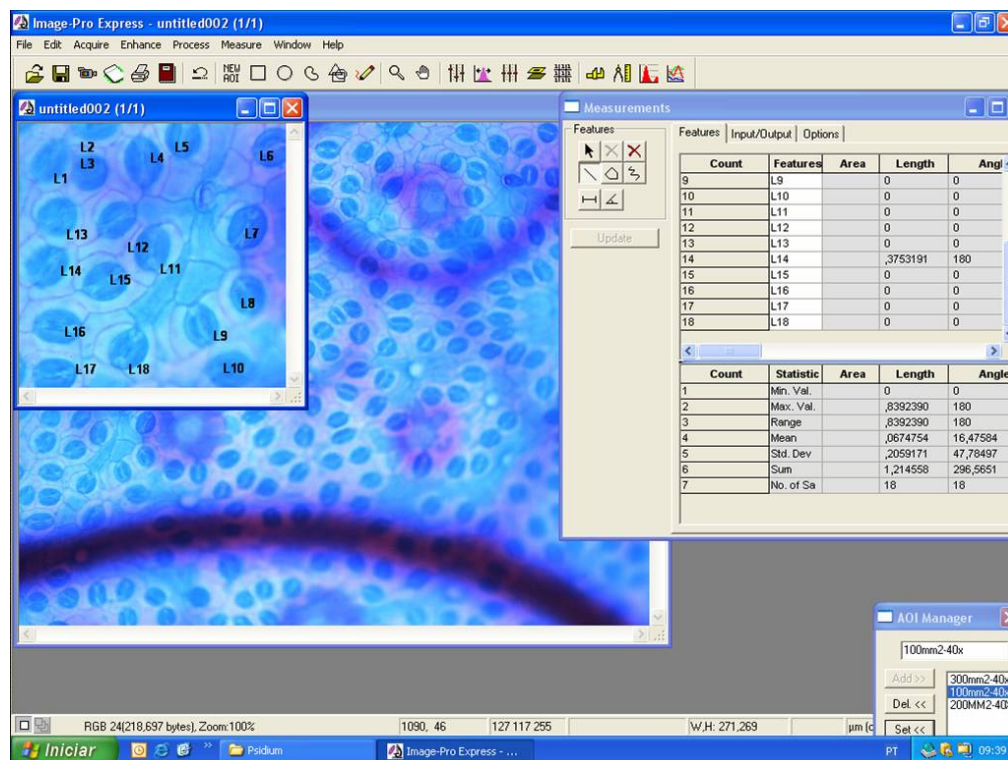


Figura 9. Imagem da tela do programa utilizado para determinação da densidade estomática empregando-se sistema de captura de imagens. (Pro – Express versão 4.0.1 – Media Cybernetics).

III.6. Testes histoquímicos

III.6.1. Avaliação de substâncias fenólicas

Todas as análises para a localização de compostos fenólicos foram realizadas em secções de material fresco, montadas em lâminas provisórias com glicerina, e observadas em MF.

A detecção e localização de células que apresentam antocianinas em seus vacúolos foram realizadas em secções de material a fresco, obtidas à mão-livre com o auxílio de lâmina de aço.

O teste de cloreto férrico foi realizado para destacar os compostos fenólicos em material fresco (Johansen 1940). A reação entre o cloreto férrico e o conteúdo fenólico celular resultou na coloração negro-azulada.

Os taninos condensados (leucoantocianinas e catequinas) foram evidenciados com o uso de vanilina ácida, sendo destacados em coloração vermelha (Gardner 1975).

Para os dois últimos testes descritos utilizaram-se amostras de folhas com e sem sintomas visíveis, a fim de avaliar quais tecidos acumulavam compostos fenólicos.

III.6.2. Localização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Quatro fragmentos de folhas frescas com cerca de 1 cm^2 , do segundo e terceiro nós – da base para o ápice (figura 8), sendo dois para observações da superfície adaxial e dois da abaxial, foram imersos em solução contendo 1 mg mL^{-1} de 3,3'-diaminobenzidina (DAB)-HCl, (pH 5,6 ajustado com hidróxido de sódio); estes foram incubados em câmara escura por oito horas. Em seguida, os fragmentos foram clarificados em álcool a 95% (Faoro *et al.* 2001) e montados em glicerina 50%. As células que apresentaram acúmulo de peróxido de hidrogênio adquiriram a coloração marrom. Como controle negativo acrescentou-se 10 mM de ácido ascórbico à solução de DAB e não foram observadas células coradas em marrom.

Para o estabelecimento de correlações entre o acúmulo de H_2O_2 e parâmetros ambientais, quantificou-se esse acúmulo. Avaliaram-se, em toda a área dos fragmentos, o número de células epidérmicas que apresentaram a coloração marrom característica. Tal quantificação foi possível apenas na superfície adaxial da folha, enquanto que na superfície abaxial, devido ao acúmulo estar registrado apenas nos ostíolos e não ser muito evidente, foi quantificado apenas o número de plantas, dentre as seis amostradas.

III.7. Sintomas foliares visíveis

Os sintomas visíveis em decorrência da exposição ao O_3 , foram avaliados por Pina (2010) no âmbito do Projeto Bioindicadores (FAPESP), no qual este estudo está inserido. Para isso, foram calculadas a incidência (n° de plantas com sintomas visíveis/ n° total de plantas X 100), a severidade pela porcentagem da área foliar ocupada pelas classes de danos: 1 – folhas com 0 a 5% de sintomas visíveis; 2 – folhas com 6 a 25% de sintomas visíveis; 3 – folhas com 26 a 50% de sintomas visíveis; 4 – folhas com 51 a 75% de sintomas visíveis; 5 –

folhas com mais de 75% de sintomas visíveis. Essas cinco classes foram utilizadas para o cálculo do Índice de Injúria Foliar:

$$IIF = \frac{(N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4) + (N5 \times 5)}{(N1 + N2 + N3 + N4 + N5) \times 5} \times 100$$

onde, N1, N2, N3, N4, N5 são, respectivamente, o número de folhas nas classes 1, 2, 3, 4, e 5 de sintomas visíveis (El-Khatib 2003).

III.8. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, que relacionaram o acúmulo de H₂O₂ com os dados ambientais e densidade estomática com a concentração de O₃, foi utilizado o método de correlação de Pearson. A comparação entre a densidade estomática das plantas mantidas em casa vegetação e expostas no ambiente foram feitas por análise de variância (Anova on Ranks). Em todos os casos, as análises de variância, quando indicaram diferenças significativas com $p \leq 0,05$, foram seguidas por testes de comparação múltipla (Kruskal-Wallis).

IV. RESULTADOS

IV.1. Caracterização do ambiente de estudo

Os valores médios de temperatura durante todo o período de exposição (tabela 1), que abrangeu as quatro estações do ano, estão indicados na figura 10. Comparando-se as quatro estações estudadas, foram observados maiores valores médios de temperatura no verão (25,8°C). Porém, no início da primavera notaram-se valores mais altos do que os encontrados no início do verão. No início do outono foram registrados valores próximos aos da primavera e verão (21°C, 22°C e 18°C, respectivamente), apresentando declínio a partir da metade do período de exposição, atingindo valores comparáveis aos do inverno, que conforme esperado, apresentou as menores temperaturas (14,3°C) entre as quatro estações, variando pouco no decorrer de todo o período (figura 10).

As médias dos valores de umidade relativa do ar (figura 11), foram calculadas para o período que abrangeu o início da exposição das mudas até a respectiva coleta, conforme indicado na tabela 1. As quatro estações apresentaram valores aproximados, com média próxima a 80%. No entanto, durante o verão houve uma redução acentuada chegando à média de 16% aproximadamente.

Os maiores valores de radiação (MJ m^{-2}) ocorreram no verão, seguidos do inverno e outono (figura 12). Os dados de temperatura, umidade e radiação foram fornecidos pelo IAG.

Comparando-se as estações observa-se que o inverno, apesar de apresentar temperaturas mais baixas, teve radiação mais alta que o outono.

Com relação aos poluentes aéreos, os óxidos de nitrogênio (NO_x), que reúnem o NO_2 e o NO , apresentaram maiores concentrações durante o inverno, com médias que atingiram 78,81 ppb. O outono apresentou valores médios relativamente altos (média máxima = 50,38 ppb) em comparação aos da primavera e do verão, quando as concentrações desses poluentes foram baixas (médias máximas = 15,29 ppb e 15,8 ppb, respectivamente) (figura 13).

A AOT40, que se refere à soma do valor excedente a 40 ppb de O_3 acumulado desde o início da exposição até a data de coleta, pode ser visualizada na figura 14. Esses dados mostram que o inverno foi a estação com maiores valores de O_3 , com um aumento a partir da metade da exposição, exatamente no período que abrangeu a sexta coleta, os valores médios de AOT40 passaram de 233,3 para 661,3 ppb. No outono, obteve-se o segundo maior valor de AOT40, com valores médios de 658 ppb ao final da exposição. Durante a primavera os valores de AOT40 alcançaram 674 ppb, e no verão foram registrados valores médios de 360 ppb.

Os dados brutos relativos aos fatores abióticos são apresentados no Anexo I.

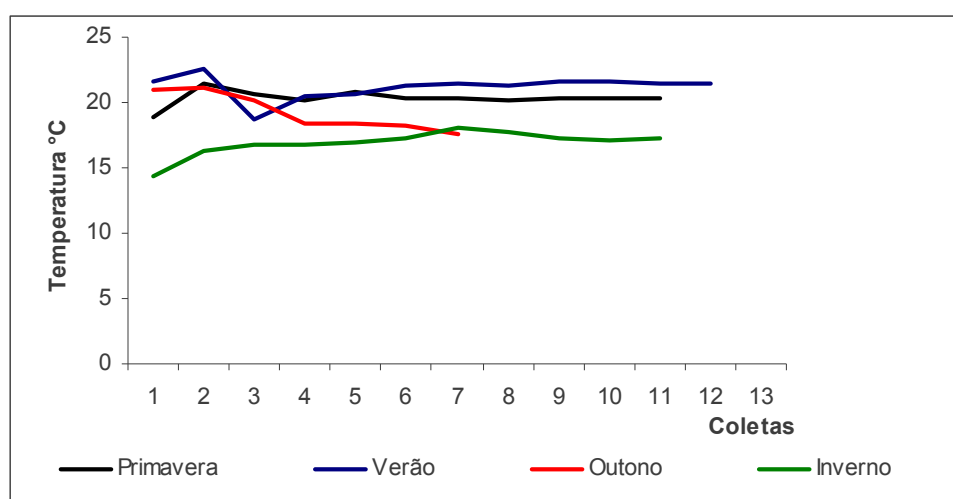


Figura 10. Médias de temperaturas (°C) das quatro estações ao longo de todo o período de exposição das plantas (IAG - USP).

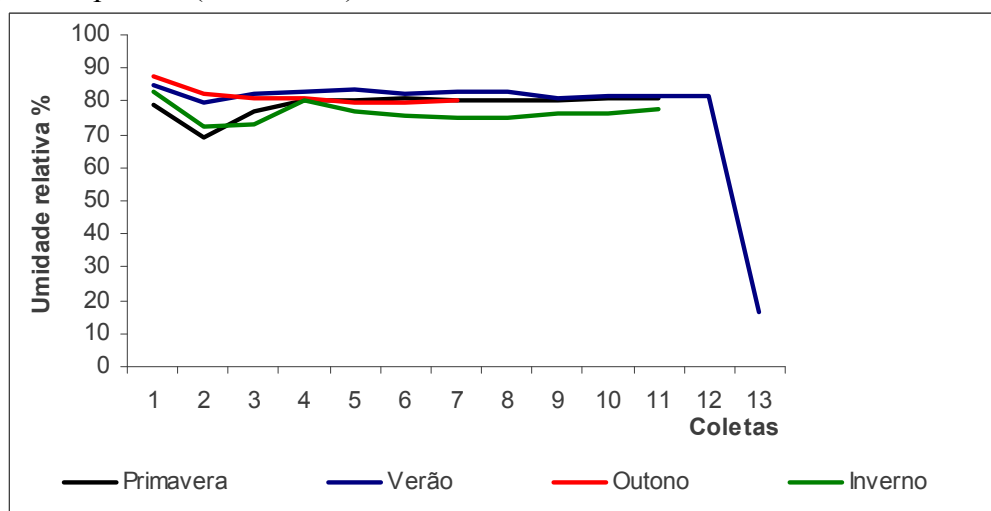
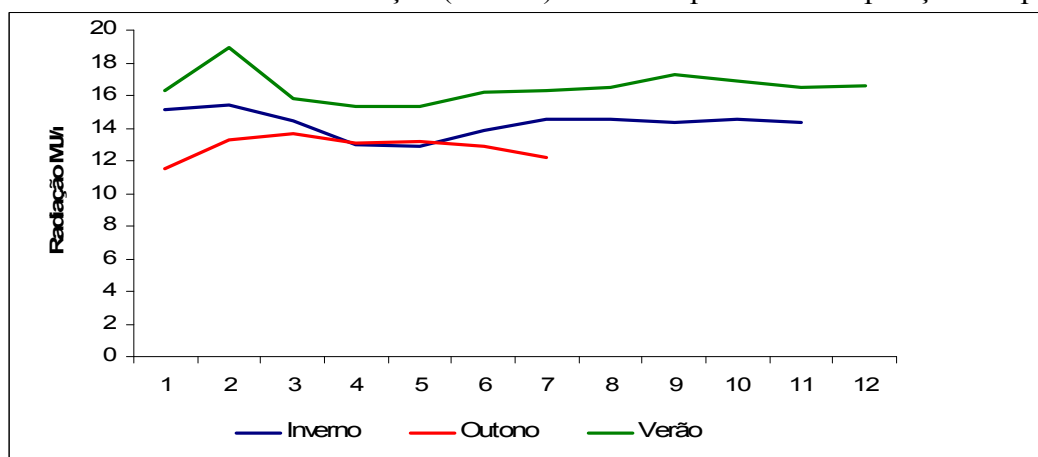


Figura 11. Valores médios de umidade relativa do ar (%) durante o período de exposição das plantas nas quatro estações (IAG-USP).

Figura 12. Valores médios de radiação (MJ m^{-2}) durante o período de exposição das plantas



nas quatro estações (IAG-USP).

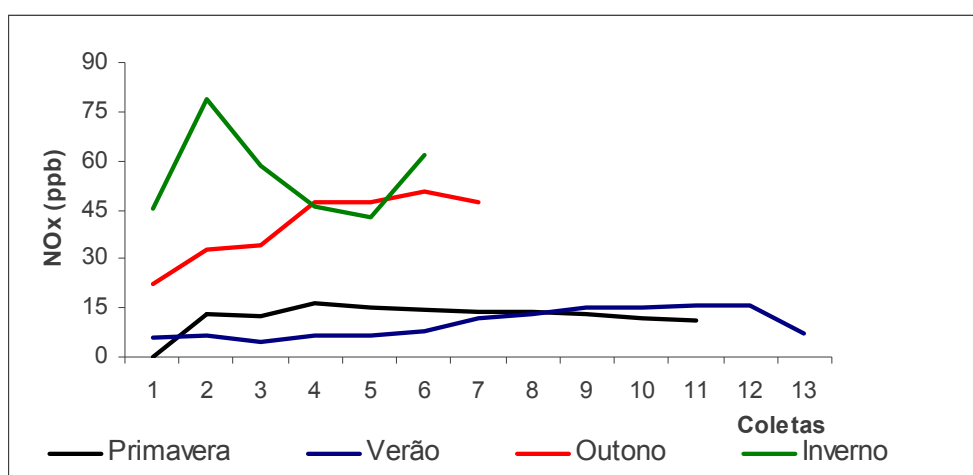


Figura 13. Valores médios de NOx (ppb) durante o período de exposição das plantas nas quatro estações (Projeto Bioindicadores FAPESP).

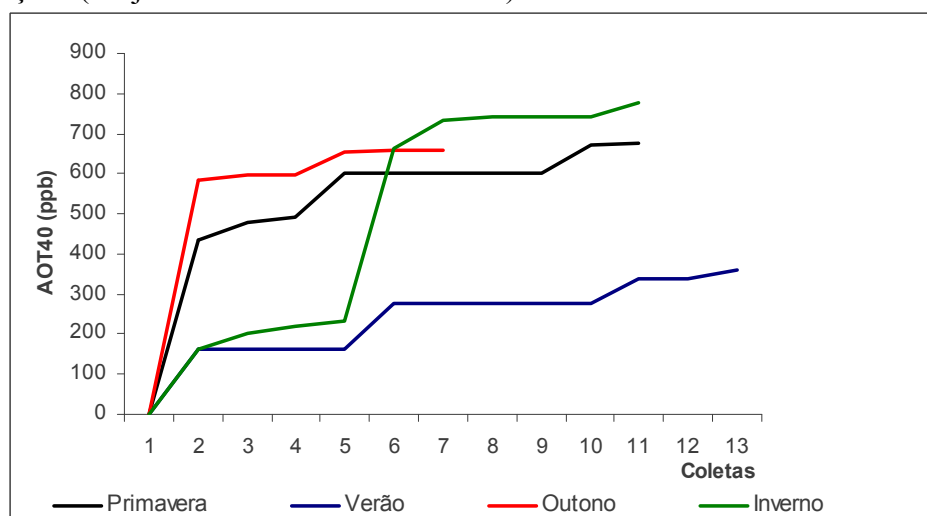


Figura 14. Valores de AOT40 (ppb) durante o período de exposição das plantas nas quatro estações (Projeto Bioindicadores FAPESP).

IV.2. Anatomia foliar de *Psidium guajava* ‘Paluma’

A espécie, já descrita anatomicamente por Sousa (1971), apresenta folhas hipoestomáticas e estômatos do tipo paracítico (figura 15); em vista frontal, as células epidérmicas são poliédricas, sendo que aquelas que recobrem as nervuras apresentam-se alongadas. Glândulas secretoras são observadas nas superfícies abaxial e adaxial da folha (figura 16), distribuindo-se entre as células do parênquima clorofiliano. Em secção transversal, abaixo da epiderme, na superfície adaxial da folha, observam-se duas a três camadas que constituem uma hipoderme, onde estão presentes idioblastos com cristais do tipo drusa. O mesofilo é formado de parênquima paliçádico com células altas, quando próximas da epiderme da superfície adaxial, diminuindo de altura à medida que se aproximam da epiderme da superfície abaxial (figura 17 e 18); todas as células parenquimáticas apresentam grande quantidade de cloroplastos.

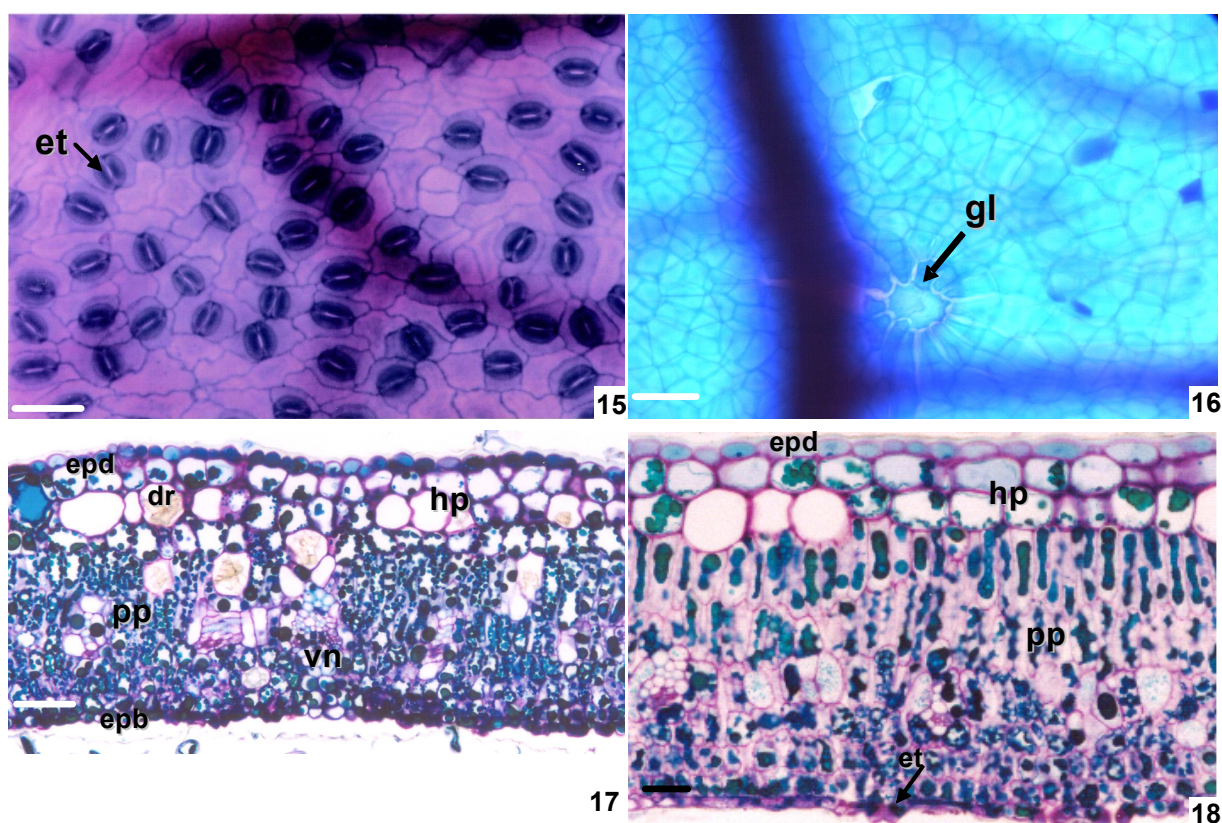


Figura 15-18. Fotomicrografias de folhas de *Psidium guajava* ‘Paluma’. 15. Secção paradérmicas. 15. Superfície abaxial. 16. Superfície adaxial. 17-18. Secções transversais, mostrando os tecidos foliares. dr – drusa, epb – epiderme abaxial, epd – epiderme adaxial, et – estômatos, gl – glândula (seta), hp – hipoderme, pp - parênquima paliçádico, vn – vênula. Barra = 50 µm.

IV. 3. Compostos fenólicos

IV.3.1. Acúmulo de antocianina

Os sintomas visíveis observados na espécie estudada decorrem do acúmulo de antocianina entre as nervuras e somente na superfície adaxial (figuras 19-21), estes foram quantificados quanto aos graus de incidência, severidade e índice de injúria foliar (IIF) (tabela 2).

Tabela 2. Valores de incidência (%), severidade (%) e índice de injúria foliar (IIF %) ao final de cada estação amostrada, em mudas de *Psidium guajava* ‘Paluma’ (dados Projeto Bioindicadores - FAPESP).

	Incidência	Severidade	IIF
Primavera	100,00	20,16	8,70
Verão	100,00	11,18	4,00
Outono	16,60	9,50	2,85
Inverno	100,00	13,01	5,04

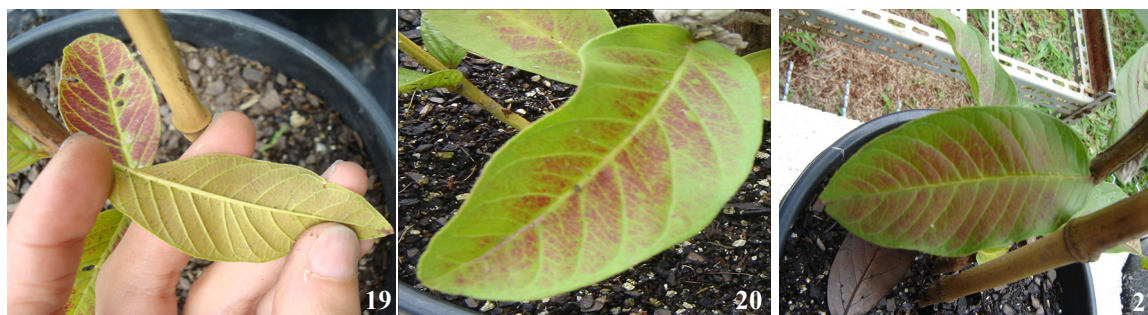
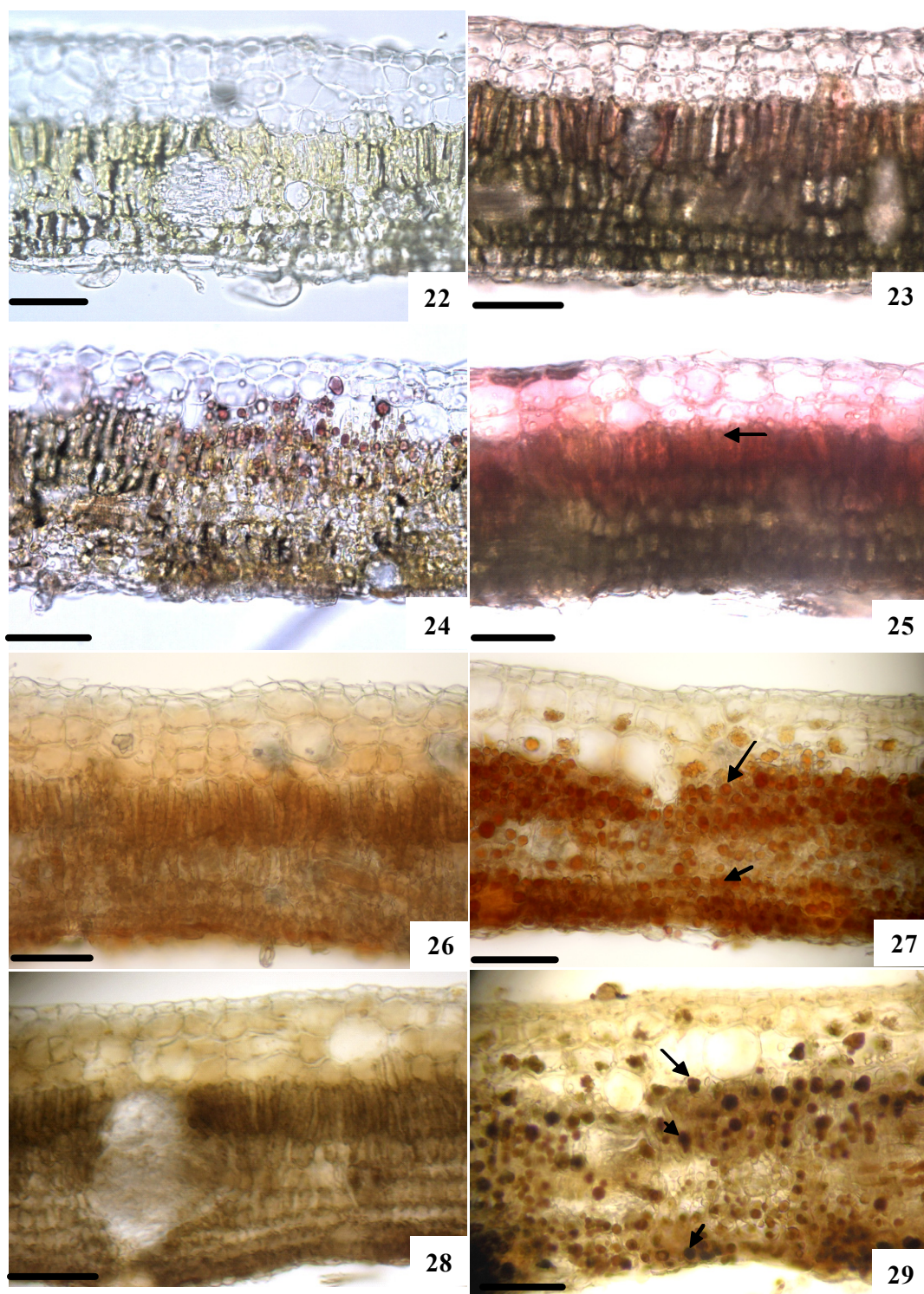


Figura 19-21. Folhas de *Psidium guajava* ‘Paluma’ com sintomas visíveis causados pelo O₃. 19. Imagem mostrando a ausência de sintomas na superfície abaxial da folha. 20 e 21. Sintomas visíveis decorrentes do acúmulo de antocianina na região intervenal da superfície adaxial da folha. Fonte: J. M. Pina e R. M. Moraes.

Folhas assintomáticas (figura 22) apresentaram diferenças em seus conteúdos celulares quando comparadas com folhas sintomáticas (figuras 23-25), que apresentaram antocianina nos vacúolos das células da epiderme da superfície adaxial, hipoderme e, quando o sintoma foi mais intenso, em até três camadas no parênquima paliçádico (figura 25).

IV.3.2. Testes histoquímicos para localização de fenóis

Os testes histoquímicos com vanilina ácida (figuras 26 e 27) e cloreto férrico (figuras 28 e 29) que evidenciam conteúdo fenólico presente nas células foram realizados em material fresco assintomático (figuras 26 e 28) e sintomático (figuras 27 e 29). Os resultados mostraram a existência desses compostos, tanto em folhas assintomáticas como em sintomáticas, destacados em vermelho intenso para o teste de vanilina ácida e negro-azulado para o teste de cloreto férrico. Contudo com o surgimento dos sintomas, a ocorrência de substâncias fenólicas aumentou visivelmente, conforme esperado. Por meio destes testes histoquímicos específicos para compostos fenólicos foi possível observar acúmulo dessas substâncias nas camadas mais inferiores do parênquima paliçádico e ainda na epiderme abaxial (figuras 27 e 29). Nas folhas sintomáticas, os dois testes aplicados mostraram que o conteúdo apresentou aspecto condensado.



Figuras 22-29. Secção transversal de folhas de *P. guajava* 'Paluma'. 22, 26 e 28. Folhas assintomáticas. 23, 24, 25, 27 e 29. Folhas sintomáticas. 22-25. Secções de material fresco ao natural para localização de antocianina. 26-27. Teste histoquímico com vanilina ácida. 28-29. Teste histoquímico com cloreto férrico. Barras = 50 µm.

IV.4. Acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

As figuras 30 a 36 indicam a presença de H_2O_2 nas duas superfícies da folha de *P. guajava* 'Paluma'. Esse acúmulo foi registrado nas quatro estações.

O número de plantas (n=6) por coleta e o número de células da superfície adaxial que apresentaram acúmulo H_2O_2 de são indicados na tabela 3. Esses valores foram utilizados para realizar a correlação de Pearson com os fatores abióticos.

As plantas expostas no inverno mostraram correlação positiva regular ($r = 0,437$ e $p = 0,0357$) entre o acúmulo de H_2O_2 nas células epidérmicas da superfície abaxial e maiores concentrações de O_3 . A correlação foi forte ($r = 0,635$ e $p = 0,0124$) quando se compararam os valores médios das concentrações de O_3 do período do dia com presença de luz (das 8h às 17h). No verão e outono, a relação entre o acúmulo de H_2O_2 e concentrações médias de O_3 foi negativa ($r = -0,697$ e $p = 0,0118$; $r = -0,793$ e $p = 0,0332$, respectivamente), indicando que quando as concentrações de O_3 foram baixas, poucas células apresentaram acúmulo de H_2O_2 (tabela 4). Não foram encontradas correlações entre o acúmulo de H_2O_2 e a AOT40.

No inverno, obteve-se correlação positiva forte ($r = 0,978$ e $p = 0,000705$) entre o número de plantas que apresentaram acúmulo de H_2O_2 e a concentração de NO_x (tabela 4).

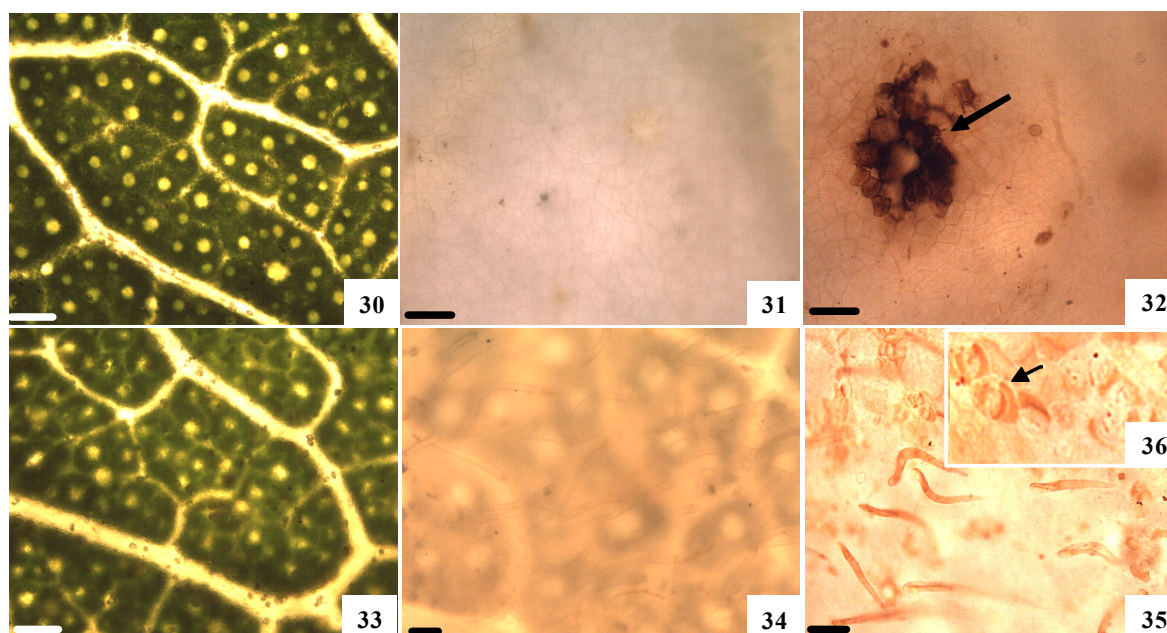
Os fatores meteorológicos, como a temperatura do verão e do outono e a radiação no verão, mostraram correlação negativa com acúmulo de H_2O_2 . A umidade relativa não mostrou nenhuma correlação (tabela 4).

O acúmulo de H_2O_2 também foi avaliado quanto à sua localização nas células epidérmicas das duas superfícies (figuras 30-36). Nas células epidérmicas da superfície adaxial, o acúmulo de H_2O_2 foi observado, quando em menor quantidade, nas paredes celulares. No entanto, quando o acúmulo foi mais intenso notou-se a marcação em todo o conteúdo citoplasmático, indicando aumento da intensidade do estresse (figura 32).

Geralmente a localização ocorreu em grupos com número variado de células

epidérmicas. Nas células epidérmicas da superfície abaxial o acúmulo de H_2O_2 foi encontrado principalmente nas paredes das células estomáticas (figuras 35 e 36).

Na primavera não houve correlação com nenhum dos fatores ambientais considerados.



Figuras 30-36. Fotomicrografias da superfície paradérmica de folhas de *Psidium guajava* 'Paluma'. 30-32. Células epidérmicas da superfície adaxial. 30. Tratamento branco. 31. Tratamento controle com acréscimo de ácido ascórbico ao DAB. 32. Tratamento com DAB mostrando células com acúmulo de H_2O_2 . 33 - 36. Células epidérmicas da superfície abaxial. 33. Tratamento branco. 34. Tratamento controle com acréscimo de ácido ascórbico ao DAB. 35-36. Tratamento com DAB mostrando células com acúmulo de H_2O_2 . 36. Células estomáticas com acúmulo de H_2O_2 (seta). Barras = 50 μm .

Tabela 3. Número de plantas por coleta e número de células epidérmicas da superfície adaxial que apresentaram acúmulo de peróxido de hidrogênio.

Primavera 2007			Verão 2008			Outono 2008			Inverno 2008		
Data	Plantas	Total de células	Data	Plantas	Total de células	Data	Plantas	Total de células	Data	Plantas	Total de células
8/10/2007	0	0	14/1/2008	0	0	8/4/2008	1	113	14/7/2008	0	0
12/10/2007	0	103	19/1/2008	3	63	19/4/2008	0	0	26/7/2008	6	106
20/10/2007	0	256	25/1/2008	5	314	17/5/2008	4	54	5/8/2008	5	182
27/10/2007	0	0	2/2/2008	4	429	31/5/2008	4	0	13/8/2008	6	256
10/11/2007	5	0	9/2/2008	6	270	7/6/2008	4	82	16/8/2008	5	0
22/11/2007	0	0	16/2/2008	5	34	21/6/2008	3	34	30/8/2008	6	14
24/11/2007	1	29	23/2/2008	6	197	28/6/2008	5	55	6/9/2008	3	0
1/12/2007	2	0	1/3/2008	6	43				13/9/2008	6	0
8/12/2007	3	37	8/3/2008	6	40				20/9/2008	3	0
15/12/2007	1	222	15/3/2008	4	31				27/9/2008	4	60
22/12/2007	6	139	22/3/2008	6	0				8/10/2008	3	43

Plantas = número total de indivíduos com acúmulo de H_2O_2 nas células epidérmicas da superfície abaxial; Total de células = total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H_2O_2 .

Tabela 4. Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e grau de significância (p) entre o acúmulo de H₂O₂ [células epidérmicas da superfície adaxial (Ada md e Ada tot), células epidérmicas da superfície abaxial (Aba tot)] e fatores abióticos [concentrações de poluentes (ppb) e fatores meteorológicos].

Acúmulo de H ₂ O ₂			Poluentes					Fatores meteorológicos			
Verão 2008		O ₃ md	O ₃ HL md	NO max	NO ₂ max	NO _x max	O ₃ HL max	AOT40	T md	U md	Rad md
Aba tot	r	-	-	0,755	-	0,619	-	-	-	-	-
	p	-	-	0,00283	-	0,0241	-	-	-	-	-
Ada md	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,584
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,046
Ada tot	r	-0,697	-	-	-	-	-	-	-0,704	-	-0,584
	p	0,0118	-	-	-	-	-	-	0,0105	-	0,046
Outono 2008		O ₃ md	O ₃ HL md	NO max	NO ₂ max	NO _x max	O ₃ HL max	AOT40	T md	U md	Rad md
Aba tot	r	-	-	-	-	-	-	-	-0,824	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	0,0226	-	-
Ada md	r	-0,793	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	0,0332	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ada tot	r	-0,793	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	0,0332	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inverno 2008		O ₃ md	O ₃ HL md	NO max	NO ₂ max	NO _x max	O ₃ HL max	AOT40	T md	U md	Rad md
Aba tot	r	0,437	0,635	0,721	0,978	0,71	-	-	-	-	-
	p	0,0357	0,0124	0,000734	0,000705	0,0143	-	-	-	-	-
Ada md	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ada tot	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Aba tot = número total de plantas com acúmulo de H₂O₂ nas células epidérmicas da superfície abaxial; Ada md = média do total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H₂O₂; Ada tot = total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H₂O₂; O₃ md = média de ozônio ao longo dos dias de exposição; O₃ md = média de ozônio em horas com luz; NO max = valores máximos de óxido nítrico; NO₂ max = valores máximos de dióxido de nitrogênio; O₃ HL max = valores máximos de ozônio em horas com luz; AOT40 = valores de acumulados de ozônio com ultrapassagens de 40 ppb; T md = média de temperatura (°C); U md = média de umidade (%); Rad md = média de radiação (MJ m⁻²).

(-) Não significativo.

IV.5. Densidade estomática

Na figura 37 indicam-se os valores de densidade estomática das folhas do segundo nó (figura 8) que se expandiram no ambiente e em casa de vegetação, nas diferentes estações do ano.

Os resultados obtidos, comparados por análise de variância (Anova on Ranks - Kruskal Wallis), mostraram que as plantas que permaneceram no ambiente durante o inverno apresentaram os maiores valores de densidade estomática, diferindo significativamente das plantas da mesma estação que foram mantidas em casa de vegetação e daquelas mantidas no ambiente nas demais estações, que não diferiram entre si. Na primavera, as plantas expostas no ambiente não diferiram estatisticamente daquelas mantidas em casa de vegetação, enquanto que naquelas expostas no verão foi observada tal variação, sendo que nas do ambiente a densidade foi maior. As plantas do outono, que permaneceram na casa de vegetação, não puderam ser analisadas quanto à densidade estomática, uma vez que apresentaram contaminação por fungos.

Nas plantas do ambiente, buscou-se correlacionar a densidade estomática com a concentração de O_3 , obtendo-se pelo método de Pearson uma correlação regular positiva com $r = 0,579$ e significativa $p = 0,00279$ em todas as estações.

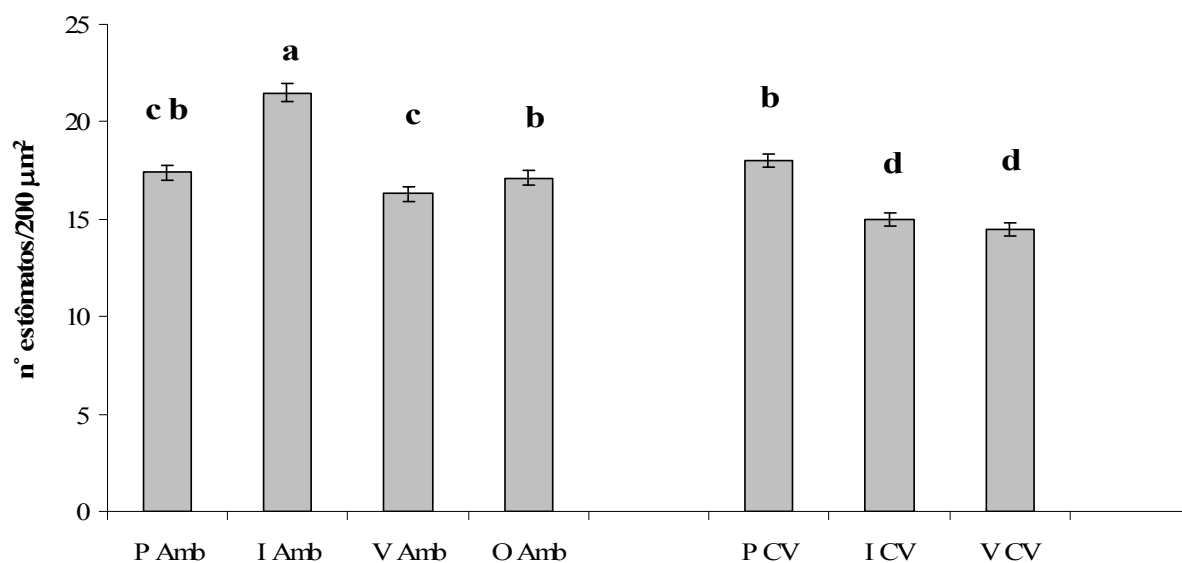


Figura 37. Valores comparativos de densidade estomática entre plantas em casa de vegetação e ambiente. P Amb – Plantas expostas no ambiente durante a primavera. I Amb - Plantas expostas no ambiente durante o inverno. V Amb - Plantas expostas no ambiente durante o verão. O Amb - Plantas expostas no ambiente durante o outono. P CV – Plantas mantidas em casa de vegetação durante a primavera. I CV - Plantas mantidas em casa de vegetação durante o inverno. V CV - Plantas mantidas em casa de vegetação durante o verão.

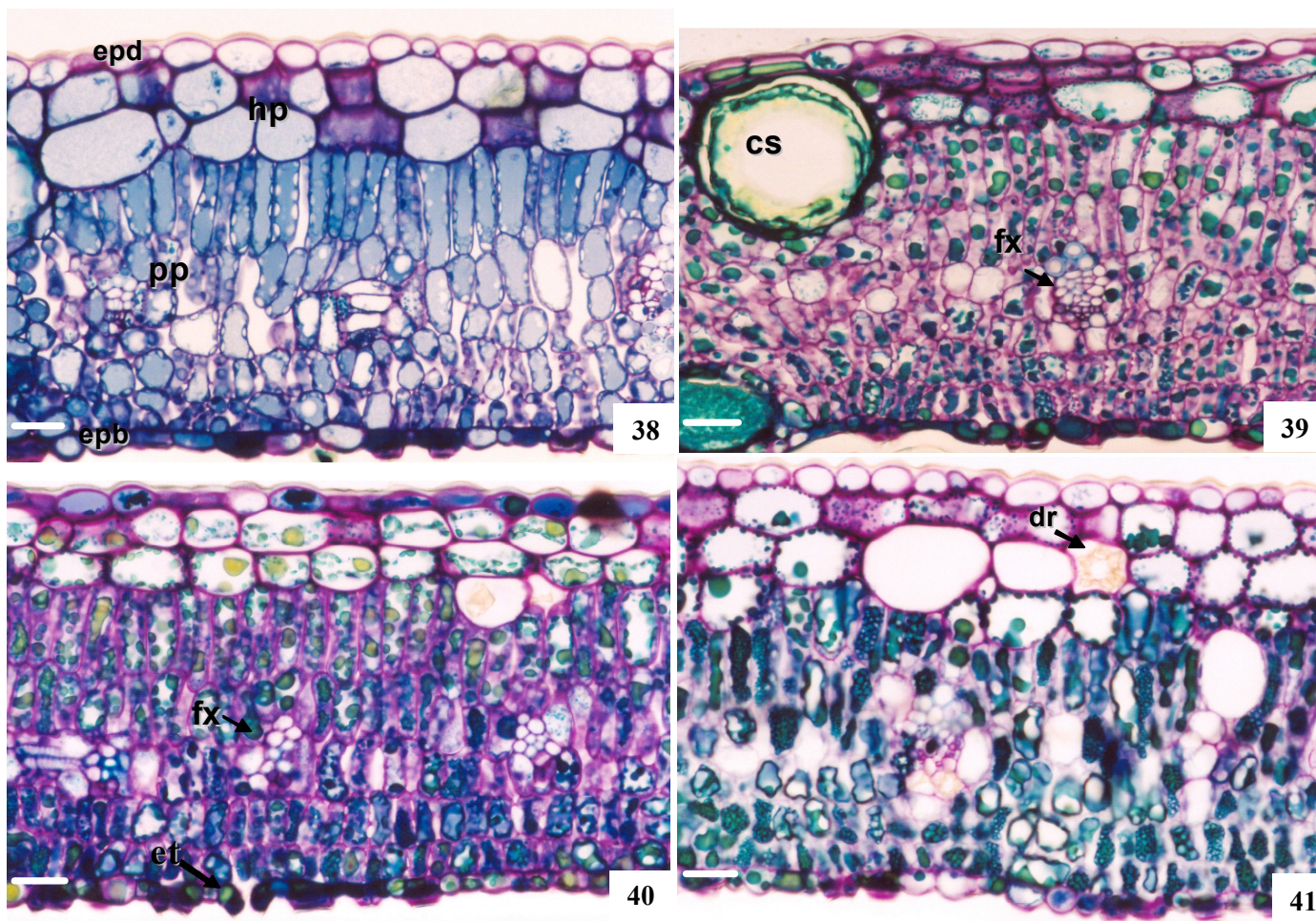
IV.6. Análises estruturais

As alterações estruturais encontradas variaram entre os tecidos onde ocorreram (figuras 38-41). Na epiderme observaram-se poucas alterações, sendo estas, relacionadas ao aumento de conteúdo fenólico nas células deste tecido. Na hipoderme (figuras 42-45) a alteração mais marcante foi a mudança no conteúdo citoplasmático decorrente do aumento de conteúdo fenólico no vacúolo (figura 43), chegando a ocupar grande parte ou até todo o volume do protoplasto (figura 44). No mesmo tecido foi possível observar a invaginação da membrana plasmática em folhas sintomáticas (figura 45).

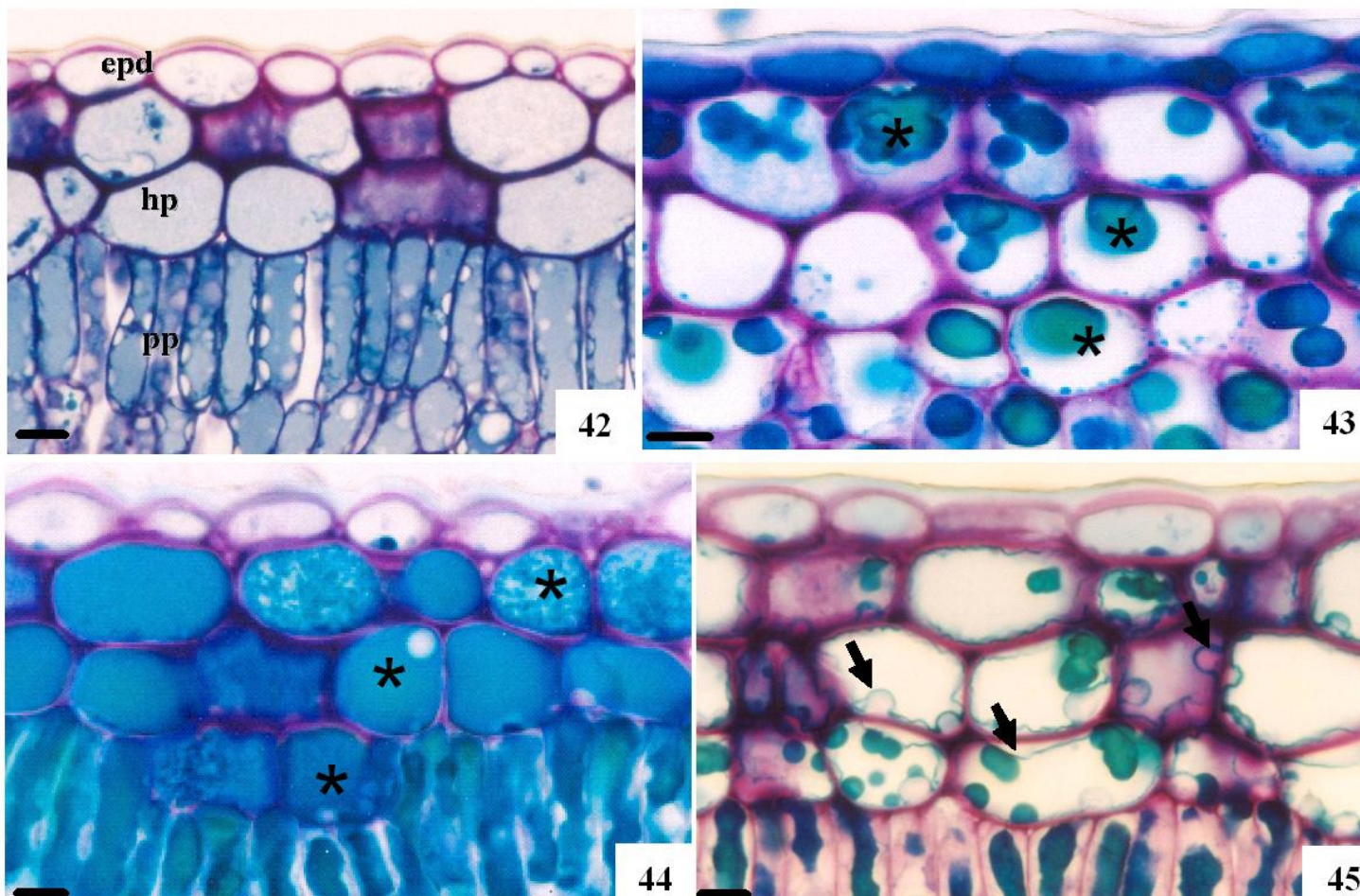
No parênquima paliádico (figuras 46-49) houve um marcante aumento no conteúdo de substâncias fenólicas, em todas as camadas desse tecido (figuras 47-49). Observou-se também a redução na visualização dos cloroplastos ao longo do tempo de exposição (figura 49). Em algumas células observou-se alteração da parede celular (figura 47) e condensação do conteúdo citoplasmático (figura 48).

Nas camadas inferiores do parênquima paliçádico, notou-se grande sinuosidade das paredes celulares (figuras 50-53), principalmente nas células adjacentes às câmaras subestomáticas (figuras 52 e 53). Algumas destas apresentaram crescimento intrusivo em direção ao poro estomático promovendo a obliteração da câmara subestomática (figuras 54-57).

Na superfície abaxial as células epidérmicas apresentaram aumento no conteúdo de substâncias fenólicas, especialmente nas células subsidiárias (figuras 50-53).



Figuras 38-41. Vista geral de secções transversais de folhas de *Psidium guajava* ‘Paluma’. 38. Assintomática (tempo zero). 39. Assintomática mantida no ambiente. 40. Início do aparecimento dos sintomas visíveis. 41. Folha sintomática. dr – drusa. cs – cavidade secretora. epd – epiderme adaxial. et – estômato. Fx – feixe vascular. hp – hipoderme. pp – parênquima paliçádico. Barras = 50 µm.



Figuras 42-45. Detalhe da hipoderme em secções transversais de folhas de *Psidium guajava* 'Paluma'. 42. Assintomática (tempo zero). 43. Assintomática mantida no ambiente. 44. Início do aparecimento dos sintomas visíveis. 45. Folha sintomática. (*) – Conteúdo fenólico. Setas – Invaginação da membrana plasmática. epd – epiderme adaxial. hp – hipoderme. pp – parênquima paliçádico. Barras = 20 µm.

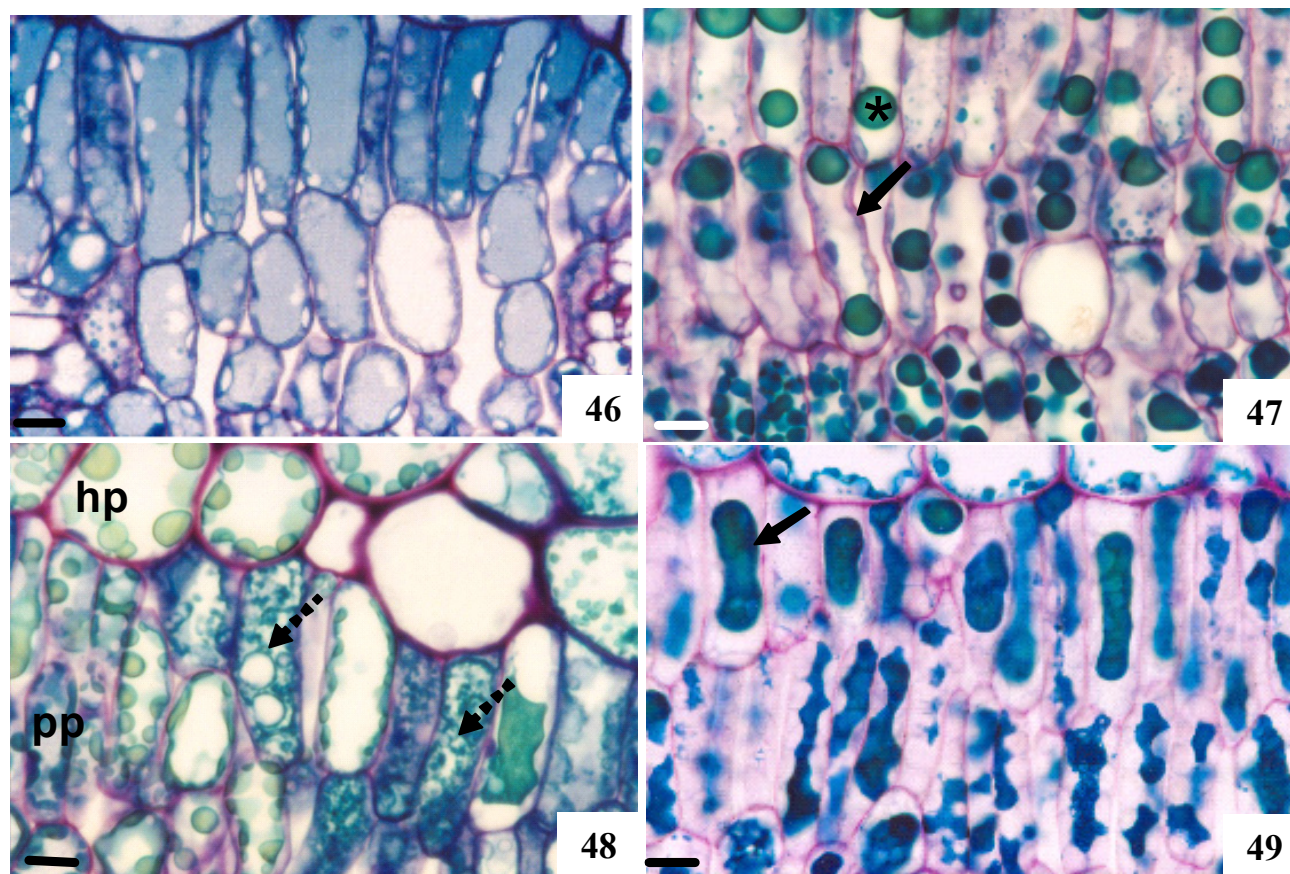
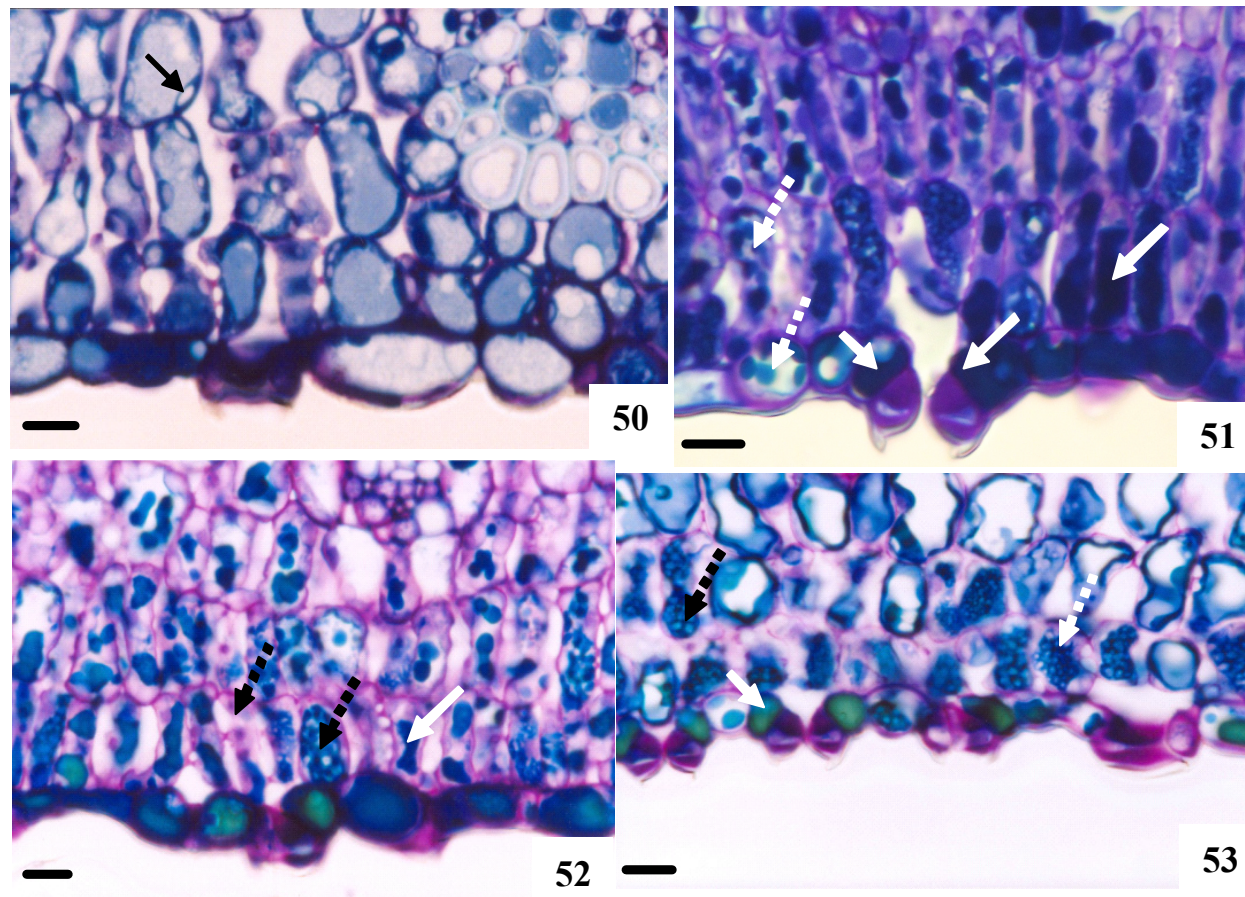
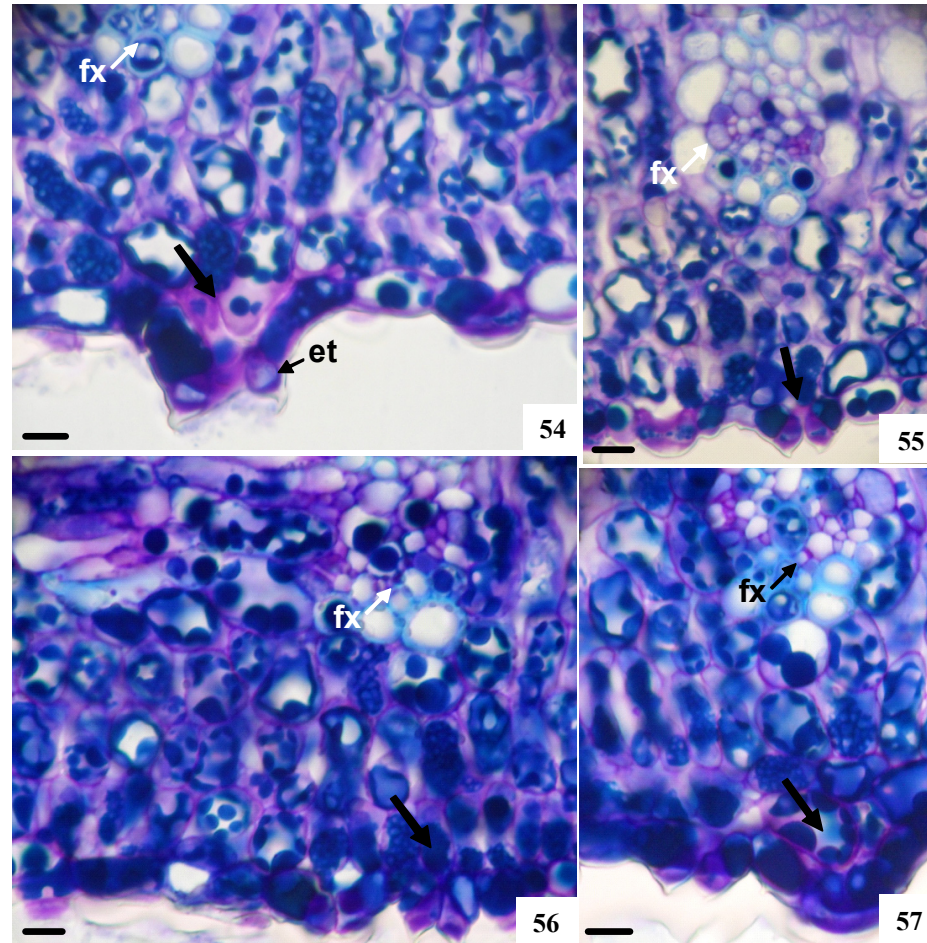


Figura 46-49. Detalhe das camadas superiores do parênquima paliçádico em secções transversais de folhas de *Psidium guajava* 'Paluma'. 46. Assintomática (tempo zero). 47. Assintomática mantida no ambiente. 48. Início do aparecimento dos sintomas visíveis. 49. Folha sintomática. hp – hipoderme. pp – parênquima paliçádico. Asterisco – conteúdo fenólico. Setas pontilhadas – compostos fenólicos associados à degradação do conteúdo celular. Setas cheias – alterações na parede celular. Barras = 20 μ m.



Figuras 50-53. Camadas inferiores do parênquima paliçádico em secções transversais de folhas de *Psidium guajava* 'Paluma'. 50. Assintomática (tempo zero). 51. Assintomática mantida no ambiente. 52. Início do aparecimento dos sintomas visíveis. 53. Folha sintomática. Seta cheia preta – cloroplasto. Setas cheias brancas – Acúmulo de substâncias fenólicas nas células subsidiárias. Setas pontilhadas – Compostos fenólicos com aspecto condensado. Barras = 20 μm .



Figuras 54-57. Secções transversais de folhas de *P. guajava* 'Paluma'. Setas indicam células do parênquima paliçádico com crescimento em direção ao poro estomático, resultando na oclusão na câmara subestomática (setas). et. estômato. fx. feixe vascular. A posição do feixe vascular indica que se trata do mesmo estômato visualizado em secções diferentes. Barras = 20 µm.

IV.7. Análises ultraestruturais

Muitas das alterações observadas em MF também foram visualizadas e confirmadas em MET, permitindo maior detalhamento dos efeitos do estresse oxidativo causado pelo O₃. As análises em MET mostraram que folhas de *P. guajava* ‘Paluma’ com e sem sintomas visíveis, expostas no ambiente em diferentes estações do ano, apresentaram alterações ultraestruturais especialmente na parede celular e nas organelas.

Plantas sintomáticas e assintomáticas expostas no ambiente apresentaram células com sinuosidade acentuada na parede, degradação do conteúdo citoplasmático e acúmulo de compostos fenólicos como observado em MF (figuras 46-53). Ao MET foi possível observar sinuosidade mais intensa de parede em células do parênquima paliçádico, nas camadas superiores, próximas à hipoderme. Esse sintoma causou o espaçamento entre as células vizinhas, gerando aumento dos espaços intercelulares (figuras 58-59).

No mesofilo das folhas de plantas mantidas em casa de vegetação (material de referência), notou-se integridade da parede das células epidérmicas, hipodérmicas e parenquimáticas (figuras 60-62). Ao longo da exposição, observou-se separação das células, também contribuindo para o aumento dos espaços intercelulares (figuras 63-66). Tal separação pode ser decorrente da degradação da lamela média e da parede celular observada em células do parênquima paliçádico de todas as camadas. Um indicativo de que a lamela média pode ter apresentado degeneração são os restos celulares observados nas figuras 64 e 65.

O aparecimento de projeções na parede celular ocorreu em plantas expostas no ambiente, com e sem sintomas visíveis (figuras 67-74). Projeções menos eletrodensas foram vistas somente em folhas assintomáticas (figura 67-68). As projeções foram mais eletrodensas e evidentes nas folhas sintomáticas (figuras 69-72).

Em folhas sintomáticas foi observada oclusão da câmara subestomática devido ao crescimento intrusivo de células parenquimáticas, também visto em MF (figuras 54-57). Na

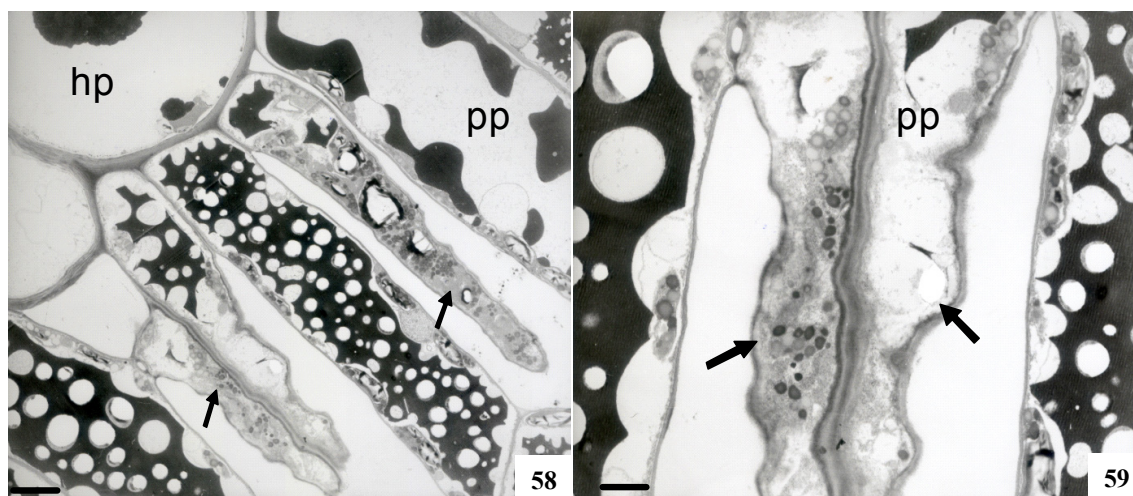
figura 75 pode ser observado o espaço da cavidade subestomática de um estômato com aspecto saudável, seccionado longitudinalmente. As figuras 76-78 mostram aspectos diferentes da cavidade subestomática, destacando o processo de obstrução da mesma. Em folhas mantidas no ambiente, com o decorrer da exposição, observou-se aumento crescente de compostos eletrodensos (fenólicos) presentes em todos os tecidos, com maior evidência no parênquima paliçádico, conforme mostrado em MF (figuras 38-41 e 46-49) e confirmado em MET pela presença de conteúdo eletrodenso (figuras 80-84). Tanto em folhas sintomáticas como assintomáticas, observou-se acúmulo de substâncias fenólicas em células guardas e companheiras, principalmente nas últimas (figura 84).

Os cloroplastos de folhas que ficaram expostas no ambiente apresentaram alterações na estrutura dos tilacóides em comparação com folhas de plantas mantidas em casa de vegetação (figuras 85-90). Foi observado nas quatro estações, em plantas com e sem sintomas visíveis, a degradação dessas membranas causando um aspecto de desorganização, onde é possível perceber maior espaçamento entre os tilacóides. Ainda nos cloroplastos, notou-se alteração na estrutura dos grãos de amido, que pareceram maiores nos locais com presença de ozônio, tanto nas folhas sintomáticas quanto assintomáticas (figuras 91-94), nestas últimas coletadas no outono, os grãos de amido destacaram-se quanto ao tamanho. Notou-se a dilatação das cristas mitocondriais em plantas sem e com sintomas expostas durante outono e primavera, respectivamente (figuras 92-94).

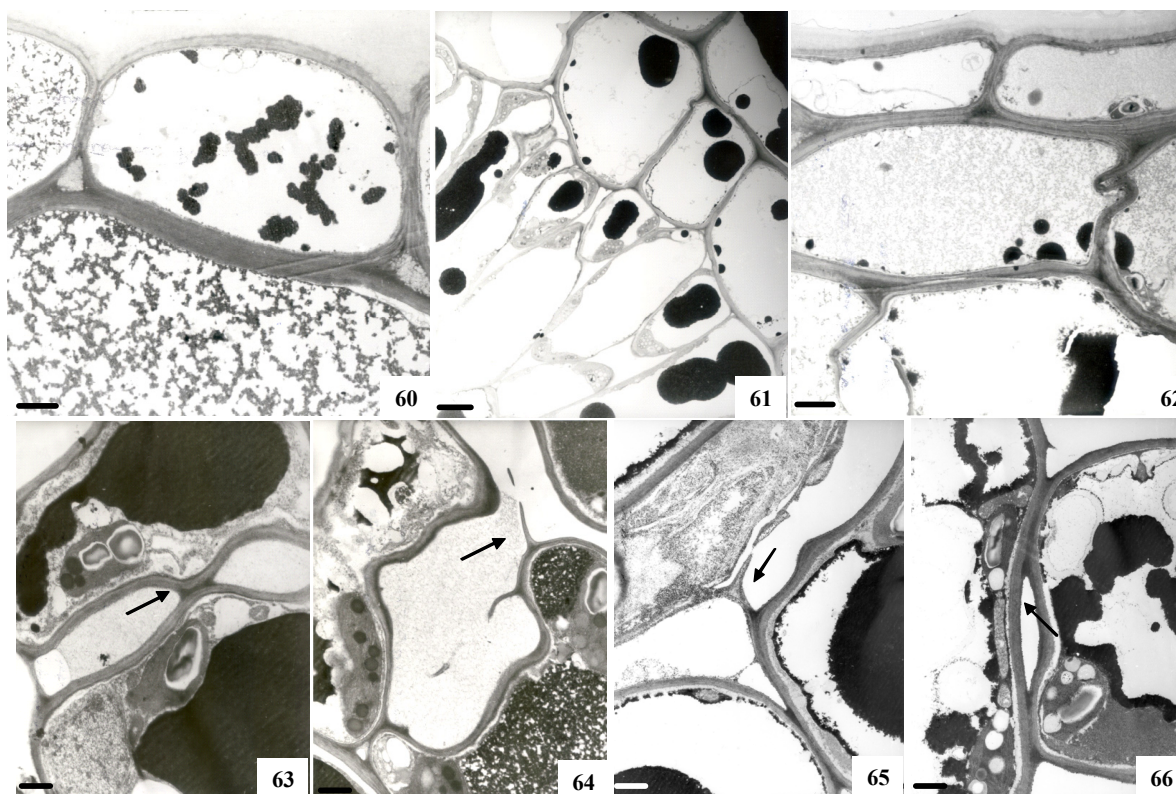
Os plastoglóbulos, tanto os de coloração clara quanto os mais eletrodensos, apresentaram alterações em quantidade e tamanho nas plantas que ficaram no ambiente ocupando grande parte dos cloroplastos (figuras 95-98), o que parece ter contribuído para alterações em seu tamanho e forma.

No núcleo, observou-se condensação de cromatina mais evidente nas folhas sintomáticas. No entanto, esse sintoma que é considerado um marcador do estresse oxidativo

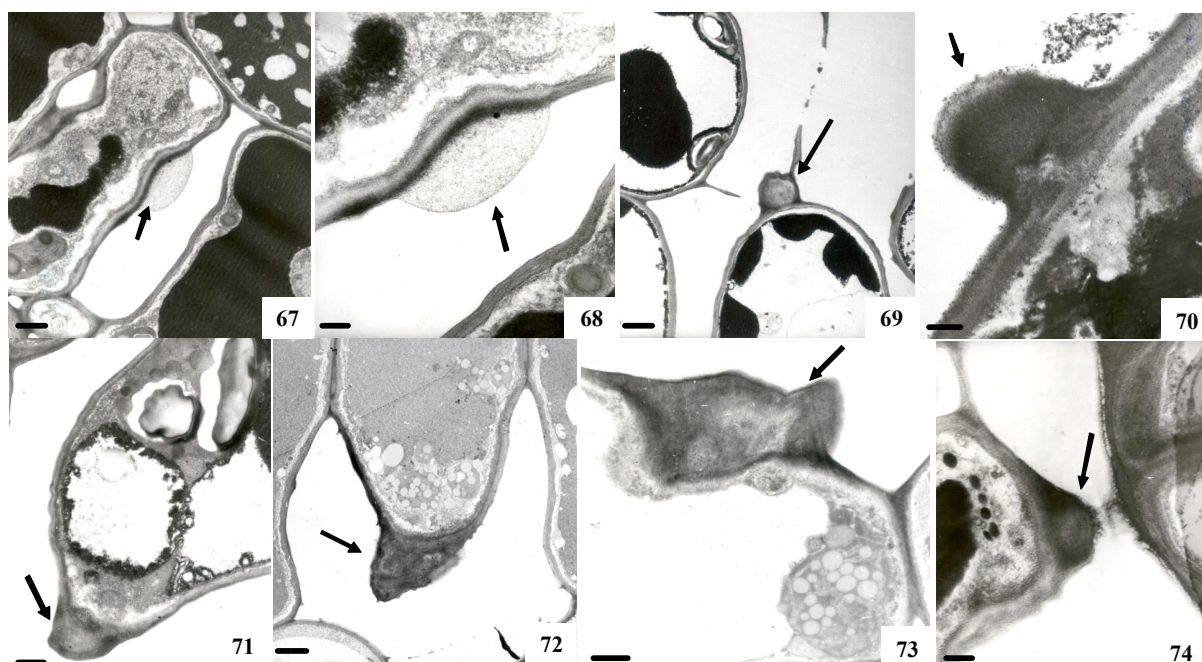
foi observado em todas as plantas que ficaram expostas no ambiente durante as diferentes estações e independente da presença de sintomas (figuras 99-102).



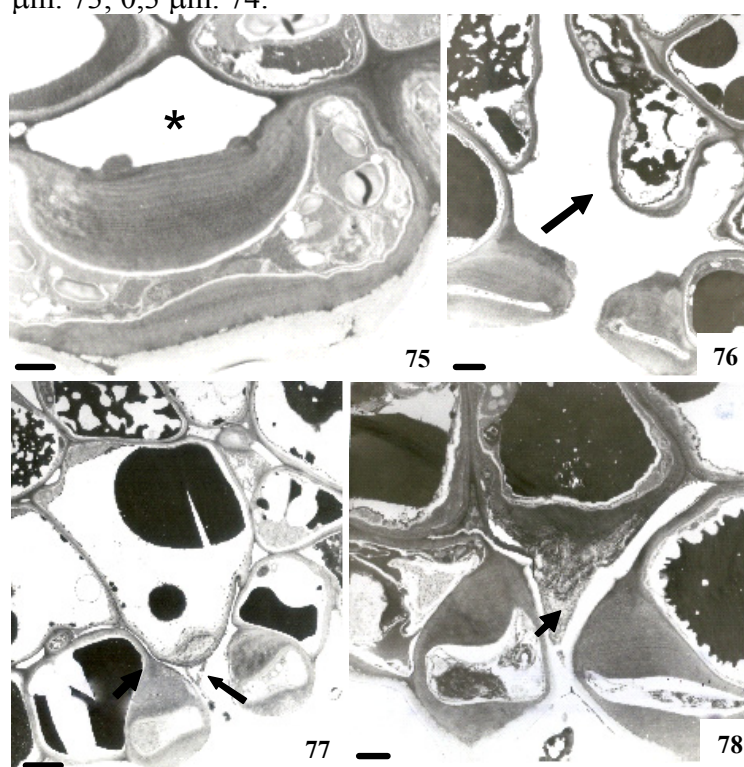
Figuras 58-59. Eletromicrografias de folhas de *P. guajava* 'Paluma'. Células do parênquima paliçádico apresentando degradação de parede celular em folha sintomática exposta no outono (setas). Notar degradação do conteúdo citoplasmático e acúmulo de compostos eletrodensos de composição fenólica nas células contíguas. hp – hipoderme; pp – parênquima paliçádico. Barras = 4 µm: 58; 2 µm: 59.



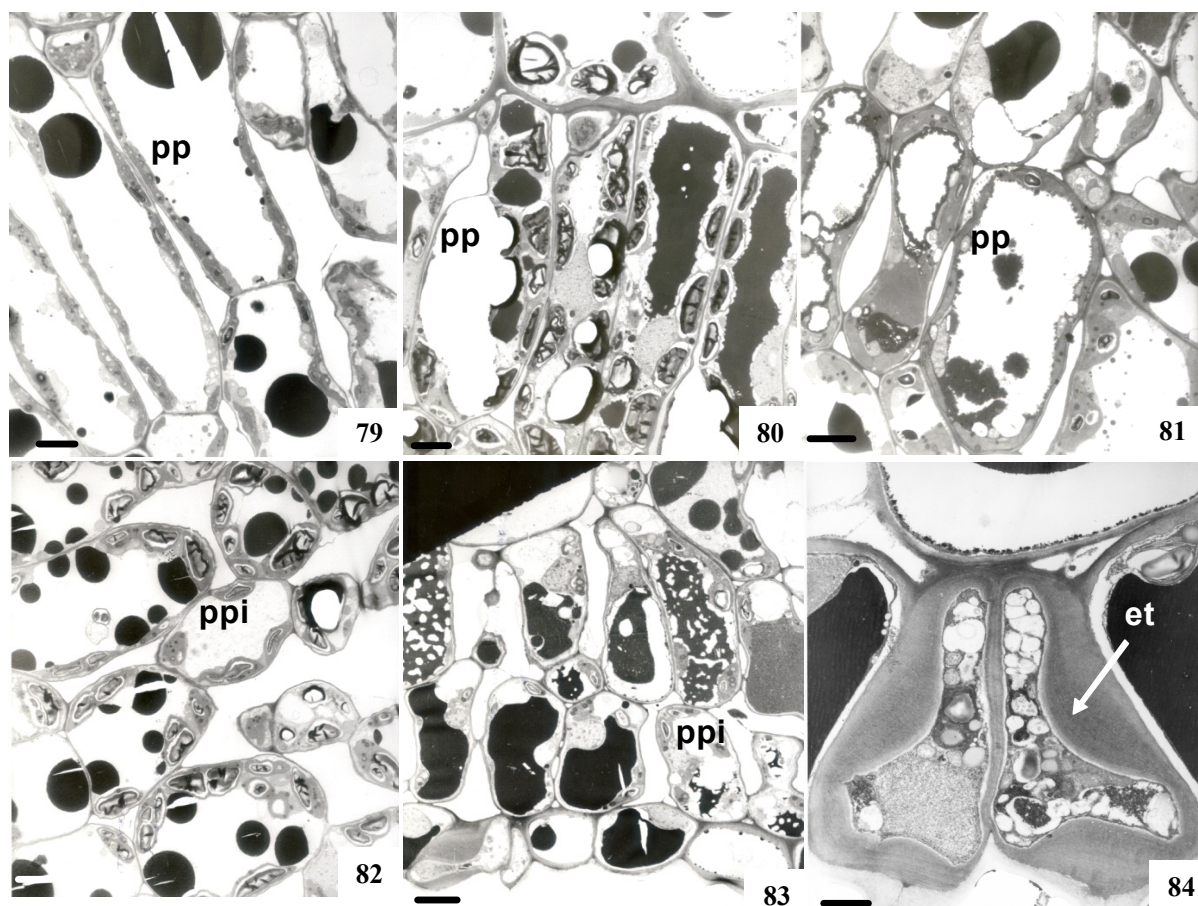
Figuras 60-66. Eletromicrografias de folhas de *P. guajava* 'Paluma'. 60. Células epidérmicas e hipodérmicas com lamela média íntegra. 61-62. Células epidérmicas e parenquimáticas com aspecto saudável. 63-66. Células de camadas inferiores do parênquima paliçádico mostrando separação das células (setas). 60-62. Material de referência. 63-64. Amostras assintomáticas. 65-66. Amostras sintomáticas. Barras = 2 µm: 60, 62; 4 µm: 61; 0,6 µm: 63; 0,7 µm: 64-66.



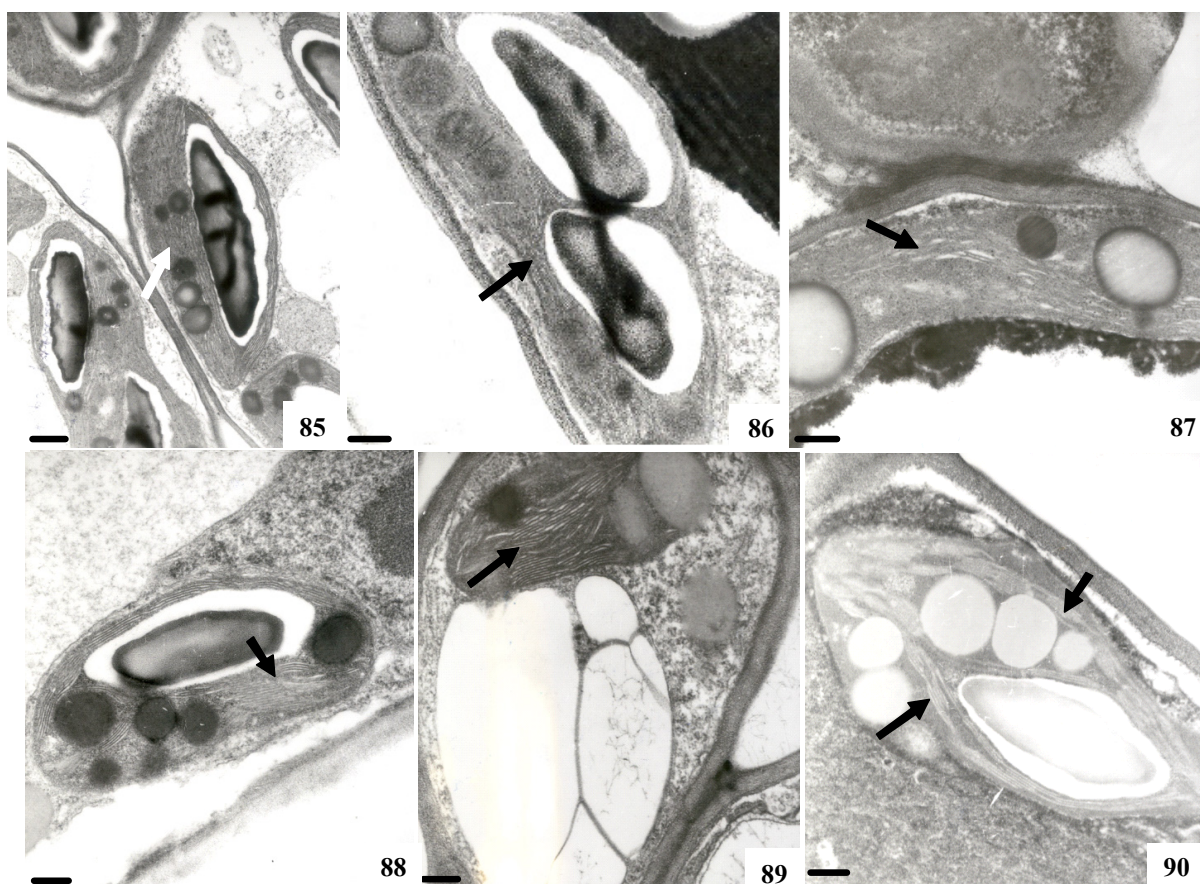
Figuras 67-74. Eletromicrografias evidenciando projeções em células de parênquima paliçádico em folhas de *P. guajava* 'Paluma' (setas). 67-68 e 73-74. Folhas assintomáticas. 69-72. Folhas sintomáticas. Barras = 0,7 µm: 67; 3 µm: 68; 1,3 µm: 69; 0,2 µm: 70; 0,6 µm: 71; 1,7 µm: 72; 1 µm: 73; 0,3 µm: 74.



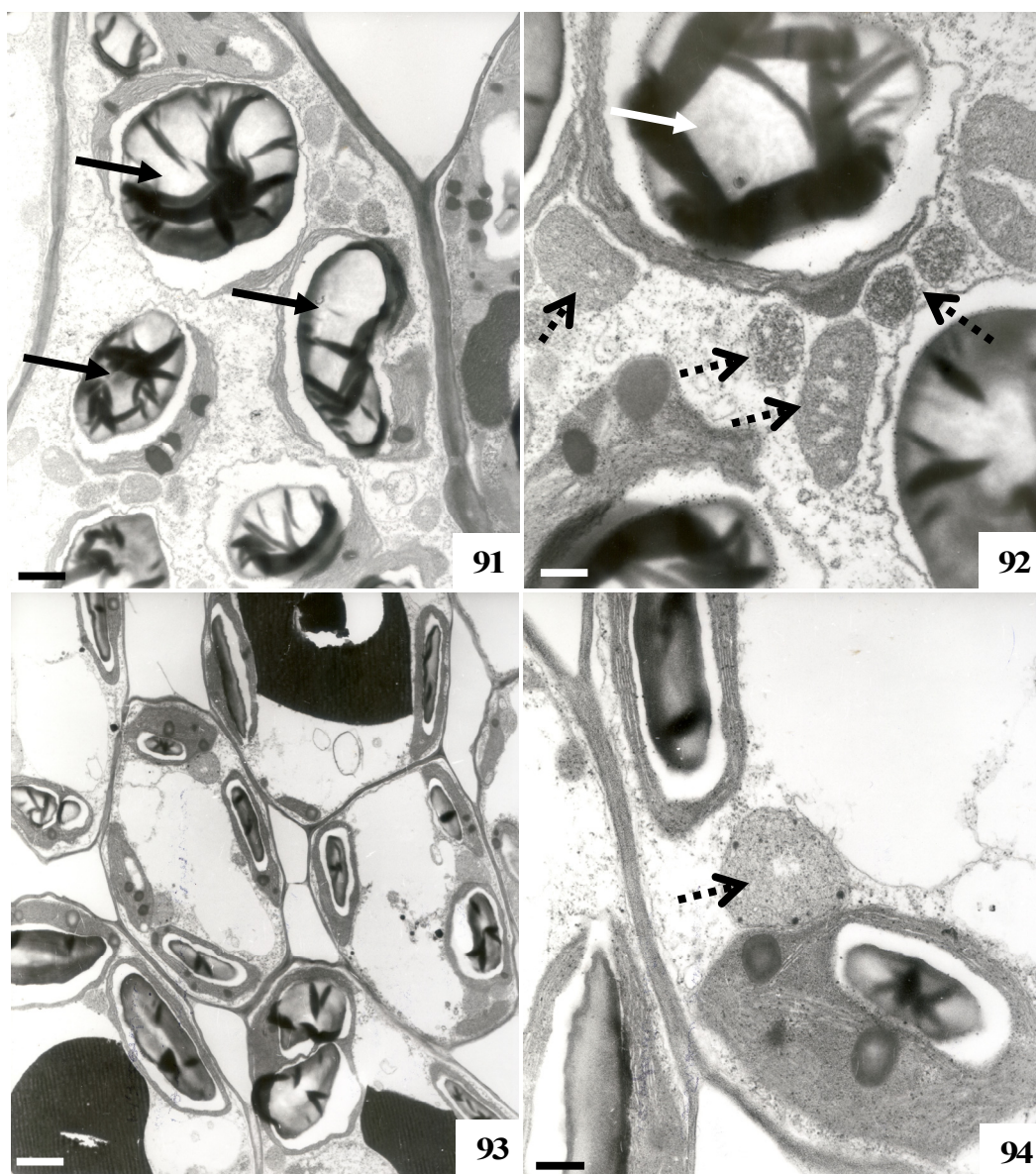
Figuras 75-78. Eletromicrografias de folhas de *P. guajava* 'Paluma'. 75, 77 e 78. Folhas sem sintomas. 76. Folhas com sintomas. 75. Estômato saudável seccionado longitudinalmente (*) cavidade subestomática. 76. Início de crescimento intrusivo de célula do parênquima paliçádico. 77-78. Espessamento de parede da célula parenquimática obstruindo o poro estomático (setas). 78. Acúmulo de substâncias fenólicas nas células subsidiárias. Barras = 1 µm: 75; 1,8 µm: 76; 2,5 µm: 77; 1,5 µm: 78.



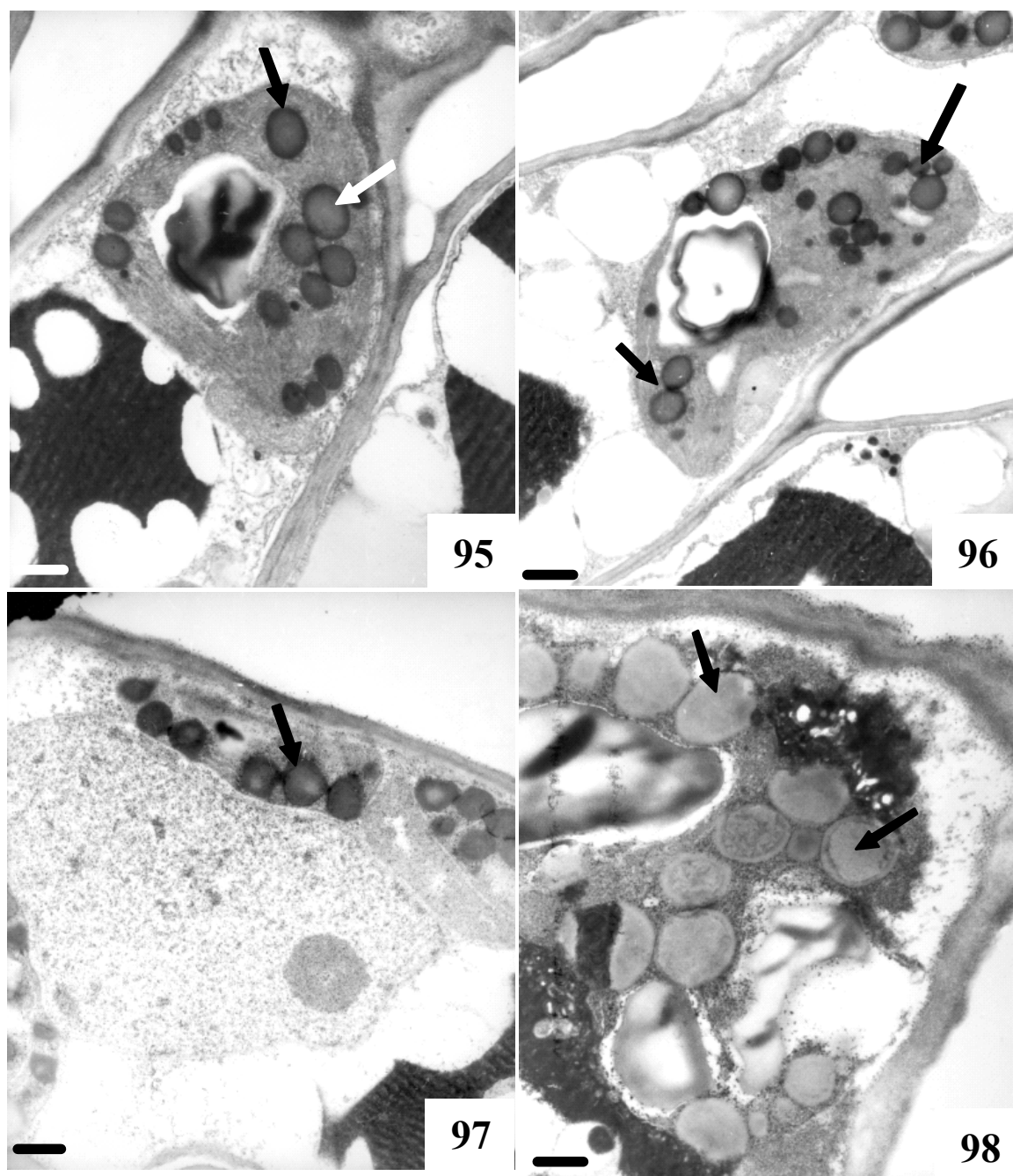
Figuras 79-84. Eletromicrografias de folhas de *P. guajava* 'Paluma', mostrando substâncias fenólicas destacadas como conteúdo eletrodenso. 79. Material de referência. 80-82. Sem sintoma. 83-84. Com sintomas. ppi – Camadas inferiores do parênquima paliçádico; hp – hipoderme; pp – Camadas superiores do parênquima paliçádico; et – Estômato (seta). Barras = 3 μ m: 79, 82, 83; 4 μ m: 80; 2 μ m: 81; 1 μ m: 84.



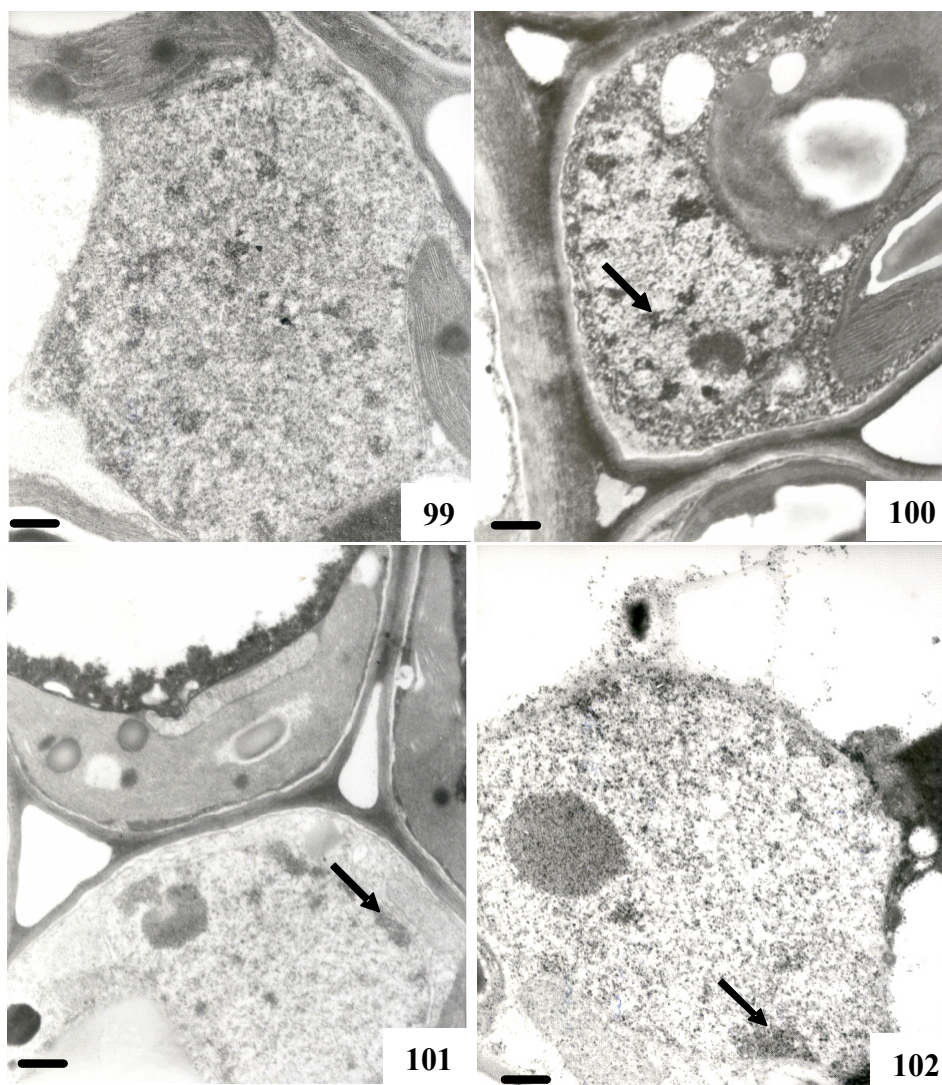
Figuras 85-90. Eletromicrografias de cloroplastos de folhas de *P. guajava* 'Paluma'. 85. Material de referência apresentando cloroplasto com aspecto saudável. 86-89. Folhas assintomáticas com separação da membrana do tilacóide indicando degradação dessas estruturas (setas), aumento no tamanho dos plastoglóbulos. 90. Folha sintomática com espaçamento mais evidente entre os tilacóides. Barras = 0,5 μm : 85; 0,3 μm : 86; 0,2 μm : 87, 88, 89, 90.



Figuras 91-94. Eletromicrografias de grãos de amido e mitocôndrias em folhas de *P. guajava* 'Paluma'. 91-92. Sem sintoma. 93-94. Com sintoma. Setas cheias – grãos de amido. Setas pontilhadas – mitocôndrias. Barras = 1 μ m: 91; 0,4 μ m: 92; 1,3 μ m: 93; 0,3 μ m: 94.



Figuras 95-98. Eletromicrografias de plastoglóbulos (setas) em folhas de *P. guajava* 'Paluma' expostas no ambiente. 95-96. Folhas assintomáticas. 97-98. Folhas sintomáticas. Barras = 0,5 μ m: 95; 0,6 μ m: 96,97; 0,3 μ m: 98.



Figuras 99-102. Eletromicrografias do núcleo de folhas de *P. guajava* 'Paluma'. 99. Material de referência. Folha assintomática. 100-102. Folhas sintomáticas. Condensação de cromatina (setas). Barras = 0,3 μm : 99, 102; 0,4 μm : 100, 101.

V. DISCUSSÃO

De acordo com a Cetesb (2009) o Estado de São Paulo possui duas estações bem marcadas: uma seca (de maio a setembro) e outra chuvosa (de outubro a abril). Nos períodos de seca, ocorre diminuição da temperatura e períodos de maior estabilidade atmosférica, dificultando a dispersão de poluentes.

A Cetesb (2009) informa que o O_3 ocorre com maior frequência no período de primavera e verão (estação chuvosa), podendo apresentar altos valores no período de transição entre as estações seca e chuvosa (abril/maio – outono).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que as estações com as maiores temperaturas foram aquelas que abrangeram o período chuvoso (primavera e verão), conforme o esperado. Contudo, contrariamente ao esperado, as concentrações de O_3 na primavera/verão foram menores quando comparadas com as outras estações. Possivelmente porque o verão apresentou menores valores de radiação e NO_x , necessários para a formação de O_3 . As maiores concentrações de O_3 ocorreram durante o inverno, possivelmente, devido às altas concentrações de NO_x presentes no período.

Em *P. guajava* a severidade de sintomas visíveis nas folhas, ao final das estações, foi maior nas plantas expostas na primavera, seguidas daquelas do inverno, verão e outono, respectivamente (tabela 2). Portanto, não somente a concentração de O_3 pode explicar os sintomas visíveis, mas o quanto a planta efetivamente absorveu do gás, e quanto o mesmo reagiu, o que depende de fatores fisiológicos, bioquímicos e anatômicos.

De acordo com Pina (2010), em estudo realizado com os mesmos indivíduos avaliados no presente trabalho, a condutância estomática foi maior em períodos de maiores temperaturas. Maior condutância estomática implica em maior aporte de O_3 para o interior da folha. Altas temperaturas foram registradas na primavera e foi justamente nessa estação que

foram observados a maior severidade e o maior índice de injúria foliar, mostrando a relação entre aspectos fisiológicos da planta e os sintomas visíveis.

Além da quantidade efetiva de O₃ absorvida, o efeito desse gás vai depender da capacidade da planta de evitar o estresse oxidativo, o que está relacionado com a produção de antioxidantes que neutralizam as espécies reativas de oxigênio - EROs (Faoro & Iriti 2009, Paolletti *et al.* 2009). Dias *et al.* (2007) em exposição realizada com a mesma cultivar no Parque do Ibirapuera - SP, local com altas concentrações de O₃, não observaram alterações nas concentrações das enzimas peroxidases e superóxido, mas apenas aumento na concentração de ácido ascórbico e a produção de antocianina, que como o primeiro, também tem papel antioxidante.

O caráter antioxidante da antocianina já foi comprovado. Gould *et al.* (2002) induziram, por lesões mecânicas, estresse oxidativo em folhas de *Pseudowintera colorata* e observaram a produção de antocianina, concluindo que esta foi a principal responsável pela neutralização das EROs, especialmente H₂O₂.

É consenso que os compostos fenólicos, entre os quais está a antocianina, são metabólitos secundários neutralizadores das EROs (Yamasaki *et al.* 1997, Pourcel *et al.* 2007, Yang *et al.* 2007). Em *Psidium guajava* 'Paluma', Rezende & Furlan (2009) encontraram aumento significativo de antocianina em folhas dessa planta fumigadas com O₃, relacionando essa alteração ao aparecimento de sintomas visíveis nas folhas analisadas.

No presente estudo, ao se analisar em folhas sintomáticas, a localização de antocianina nos diferentes tecidos de *P. guajava* 'Paluma', observou-se maior acúmulo somente nas camadas superiores do mesofilo (figuras 22-25). Já os testes histoquímicos para detecção de compostos fenólicos totais mostraram que os mesmos estavam presentes anteriormente aos sintomas visíveis, tornando-se mais evidentes quando estes ocorreram. Assim, o fato dos compostos fenólicos terem sido observados em todas as camadas do mesofilo e células epidérmicas (figuras 26-29), e a antocianina ter sido visualizada apenas nas camadas mais

superiores do mesófilo (figuras 23-25) em folhas sintomáticas, indica que esta possa ter contribuído em maior intensidade para o aparecimento dos sintomas visíveis, agindo associadamente com os outros compostos fenólicos.

Além da ação antioxidante direta, a antocianina induzida pelo estresse oxidativo pode atenuar o excesso de luminosidade, beneficiando a fotossíntese, ao proteger os cloroplastos dos efeitos do estresse foto-oxidativo (Neil & Gould 2003). Foyer *et al.* (1994) explicam que luz absorvida em excesso pode gerar a produção de EROs, que irão causar danos nos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios de membrana.

Niel & Gould (2003) confirmaram o papel protetor da antocianina em experimento com filtro vermelho que simulava a ação das mesmas e encontraram uma redução de 33% no acúmulo de superóxido em folhas de *Lactuca sativa* L., demonstrando que a antocianina fornece uma proteção eficaz, evitando prejuízos à fotossíntese.

Além das altas intensidades luminosas, fatores que causam estresse oxidativo, como seca, metais pesados, falta de nutrientes e O₃, também podem atuar como indutores na produção de antocianina, sendo que estes estressores podem agir em sinergia (Bussotti 2008). Gravano *et al.* (2004) ao avaliarem folhas de *Prunus avium* fumigadas com O₃ observaram o aparecimento de pigmentações decorrentes do acúmulo de antocianina e notaram que o decaimento fotossintético foi progressivamente diminuído ao longo da exposição, indicando que a antocianina reduziu danos causados pelo O₃.

Em *P. guajava* 'Paluma', a antocianina mostrou importante papel antioxidante, neutralizando as EROs, uma vez a planta, ao contrário de outras espécies sensíveis, como o tabaco Bel W3 (Heggstad 1991), não apresentaram necroses, que são o reflexo da presença de células mortas, cujo processo de formação é desencadeado principalmente pelo acúmulo do H₂O₂ nos tecidos foliares.

O aumento de antocianina, também um pigmento foto-protetor (Neil & Gould 2003), pode ser desencadeado tanto por O₃ como pela luz, uma vez que ambos promovem a

formação de EROs, especialmente H_2O_2 . Contudo, em *P. guajava* ‘Paluma’, análises de correlação mostraram que a produção de antocianina nos tecidos foliares foi induzida pelo O_3 , uma vez que se observou uma relação positiva entre o acúmulo de H_2O_2 , a concentração de O_3 e de NO_x , seu precursor, e correlação negativa entre esse acúmulo e a radiação (tabela 4). No entanto, não se pode excluir o fato desses fatores terem agido em conjunto, aumentando o nível do estresse oxidativo e a expressão dos sintomas visíveis, o que explicaria a maior severidade de sintomas encontrados na primavera em comparação com o inverno.

Em ‘Paluma’, o acúmulo de H_2O_2 , detectado por meio do reagente DAB, foi investigado em folhas adultas e observado em folhas com e sem sintomas, somente nas células epidérmicas. Faoro & Iriti (2005) em experimento de fumigação com três cultivares de feijão, sensíveis ao O_3 , observaram relação entre a sensibilidade e a intensidade e localização do acúmulo. A cultivar Cannelino, mais sensível, apresentou intenso acúmulo de H_2O_2 em células epidérmicas e parenquimáticas; a cultivar Nano Língua di Fuoco, de sensibilidade intermediária, apresentou acúmulo mais discreto, com destaque para as células próximas ao estômato e do parênquima paliçádico; a cultivar Saxa, a mais tolerante, demonstrou pouco acúmulo, estando esse presente apenas nas células epidérmicas adjacentes aos estômatos, o que corrobora o fato de ‘Paluma’ ser uma bioindicadora tolerante ao O_3 .

Muito estudos mostram que o parênquima paliçádico é o tecido mais afetado pelas EROs. Oksanen *et al.* (2003) observaram em *Populus tremuloides* e *Betula papyrifera* fumigadas com O_3 maior acúmulo de H_2O_2 em folhas mais velhas e principalmente no parênquima paliçádico. Karnosky *et al.* (2007), em artigo de revisão, descrevem o parênquima paliçádico como sendo o tecido mais afetado pelo estresse oxidativo, e assim, responsável pela expressão dos sintomas visíveis decorrentes do O_3 , caracteristicamente presentes na superfície adaxial. Embora em ‘Paluma’, como citado acima, o acúmulo tenha sido observado apenas na epiderme, acredita-se que tenha havido acúmulo também no parênquima paliçádico, apesar desse não ter sido observado, uma vez que o mesófilo é muito compacto,

dificultando a observação dos tecidos em corte óptico, em secções paradérmicas. No entanto, o acúmulo encontrado ao redor dos estômatos deixa claro que o estresse foi originado por um gás (figuras 35-36); além disso, a correlação positiva entre acúmulo de H_2O_2 e O_3 observada no inverno reforça que a resposta está relacionada ao O_3 .

Acredita-se também que a maior tolerância de ‘Paluma’ ao O_3 , em comparação com espécies comprovadamente sensíveis como o tabaco Bel W3 (Heggestad 1991), esteja relacionada com sua anatomia foliar. O mesofilo compacto de ‘Paluma’ lhe atribui características xerofíticas que dificultam a difusão das EROs nos espaços intercelulares e podem evitar maiores danos nas células mais distantes da cavidade sub-estomática (figuras 17-18).

Além da compactação dos tecidos, características dos estômatos podem restringir a entrada de poluentes aéreos. Em ‘Paluma’ observou-se, tanto em microscopia fotônica como em eletrônica de transmissão, a oclusão de câmara subestomática (figuras 54-57 e 75-78) devido ao crescimento de células parenquimáticas em direção ao poro estomático. Tal fato indica que a espécie tem mecanismos para controlar eficientemente a entrada de gases bem como a perda de água por transpiração. Essa alteração foi observada em plantas sintomáticas e assintomáticas mantidas no ambiente.

A oclusão de câmara subestomática foi observada no gênero *Aechmea* e em *Araeococcus micranthus* por Ayoama & Sajo (2003) sendo considerada uma característica presente em plantas xerofíticas, sendo nesse caso, decorrente do crescimento de células hipodérmicas em direção ao interior da câmara subestomática.

A intensificação das características xerofíticas e aumento da densidade estomática são descritos como indicativos do efeito do estresse causado pelo O_3 (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007).

Em ‘Paluma’ exposta no ambiente, observou-se uma tendência de aumento na densidade estomática em comparação com plantas mantidas em ambiente livre de poluentes

(casa de vegetação). As plantas expostas durante o inverno, período com maiores valores de AOT40, mostraram maior densidade estomática, enquanto que as do verão (menor AOT40) apresentaram a menor densidade. Nas plantas expostas na primavera e no outono, a relação entre a densidade estomática e a AOT40 também foi verificada (figuras 14 e 37).

Na planta estudada, o aumento na densidade estomática pode estar relacionado a uma maior eficiência no mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos. Relações entre a sensibilidade da planta ao O₃, aspectos dos estômatos e condutância estomática foram apontados por alguns autores, porém algumas vezes com resultados contraditórios.

Alves *et al.* (2008) observaram aumento na densidade estomática em *Eugenia uniflora* exposta no mesmo local do presente estudo. Evans *et al.* (1996) relacionaram em *Fraxinus pennsylvanica* e *Prunus serotina* expostas ao O₃ um aumento na densidade de estômatos associado à variação nos seus tamanhos. Paoletti *et al.* (2009) avaliando parâmetros fisiológicos e estruturais em folhas sintomáticas de *Fraxinus ornus* L. atribuiu alterações na condutância estomática devido a modificações nestas células ou em outras células epidérmicas. Saitanis & Karandinos (2002) comparando a variedade mais sensível de *Nicotiana tabacum* (Bel-W3) com a mais tolerante (K63) não observaram diferenças significativas na densidade de estômatos. Enquanto que Pedroso & Alves (2008), também comparando cultivares de tabaco, Bel-W3 (sensível ao O₃) e Bel-B (tolerante), registraram maior densidade estomática nesta última.

Portanto *Psidium guajava* ‘Paluma’ apresentou mecanismos para tolerar o estresse gerado pelo O₃. Porém, as alterações estomáticas e o acúmulo de substâncias fenólicas, associados às características estruturais foliares, não foram suficientes para evitar danos decorrentes desse gás. Os efeitos deletérios causados pelo O₃ foram observados na folha em nível estrutural e ultraestrutural.

A análise da progressão sintomática em *P. guajava* ‘Paluma’ revelou marcadores do estresse oxidativo, com destaque para alterações na parede, principalmente nas células do

parênquima paliçádico, e aumento na sinuosidade da parede em células próximas à cavidade subestomática; danos na membrana plasmática das células hipodérmicas; marcante diminuição na quantidade de cloroplastos; além da ocupação de grande parte do vacúolo por substâncias fenólicas (figuras 39-41 e 50-53).

As alterações na parede celular foram notadas em microscopia fotônica (figura 47) e detalhadas em microscopia de transmissão (figuras 58-59 e 67-74). Dentre as alterações, notaram-se: formação de projeções, sinuosidade acompanhada de espessamento da parede de células parenquimáticas de diferentes camadas do tecido paliçádico e separação de células, possivelmente devido à degradação da lamela média.

As projeções nas paredes celulares foram citadas por alguns autores como sendo de natureza péctica e presentes principalmente no parênquima paliçádico. Günthardt-Goerg *et al.* (1997) registraram o aparecimento de tais projeções em células do mesofilo de *Betula pendula*, *Populus xeuramericana* e *Alnus glutinosa* expostas ao O₃ e confirmaram sua composição por meio de microscopia de epifluorescência, uma vez que a pectina fluoresce sob comprimento de 350 a 390 nm quando corada com azul de anilina (O'Brien & McCully 1981). Reig-Armiñana *et al.* (2004) também observaram o aparecimento de projeções em células do parênquima paliçádico de *Pistacia lenticus* submetida ao O₃ sob condições controladas. Em *Corylus avelaom* proveniente de ambiente com O₃ as projeções foram encontradas somente no parênquima lacunoso (Vollenweider *et al.* 2003).

Em 'Paluma', as projeções observadas em microscopia de transmissão distribuíram-se pontualmente nas células do mesofilo, em direção aos espaços intercelulares, parecendo estarem mais relacionadas a um dano do que a uma resposta com potencial adaptativo. As análises de ultraestrutura mostraram, ainda, espessamento de parede celular em células do parênquima paliçádico, mais acentuado em folhas sintomáticas (figuras 58-59). Gravano *et al.* (2003) observaram em *Ailanthus altissima*, exposta a diferentes concentrações de O₃, espessamento da parede devido à deposição de calose em células do parênquima paliçádico.

Os autores discutem que essa resposta representa uma barreira mecânica que dificulta a entrada de EROs na célula e favorece o processo de neutralização das mesmas. Bussotti *et al.* (2005) descreveram espessamento associado à irregularidade da parede celular como sendo um dos primeiros marcadores encontrados em espécies mais sensíveis por eles estudadas (*Ailanthus altissima*, *Viburnum lantana*, *Acer pseudoplatanus*) submetidas ao estresse oxidativo por O₃, e presentes ao final da exposição em espécies consideradas pelos autores como menos sensíveis ou tolerantes (*Fagus sylvatica* e *Viburnum lantana*). Os autores atribuíram essas alterações a depósitos de camadas de celulose que geraram redução no espaço celular.

O espessamento observado na parede celular em plantas expostas ao O₃ tem sido relacionado com fato de que o H₂O₂ participa do cruzamento oxidativo de proteínas da parede celular, que associado à matriz de polissacarídeos, fornece reforço estrutural para a mesma. Além disso, o H₂O₂ é descrito como ativador da síntese de lignina por atuar como um substrato das peroxidases (Alvarez *et al.* 1998). Dessa forma, o H₂O₂ não só age como um composto capaz de causar danos nas células, como já discutido, mas também pode engatilhar respostas de defesa como o espessamento da parede celular, que servirá como uma barreira mecânica à entrada das EROs na célula.

Apesar das modificações presentes na parede que visam ao bloqueio da entrada das EROS na célula, essas podem atravessar a parede e reagir inicialmente com lipídios e proteínas localizadas na superfície externa das membranas, sendo os ácidos graxos polinsaturados seu alvo principal, estimulando a peroxidação lipídica e prejudicando a fluidez da membrana. Após, parte das EROs irá reagir com as proteínas das intermembranas e lipídios, nesse caso alvos secundários desse processo. Como resultado da oxidação induzida pelo O₃, modificações nas proteínas também ocorrem, tanto na sua estrutura quanto na sua atividade. Se as EROs conseguem transpor essas barreiras elas reagem no citoplasma,

podendo então, danificar aminoácidos e modificar o DNA celular (Roschina & Roschina 2003, Iriti & Faoro 2009).

Em ‘Paluma’, as análises ultraestruturais mostraram que as EROs conseguiram transpor tais barreiras, uma vez que os cloroplastos, organelas muito sensíveis a essas moléculas, revelaram alterações como: degradação das membranas dos tilacóides (figuras 85-90), aumento em quantidade e tamanho dos grãos (figuras 91-94) de amido e plastoglóbulos (figuras 95-98). Além destes, as mitocôndrias apresentaram a dilatação das cristas, indicando efeito do estresse oxidativo nestas membranas. Os cloroplastos e mitocôndrias são as organelas mais afetadas pelo estresse oxidativo por possuírem muitas membranas e cadeias transportadoras de elétrons, que facilitam o aparecimento de danos por EROs, por contribuírem na formação das mesmas (Bray *et al.* 2000, Heath 1994).

Plantas sensíveis ao O₃ podem apresentar morte celular programada (Programmed Cell Death - PCD), induzida pelo H₂O₂ quando presente em concentrações tóxicas às plantas (Faoro & Iriti 2009). A morte celular programada, neste caso, ocorre em pequenos grupos de células, normalmente no parênquima paliçádico. Essa é uma resposta que inicialmente foi descrita para o ataque de patógenos, que também gera EROs, ativando uma resposta de hipersensibilidade (Hipersensitive Response - HR) como uma maneira de evitar sua proliferação (Iriti *et al.* 2006, Soares & Machado 2007). No caso do O₃ essa resposta ocorre em espécies sensíveis e é conhecida como HR-like, por ser semelhante àquela induzida por patógenos, devido ao potencial oxidativo desse poluente (Pell *et al.* 1997, Iriti & Faoro 2009). No entanto, em plantas bioindicadoras tolerantes ao O₃, não ocorre PCD, mas sim, um processo de aceleração no envelhecimento celular (Accelerated Cell Senescence - ACS).

Em ‘Paluma’, não se observou PCD, mas sim ACS, o que confirma a maior tolerância da espécie ao O₃, quando comparada com espécies reconhecidamente sensíveis como o tabaco Bel W3 que, segundo Pedroso (2009), apresentou HR-like quando exposta às mesmas condições ambientais do presente estudo.

A ACS tem como principais marcadores estruturais: o aumento no tamanho do vacúolo, a progressiva degeneração dos constituintes celulares, evidenciada pelo aumento da condensação do citoplasma e núcleo, degradação dos cloroplastos e acúmulo de compostos secundários (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007). Vollenweider *et al.* 2003 descrevem a ACS como um processo lento que ocorre na maioria das folhas expostas ao O₃.

A ocorrência de ACS devido ao O₃ tem sido mencionada por diferentes autores que descrevem esse processo associando-o aos sintomas visíveis, como aqueles observados em 'Paluma'.

Paoletti *et al.* (2009) observaram em *Fraxinus ornus* a presença de pontuações vermelhas nas folhas expostas ao sol em ambiente contaminado por O₃. Os autores, com base em análises microscópicas, descreveram danos nos cloroplastos, salientando que essas organelas são a principal fonte celular de espécies reativas de oxigênio e muito sensíveis ao estresse oxidativo complementar por O₃, como já discutido.

Em 'Paluma' observou-se, ainda nos cloroplastos, aumento em quantidade e tamanho dos grãos de amido e plastoglóbulos. Aumento nos grãos de amido foi também constatado por outros autores em plantas submetidas ao O₃. Castagna *et al.* (2007), em experimento com folhas de tomate submetidas ao estresse oxidativo por O₃, mostraram alteração no formato dos grãos de amido, associando essa resposta à geração da ACS decorrente do desequilíbrio no sistema de defesa da planta. O aumento dos grãos de amido pode estar relacionado com a dificuldade de exportação de açúcares, devido às mudanças na permeabilidade da membrana decorrentes da ação desse gás (Grantz 2003).

Os plastoglóbulos são corpos de lipoproteínas de baixa densidade e consistem de uma única camada externa polar contendo lipídios neutros como preniquinonas, carotenóides e outros. Nos plastoglóbulos encontra-se grande proporção de importantes preniquinonas, como o α -tocoferol. Os tocoferóis protegem os lipídios das membranas dos plastídios contra danos oxidativos e também o fotossistema II contra a fotoinibição. O tocoferol tem papel

importante na proteção dos tilacóides dos danos causados por estresse oxidativo. Mudanças no formato dos tilacóides estão relacionadas ao aumento no número e tamanho dos plastoglóbulos, indicando que essa estrutura pode estar acumulando alguns dos catabólitos originados da degradação dos tilacóides (Bréhélin & Kesser 2008).

Similarmente ao observado em 'Paluma', Faoro & Iriti (2009) relataram, em folhas de *Phaseolus vulgaris* fumigadas com O₃, dilatação das membranas dos tilacóides, desorganização dos grana e grande aumento de plastoglóbulos, inclusive em células em estágios precoces de danos.

Gravano *et al.* (2003) observaram em *Ailanthus altissima* exposta em ambiente com O₃, alongamento dos tilacóides, aumento na quantidade de plastoglóbulos e amido, e ainda condensação da cromatina.

P. guajava 'Paluma' também apresentou condensação da cromatina, mais acentuadamente em folhas sintomáticas (figuras 99-102), indicando que a planta foi fortemente afetada pelo estresse oxidativo causado pelo O₃. Condensação de cromatina é descrita como um sintoma presente em estágios finais de ACS, quando o DNA já foi danificado (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007), e foi citada por alguns autores como presente em plantas submetidas ao O₃ em experimentos de fumigação com esse gás. Pasqualini *et al.* (2003) observaram em tabaco (Bel W3) grandes agregados de cromatina dispersos por todo núcleo.

Muitos marcadores do estresse oxidativo causado pelo O₃ foram observados em 'Paluma' sendo evidenciados em folhas assintomáticas e acentuados em folhas sintomáticas. Dentre esses marcadores, alguns podem ser indicativos de mecanismos que a planta utiliza para tolerar o estresse oxidativo e outros, provavelmente, ocorrem após as alterações não terem sido suficientes para impedir que o estresse causasse os danos.

Assim, os mecanismos para minimizar os efeitos do O₃ variaram desde mudanças bioquímicas, como o acúmulo de substâncias fenólicas nos tecidos foliares, até estruturais como oclusão da câmara subestomática por células parenquimáticas.

O acúmulo de substâncias fenólicas, associado aos outros sintomas observados, podem ser utilizados como marcadores do estresse oxidativo, facilitando a validação dos sintomas causados pelo O₃, além de auxiliar no entendimento da progressão dos sintomas visíveis. No entanto, é importante salientar que os mesmos devem estar em concordância e em sinergia com os sintomas visíveis, pois tais marcadores isoladamente podem ser originados por vários fatores causadores do estresse oxidativo, que não apenas o O₃ (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007, Faoro & Iriti 2009).

VI. CONCLUSÕES

Psidium guajava ‘Paluma’ é uma espécie bioindicadora tolerante ao O₃, uma vez que os sintomas apresentados caracterizam a ACS (Accelerated Cell Senescence). Esses sintomas abrangeram alterações estruturais, ultraestruturais, histoquímicas como: acúmulo de substâncias fenólicas no mesofilo, alterações nas células estomáticas (oclusão da cavidade subestomática e aumento da sua densidade), alterações na parede celular (espessamento e presença de projeções), degradação da membrana plasmática nas células hipodérmicas, diminuição no número de cloroplastos e degradação dessas organelas, com aparente aumento na quantidade de plastoglôbulos e grãos de amido, dilatação das cristas mitocondriais, condensação de cromatina e acúmulo de H₂O₂.

Esses sintomas visíveis sempre ocorreram nas folhas mais velhas, o que indica que estão relacionados ao fato dessas folhas possuírem menos defesas, facilitando a ocorrência de ACS.

Todos os marcadores observados se apresentaram mais intensos em folhas sintomáticas, embora estivessem presentes em folhas mantidas no ambiente, que ainda não apresentavam sintomas visíveis.

Alguns parâmetros ambientais, como radiação, temperatura e umidade relativa podem ter acentuado os danos observados, no entanto, a correlação de Pearson mostrou, para as análises relativas ao H₂O₂, que somente NO_x e O₃ estavam relacionadas com o acúmulo desse composto, o que permite inferir sobre o status do estresse oxidativo nos tecidos foliares.

Psidium guajava ‘Paluma’, quando exposta em ambiente com ozônio na cidade de São Paulo, apresenta alterações ultraestruturais e estruturais indicativas do estresse oxidativo provocado por esse gás, podendo ser utilizada como bioindicadora do O₃.

VII. RESUMO

A poluição nos grandes centros urbanos tem sido agravada pelo aumento da frota automotiva, gerando uma maior concentração de poluentes de origens primária, e conseqüentemente, secundária, como é o caso do ozônio (O_3). Plantas são consideradas bioindicadoras quando apresentam especificidade na resposta a determinado poluente. *Psidium guajava* ‘Paluma’ vem sendo testada como bioindicadora de O_3 e responde com a presença de manchas foliares vermelhas, entre as nervuras, na superfície adaxial, decorrente do acúmulo de antocianina. O presente estudo objetivou contribuir com informações que permitam afirmar se a planta é ou não indicada para o biomonitoramento do O_3 *in situ*, com base em aspectos estruturais, ultraestruturais e histoquímicos. Assim, avaliaram-se esses parâmetros em plantas expostas no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), área verde inserida na cidade de São Paulo, com presença de O_3 . Os resultados mostraram redução na quantidade de cloroplastos, degeneração do conteúdo citoplasmático e grande aumento de compostos fenólicos, além de oclusão de câmara subestomática em folhas expostas no ambiente. A densidade estomática foi maior nas plantas expostas durante as estações que tiveram maiores concentrações de O_3 . As análises com DAB mostraram correlação entre acúmulo de H_2O_2 nas células epidérmicas e concentração de O_3 , quando esta foi mais alta. A localização e intensidade de antocianina, decorrente do aparecimento de sintomas visíveis, indicaram que este metabólito secundário pode interferir positivamente na neutralização das espécies reativas de oxigênio, uma vez que possui propriedades antioxidantes. Em ultraestrutura, observaram-se alterações na parede celular, dilatação de cristas mitocondriais e tilacóides, alterações nos grãos de amido e plastoglôbulos e condensação de cromatina. Todos esses sintomas são indicativos de senescência celular acelerada (ACS) e ocorreram em folhas mais velhas, o que indica que estão relacionados ao fato dessas folhas possuírem menos defesas, facilitando a ocorrência de ACS. Conclui-se que *Psidium guajava* ‘Paluma’ é uma espécie bioindicadora tolerante ao O_3 e pode ser aplicada em programas de biomonitoramento.

Palavras-chave: *Psidium guajava* ‘Paluma’, estresse oxidativo, anatomia foliar, biomonitoramento

VIII. ABSTRACT

Pollution in large cities has been increasing because the growing of the automotive fleet which creates a higher concentration of pollutants from primary sources, and therefore, secondary, such as ozone (O_3). Plants considered as bioindicators have specificity in response to a particular pollutant. *Psidium guajava* 'Paluma' is being tested as a bioindicator of O_3 and responds with red leaf spot between the veins, in the adaxial surface, due to the accumulation of anthocyanin. This study aimed to contribute with information to suggest whether the plant can or cannot be used for the biomonitoring of O_3 *in situ*, based on structural, ultrastructural and histochemical analyses. Thus, we evaluated these parameters in plants exposed in "Parque Estadual das Fontes do Ipiranga" (PEFI), a green area in São Paulo city with the presence of O_3 . Leaves exposed in environment showed a reduction in the amount of chloroplasts, degeneration of cytoplasmic contents, large increase in phenolic compounds, and occlusion of substomatal chambers. Stomatal density was higher in plants exposed during the seasons that had higher concentration of O_3 . The analysis with DAB showed a correlation between H_2O_2 in epidermal cells and concentration of O_3 , when it was higher. The location and intensity of anthocyanin, due to the appearance of visible symptoms, indicated that this secondary metabolite may positively affect the neutralization of reactive oxygen species, since it has antioxidant properties. It was observed in ultrastructural level modifications at the cell wall, dilation of mitochondrial cristae and thylakoids, changes in starch grains and plastoglobules and chromatin condensation. All these symptoms are indicative of accelerated cellular senescence (ACS) and occurred in older leaves, since their defenses are less effective, which facilitate the occurrence of ACS. We concluded that *Psidium guajava* 'Paluma' is a tolerant bioindicator species to O_3 and it can be applied in biomonitoring programs.

Key-words: *Psidium guajava* 'Paluma', oxidative stress, leaf anatomy, biomonitoring

IX. LITERATURA CITADA

- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. & Lamb, C.** 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92:1-20.
- Alves, V.** 2006. Avaliação do potencial bioindicador de *Psidium cattleianum* Sabine e *P. guajava* L. cv. Paluma à poluição atmosférica na cidade de São Paulo. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Alves, E.S., Tresmondi, F. & Longui, E.L.** 2008. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 22: 241-248.
- Arndt, U. & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *In*: Ellenberg (ed.). *Biological monitoring: signals from the environment*. Vieweg, Eschborn, pp. 199-298.
- Ayoama, E.L. & Sajo, M.G.** 2003. Estrutura foliar de *Aechmea* Ruiz & Pav. Subgênero *Lamprococcus* (Beer) Baker e espécies relacionadas (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 461-473.
- Barbosa, L.M., Potomati, A. & Peccinini, A.A.** 2002. O PEFI: Histórico e Legislação. *In*: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (orgs.). *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo*. Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 17-28.
- Bréhélin, C. & Kesser, F.** 2008. The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks. *Photochemistry and Photobiology* 84:1388-1394.

- Bray, E. A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. *In*: B. Buchanan, W. Gruissen & R. L. Jones (eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, New York, pp. 1158-1203.
- Bussotti, F.** 2008. Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. *Global Change Biology* 14: 2727-2739.
- Bussotti, F., Agati, G., Desotgiu, R., Matteini, P. & Tani, C.** 2005. Ozone foliar symptoms in woody plant species assessed with ultrastructural and fluorescence analysis. *New Phytologist* 166: 941–955.
- Castagna, A., Ederli, L., Pasqualini, S., Mensuali-Sodi, A., Baldan, B., Donnini, S. & Ranieri, A.** 2007. The tomato ethylene receptor LE-ETR3 (NR) is not involved in mediating ozone sensitivity: causal relationships among ethylene emission, oxidative burst and tissue damage. *New Phytologist* 174: 342–356.
- Cetesb.** 2008. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2007. Série Relatórios, São Paulo.
- Cetesb.** 2009. Relatório de qualidade do ar do Estado de São Paulo de 2008. Série Relatórios, São Paulo.
- De Temmerman, L., Bell, J.N.B., Garrec, J.P., Klumpp, A., Krause, G.H.M. & Tonneijck, A.E.G.** 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. *In*: A. Klumpp, W. Ansel. & G. Klumpp (eds). *Urban air pollution, bioindication and environmental awareness*. Cuvillier Verlag, Göttingen, pp. 337-373.
- Dias A.P.S., Rinaldi, M.C.S. & Moraes R.M.** 2007. Alterações bioquímicas associadas a injúrias foliares visíveis em plantas jovens de *Psidium guajava* ‘Paluma’ mantidas em ambiente contaminado por ozônio. *Hoehnea* 34: 231-238.

- Domingos, M.; Bourotte, C.; Klumpp, A.; Klumpp, G. & Forti, M.C.** 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. *In:* D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (orgs.). Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo. Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 221-249.
- El Khatib, A.A.** 2003. The response of some common Egyptian plants to ozone and their use as biomonitors. *Environmental Pollution* 124: 419-428.
- Evans, L.S., Adamski II, J.H. & Renfro, J.R.** 1996. Relationships between cellular injury, visible injury of leaves, and ozone exposure levels for several dicotyledonous plant species at Great Smoky Mountains National Park. *Environmental and Experimental Botany* 36: 229-37.
- Faoro, F. & Iriti, M.** 2009. Plant cell death and cellular alterations induced by ozone: Key studies in Mediterranean conditions. *Environmental Pollution* 157: 1470-1477.
- Faoro, F. & Iriti, M.** 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biologia Plantarum* 49: 585-592.
- Faoro, F., Sant, S., Iriti, M., Maffi, D. & Appiano, A.** 2001. Chitosan-elicited resistance to plant viruses: a histochemical and cytochemical study. *In:* R.A.A. Muzzarelli (ed.). *Chitin Enzymology*. Atec, Grottamare, pp. 57-62.
- Fernandes, A.J.; Reis, L.A.M. & Carvalho, A.** 2002. Caracterização do meio físico. *In:* D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (orgs.). Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo. Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 51-62.

- Foyer C.H., Lescure J.C., Lefebvre C., Morot-Gaudry J.F., Vincentz M. & Vaucheret H.** 1994. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity. *Plant Physiology* 104: 171-178.
- Freedman, B.** 1995. Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses. 2 ed. Academic Press Inc., San Diego.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Domingos, M, Salatino, A. & Sanz, M.J.** 2007. *Psidium guajava* 'Paluma' (the guava plant) as a new bio-indicator of ozone in the tropics. *Environmental Pollution* 174: 691-695.
- Gardner, R.O.** 1975. Vanillin-hydrochloric acid as histochemical test for tannin. *Stain Technology* 50: 315-317.
- Gould, K.S., McKelvie, J. & Markham, K.R.** 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell & Environment* 25: 1261-1269.
- Grantz, D.A.** 2003. Ozone impacts on cotton: towards an integrated mechanism. *Environmental Pollution* 126: 331-344.
- Gravano, E., Giuliatti, V., Desotgiu, R., Bussotti, F., Grossoni, P., Gerosa, G. & Tani, C.** 2003. Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution. *Environmental Pollution* 121: 137-146.
- Gravano, E., Bussotti, F., Strasser, R.J., Schaub, M., Novak, K., Skelly, J. & Tani, C.** 2004. Ozone symptom in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. *Physiologia Plantarum* 121: 620-633.
- Günthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P.** 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: new diagnostic perspectives. *Environmental Pollution* 147: 467-488.

- Günthardt-Goerg, M.S., McQuattie, C.J., Scheidegger, C., Rhiner, C. & Matyssek, R.** 1997. Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 453-463.
- Heath, R.L.** 1994. Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynthesis Research* 39: 439-51.
- Heggestad, H.E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C, and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264-291.
- ICP Forest.** 2004. Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. B. Assessment of ozone symptoms. <http://www.icp-forests.org/> (acesso em 30.01.10).
- ICP Forest.** 2007. International Co-operative programme on assessment and monitoring on air pollution effects on forests. <http://www.icp-forests.org/> (acesso em 30.01.10).
- Iriti, M. & Faoro, F.** 2009. Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water Air Soil Pollution* 187: 285-301.
- Iriti, M., Belli, L., Nali, C., Lorenzini, G., Gerosa, G. & Faoro, F.** 2006. Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environmental Pollution* 141: 275-282.
- Johansen, D.A.** 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York.
- 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* 174: 489-506.
- Karnovsky, M.J.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- Kley, D., Kleinmann, M., Sanderman, H. & Krupa, S.** 1999. Photochemical oxidants: state of the science. *Environmental Pollution* 100: 19-42.

- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G. & Fomin, A.** 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). *Revista Brasileira de Botânica* 24: 511-518.
- Kraus, J.E. & Arduin, M.** 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora Universidade Rural, Rio de Janeiro.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.
- Krupa, S., McGrath, M.T., Andersen, C.P., Booker, F.L., Burkey, K.O., Chappelka, A.H., Chevone, B.I., Pell, E.J. & Zilinskas, B.A.** 2001. Ambient ozone and plant health. *Plant Disease* 85: 4-12.
- Molina, M.J. & Molina L.T.** 2004. Megacities and Atmospheric Pollution. *Air & Waste Management Association* 54: 644-680.
- Mulgrew, A. & Williams, P.** 2000. Biomonitoring of air quality using plants. WHO Collaborating Centre for Air Quality Management and Air Pollution Control/Federal Environmental Agency-Germany, Report 10, Berlin.
- Neill S.O. & Gould K.S.** 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* 30: 865–873.
- Novak, K., Skelly, J.M., Schaub, M., Kraüchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P.** 2003. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environmental Pollution* 125: 41–52.
- O'Brien, T.P. & McCully, M.E.** 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 368-373.
- O'Brien, T.P. & McCully, M.E.** 1981. The study of plant structure. Principles and Selected Methods. *Termacarphii*, Melbourne.

- Oksanen, E., Häikiö, E., Sober, J. & Karnosky, D.F.** 2003. Ozone-induced H_2O_2 accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytologist* 161: 791–799.
- Paoletti E., De Marco, A. & Racalbuto, S.** 2007. Why should we calculate complex indices of ozone exposure? Results from Mediterranean background sites. *Environmental Monitoring Assessment* 128: 19-30.
- Paoletti, E., Contran, N., Bernasconi, P., Günthardt-Goerg, M. & Vollenweider, P.** 2009. Structural and physiological responses to ozone in Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) leaves of seedlings and mature trees under controlled and ambient conditions. *Science of the Total Environment* 407: 1631-1643.
- Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Torre, G.D. & Ferranti, F.** 2003. Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 133: 1122–1134.
- Pedroso, A.N.V. & Alves, E.S.** 2008. Anatomia foliar comparativa das cultivares de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) sensível e tolerante ao ozônio. *Acta Botanica Brasilica* 22: 21-28.
- Pedroso, A.N.V.** 2009. Alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas em folhas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ (Solanaceae). Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Pell, E.J., Schlagnhauser, C.D. & Arteca, R.N.** 1997. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100: 264-273.
- Pellinen, P., Paiva, T. & Kangasjärvi, J.** 1999. Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal* 20: 349-356.
- Pina J.M. & Moraes, R.M.** 2007. Ozone-induced foliar injury in saplings of *Psidium guajava* ‘Paluma’ in São Paulo, Brazil. *Chemosphere* 66: 1310-1314.

- Pina J.M., Dias, A.P.S., Rinaldi, M.C.S. & Moraes, R.M.** 2007. *Psidium guajava* 'Paluma' é sensível às concentrações de ozônio verificadas em São Paulo. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 42-44.
- Pina J.M.** 2010. Trocas gasosas, sintomas foliares visíveis e atividade enzimática antioxidativa em plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostas em local contaminado por ozônio (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP). Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Pourcel L., Routaboul, J.M., Cheynier, V, Lepiniec, L. & Debeaujon, I.** 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* 12: 29-36.
- Reig-Armiñana, J., Calatayud, V., Cerveró, J., Garcia-Breijo, F.J., Ibars, A. & Sanz, M.J.** 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). *Environmental Pollution* 132: 321-331.
- Resende, M.L. V., Salgado, S.M.L. & Chaves, Z.M.** 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28: 123-130.
- Rezende, F.M & Furlan, C.M.** 2009. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. *Chemosphere* 76: 1445-1450.
- Reynolds, E.S.** 1963. The use of lead tissue citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* 17: 208.
- Roschina, V.V. & Roschina, V.D.** 2003. Ozone and plant cell. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Saitanis C.J. & Karandinos, M.G.** 2002 . Effects os ozone on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188: 51-58.
- Sawyer, R.F., Harley, R.A., Cadle, S.H., Norbeck, J.M., Slott & R. Bravo, H.A.** 2000. Mobile sources critical review: 1998 NARSTO assessment. *Atmospheric Environment* 34: 2161-2181.

- Soares, A.M.S. & Machado, O.L.T.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica* 1: 9-19.
- Sousa, A.V.G.** 1971. Contribuição ao estudo da anatomia foliar e da fisiologia de *Psidium guajava* Raddi. *Ciência e Cultura* 23: 373-382.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure.** 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.
- Vollenweider, P. & Günthardt-Goerg, M.S.** 2006. Erratum to “Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage” *Environmental Pollution* 140: 562-571.
- Vollenweider, P., Ottiger, M. & Günthardt-Goerg, M.S.** 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environmental Pollution* 124: 101–118.
- Watson, M. L.** 1958. Staining of tissues for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysics and Biochemistry Cytology* 4: 475.
- Yamasaki, H. Sakihama, Y. & Ikehara, N.** 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology* 115: 1405-1412.
- Yang, Y. He, F., Yu, L., Chen, X., Lei, J. & Ji, J.** 2007. Influence of drought on oxidative stress and flavonoid production in cell suspension culture of *Glycyrrhiza inflata* Batal. *Z. Naturforsch Journal* 62: 410-416.

ANEXO I

Dados relativos ao acúmulo de H_2O_2 em folhas de *Psidium guajava* 'Paluma' e fatores abióticos nas datas de coleta referente à exposição de **primavera**, utilizados para a análise de correlação de Pearson.

Data	Aba tot	Ada md	Ada tot	O3 md	O3 HL md	NO max	NO2 max	Nox max	O3 HL max	AOT40	T md	U md
8/10/2007	0	0,00	0,00	16,95	20,98	0,00	0,00	0	34,00	0	18,90	78,80
12/10/2007	0	17,17	103,00	21,59	38,80	30,30	40,60	54,30	110,20	433	21,46	68,98
20/10/2007	0	42,67	256,00	17,71	29,38	30,30	40,60	54,30	110,20	478,70	20,59	77,05
27/10/2007	0	0,00	0,00	13,95	20,53	155,40	43,30	197,80	110,20	490,10	20,18	80,32
10/11/2007	5	0,00	0,00	13,62	19,03	155,40	52,80	197,80	110,20	602	20,78	80,43
22/11/2007	0	0,00	0,00	12,49	16,45	155,40	52,80	197,80	110,20	602	20,32	80,70
24/11/2007	1	4,83	29,00	12,30	16,18	155,40	52,80	197,80	110,20	602	20,29	80,50
1/12/2007	2	0,00	0,00	12,03	15,89	155,40	52,80	197,80	110,20	602	20,13	80,25
8/12/2007	3	6,17	37,00	11,23	14,64	155,40	24,60	52,72	110,20	602	20,30	80,17
15/12/2007	1	37,00	222,00	11,06	14,87	155,40	24,60	52,72	110,20	671,1	20,33	80,76
22/12/2007	6	23,17	139,00	10,51	14,51	155,40	24,60	52,72	110,20	674,1	20,32	80,95

Aba tot = número total de indivíduos com acúmulo de H_2O_2 nas células epidérmicas da superfície abaxial; Ada md = média do total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H_2O_2 ; Ada tot = total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H_2O_2 ; O₃ md = média de ozônio ao longo dos dias de exposição; O₃ HL md = média de ozônio em horas com luz; NO max = valores máximos de óxido nítrico; NO₂ max = valores máximos de dióxido de nitrogênio; O₃ HL max = valores máximos de ozônio em horas com luz; AOT40 = valores de acumulados de ozônio com ultrapassagens de 40 ppb; T md = média de temperatura (°C); U md = média de umidade (%); Rad md = média de radiação (MJ/ m²).

Dados relativos ao acúmulo de H_2O_2 em folhas de *Psidium guajava* ‘Paluma’ e fatores abióticos nas datas de coleta referente à exposição de **verão**, utilizados para a análise de correlação de Pearson.

Data	Aba tot	Ada md	Ada tot	O3 md	O3 HL md	NO max	NO2 max	Nox max	O3 HL max	AOT40	T md	U md	Rad md
14/1/2008	0	0,00	0,00	7,24	16,85	13,80	11,00	21,00	28,70	159,90	21,69	84,90	16,30
19/1/2008	3	10,50	63,00	8,03	13,52	24,50	18,30	38,80	41,10	161,00	22,55	79,56	18,90
25/1/2008	5	52,00	314,00	5,46	8,05	80,00	18,30	38,80	41,10	161,00	18,64	82,55	15,78
2/2/2008	4	72,00	429,00	4,29	6,30	80,00	28,80	66,00	41,10	161,00	20,49	82,88	15,36
9/2/2008	6	45,00	270,00	4,03	5,73	80,00	28,80	66,00	41,10	161,00	20,63	83,37	15,32
16/2/2008	5	6,00	34,00	5,63	8,43	80,00	33,10	79,90	132,90	276,60	21,23	82,50	16,22
23/2/2008	6	33,00	197,00	6,09	8,88	80,00	64,30	115,30	132,90	276,60	21,38	82,79	16,27
1/3/2008	6	7,00	43,00	5,97	8,72	80,00	64,30	115,30	132,90	276,60	21,35	82,73	16,46
8/3/2008	6	7,00	40,00	6,04	8,88	80,00	64,30	115,30	132,90	276,60	21,66	80,81	17,30
15/3/2008	4	5,00	31,00	5,88	8,53	80,00	64,30	115,30	132,90	276,9	21,58	81,31	16,87
22/3/2008	6	0,00	0,00	6,20	9,15	80,00	64,30	115,30	132,90	339,2	21,48	81,60	16,53
29/3/2008	3	9,00	53,00	6,63	9,69	80,00	64,30	115,30	132,90	339,40	21,45	81,67	16,54
5/4/2008	6	11,00	16,00	10,37	80,00	64,30	115,30	132,90	521,2	21,30	21,27	81,76	16,34

Aba tot = número total de indivíduos com acúmulo de H_2O_2 nas células epidérmicas da superfície abaxial; Ada md = média do total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H_2O_2 ; Ada tot = total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H_2O_2 ; O₃ md = média de ozônio ao longo dos dias de exposição; O₃ HL max = média de ozônio em horas com luz; NO max = valores máximos de óxido nítrico; NO₂ max = valores máximos de dióxido de nitrogênio; O₃ HL max = valores máximos de ozônio em horas com luz; AOT40 = valores de acumulados de ozônio com ultrapassagens de 40 ppb; T md = média de temperatura (°C); U md = média de umidade (%); Rad md = média de radiação (MJ/ m²).

Dados relativos ao acúmulo de H_2O_2 em folhas de *Psidium guajava* 'Paluma' e fatores abióticos nas datas de coleta referente à exposição de **outono**, utilizados para a análise de correlação de Pearson.

Data	Aba tot	Ada md	Ada tot	O3 md	O3 HL md	NO max	NO2 max	Nox max	O3 HL max	AOT40	T md	U md	Rad md
08.04.08	1	18,83	113,00	0,00	0,00	14,20	40,70	11515,37	0,00	0,00	20,94	87,63	11,52
19.04.08	0	0,00	0,00	10,06	23,10	78,80	84,30	13289,32	138,30	583,08	21,09	82,33	13,29
17.05.08	4	9,00	54,00	5,16	9,96	49,00	47,75	13613,01	45,87	596,77	20,16	81,17	13,61
31.05.08	4	0,00	0,00	5,24	9,05	339,70	222,80	13121,23	138,30	596,77	18,38	80,80	13,12
07.06.08	4	13,67	82,00	5,24	9,05	339,70	222,80	13156,95	138,30	654,47	18,33	79,29	13,16
21.06.08	3	5,67	34,00	5,24	9,05	339,70	222,80	12879,23	138,30	658,67	18,17	79,78	12,88
28.06.08	5	9,17	55,00	5,24	9,05	339,70	222,80	12217,85	138,30	658,67	17,65	80,15	12,22

Aba tot = número total de indivíduos com acúmulo de H_2O_2 nas células epidérmicas da superfície abaxial; Ada md = média do total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H_2O_2 ; Ada tot = total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H_2O_2 ; O₃ md = média de ozônio ao longo dos dias de exposição; O₃ HL md = média de ozônio em horas com luz; NO max = valores máximos de óxido nítrico; NO₂ max = valores máximos de dióxido de nitrogênio; O₃ HL max = valores máximos de ozônio em horas com luz; AOT40 = valores de acumulados de ozônio com ultrapassagens de 40 ppb; T md = média de temperatura (°C); U md = média de umidade (%); Rad md = média de radiação (MJ/ m²).

Dados relativos ao acúmulo de H_2O_2 em folhas de *Psidium guajava* 'Paluma' e fatores abióticos nas datas de coleta referente à exposição de **inverno**, utilizados para a análise de correlação de Pearson.

Data	Aba tot	Ada md	Ada tot	O ₃ md	O ₃ HL md	NO max	NO ₂ max	O ₃ HL max	AOT40	T md	U md	Rad md
14.07.08	0	0,00	0,00			58,10	61,90		0,00	14,28	83,13	15,09
26.07.08	6	17,67	106,00	12,97	25,69	283,20	203,00	66,20	160,60	16,21	72,22	15,38
05.08.08	5	30,33	182,00	11,53	21,88	283,20	203,00	66,20	201,50	16,78	72,81	14,46
13.08.08	6	42,67	256,00	11,71	20,54	283,20	209,70	66,20	219,60	16,75	80,27	13,01
16.08.08	5	0,00	0,00	11,45	20,15	283,20	209,70	66,20	233,295	16,89	76,80	12,92
30.08.08	6	2,33	14,00	13,28	22,90	283,20	209,70	70,10	661,2919	17,23	75,53	13,89
06.09.08	3	0,00	0,00	14,31	24,35			70,10	734,7875	18,07	74,80	14,57
13.09.08	6	0,00	0,00	14,20	23,95			70,10	742,2875	17,67	75,22	14,56
20.09.08	3	0,00	0,00	13,98	23,04			70,10	742,2875	17,32	76,13	14,36
27.09.08	4	10,00	60,00	13,98	23,04			70,10	742,2875	17,16	76,52	14,50
08.10.08	3	7,17	43,00	13,71	22,11			70,10	777,3875	17,22	77,63	14,30

Aba tot = número total de indivíduos com acúmulo de H_2O_2 nas células epidérmicas da superfície abaxial; Ada md = média do total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H_2O_2 ; Ada tot = total de células epidérmicas da superfície adaxial com acúmulo de H_2O_2 ; O₃ md = média de ozônio ao longo dos dias de exposição; O₃ HL md = média de ozônio em horas com luz; NO max = valores máximos de óxido nítrico; NO₂ max = valores máximos de dióxido de nitrogênio; O₃ HL max = valores máximos de ozônio em horas com luz; AOT40 = valores de acumulados de ozônio com ultrapassagens de 40 ppb; T md = média de temperatura (°C); U md = média de umidade (%); Rad md = média de radiação (MJ/ m²).

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Poluição nos centros urbanos	1
I.2. Ozônio troposférico	2
I.3. Espécies reativas de oxigênio (EROs) e o estresse oxidativo	5
I.4. Bioindicação	7
I.5. Justificativa	11
II. OBJETIVOS	13
II.1. Objetivos específicos	13
III. MATERIAL E MÉTODOS	14
III.1. Local de estudo	14
III.2. Monitoramento dos dados ambientais	15
III.3. Obtenção das plantas	15
III.4. Coleta das amostras	18
III.5. Análises em microscopia fotônica e eletrônica de transmissão	19
III.5.1. Densidade estomática	20
III.6. Testes histoquímicos	21
III.6.1. Avaliação de substâncias fenólicas	21
III.6.2. Localização do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	21
III.7. Sintomas foliares visíveis	22
III.8. Análises estatísticas	23
IV. RESULTADOS	24
IV.1. Caracterização do ambiente de estudo	24
IV.2. Anatomia foliar de <i>Psidium guajava</i> ‘Paluma’	27
IV. 3. Compostos fenólicos	28
IV.3.1. Acúmulo de antocianina	28
IV.3.2. Testes histoquímicos para localização de fenóis	29
IV.4. Acúmulo de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	31
IV.5. Densidade estomática	35
IV.6. Análises estruturais	36
IV.7. Análises ultraestruturais	43
V. DISCUSSÃO	52
VI. CONCLUSÕES	64
VII. RESUMO	65
VIII. ABSTRACT	66
IX. LITERATURA CITADA	67
ANEXO I	76