

CRISTIANE AGUIAR SILVA

**Variações nas atividades enzimáticas antioxidantes  
em espécies nativas de Floresta Estacional  
Semidecidual na Região Metropolitana de  
Campinas, SP**

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

SÃO PAULO  
2014

CRISTIANE AGUIAR SILVA

**Variações nas atividades enzimáticas antioxidantes  
em espécies nativas de Floresta Estacional  
Semidecidual na Região Metropolitana de  
Campinas, SP**

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

ORIENTADORA: DRA. PATRICIA BULBOVAS

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Aguiar-Silva, Cristiane

S586v Variações das atividades enzimáticas antioxidantes em espécies nativas de Floresta Estacional Semidecidual na região metropolitana de Campinas, SP / Cristiane Aguiar Silva -- São Paulo, 2014.

71 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014

Bibliografia.

1. Poluição atmosférica . 2. Antioxidantes . 3. Estresse oxidativo. I. Título

CDU: 502.55

*Dedico este trabalho à minha família:*

*Ana Clara, Beatriz e João Carlos.*

*We are all connected; To each other, biologically.  
To the earth, chemically. To the rest of universe atomically.*



*Neil deGrasse Tyson*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, Patricia Bulbovas, pela confiança, paciência, orientação e dedicação desde a iniciação científica até o momento. Por aguentar minhas dúvidas, meus problemas pessoais, por acreditar em mim! Agradeço por todos esses anos de convivência compartilhando seu conhecimento comigo! Espero que seus próximos alunos te deem menos trabalho! Muito obrigada por tudo!!

À Dra. Marisa Domingos, por me dar a oportunidade de trabalhar num projeto grande dentro da minha área de estudo e no qual pude desenvolver meu projeto. Pelo exemplo profissional, por sempre me auxiliar nas dúvidas, questões pessoais e direcionar minha carreira como bióloga. Por acreditar na minha capacidade! Muito obrigada é pouco.

Ao Instituto de Botânica, pela infraestrutura e condições necessárias para a realização deste trabalho.

À coordenação e funcionários da Pós Graduação, principalmente a Marcinha, sempre disposta a tirar minhas dúvidas.

À Capes, pela bolsa de mestrado concedida a partir do segundo ano de mestrado.

Ao CNPQ, FAPESP e Petrobras, por todo auxílio financeiro que patrocinou os projetos maiores ao qual este estudo está vinculado.

Aos estagiários, alunos, pesquisadores e professores do Núcleo de Pesquisa em Ecologia do Instituto de Botânica. Principalmente para as funcionárias Amariles Celsa, Maria Auxiliadora e Valdenice Soares pela constante ajuda durante as análises laboratoriais e conversas no corredor e na cozinha. Não poderia deixar também de agradecer a Marli Bataglia, que apesar de ter se aposentado durante o período do mestrado, sempre esteve presente me apoiando e incentivando!

Um agradecimento especial aos amigos que fiz durante todo o período: Aninha Dias, Celle Dafré, Pedro Ivo, Ricks Nakasato, Jéss Nobre, Mari Esposito, Yukio Hayashi. Sem vocês os dias no laboratório, nos passeios, nas viagens e vida seriam sem graça! Obrigada por dividirem todos esses anos comigo.

Também não poderia deixar de agradecer ao povo de “Paulínia”. Claro que sem todos vocês esse trabalho não teria sido realizado. Patricia Bulbovas, Carla Sandrin, Patricia Giampaoli, Andressa Ribeiro, Leonardo Fujita, Solange Brandão, Marcela Engela. Esses 5 anos ao lado de vocês foi de muito crescimento pessoal e profissional, aperfeiçoamento e carinho. As idas ao campo sempre foram muito divertidas. Tenho certeza que a amizade permanecerá por muito tempo. E claro, ao Sr. Valdivino. Sem nosso querido mateiro hoje eu poderia estar perdida entre os “máfuas” das nossas matas ou ter caído num buraco até o Japão!

Um agradecimento mais que especial às amigas do coração que conquistei nesse projeto: Pati Giampa e Andressa. Obrigada por terem sido meu ombro, minha orelha e minhas companheiras nesses 5 anos. O fardo foi muito mais leve com a companhia de vocês! Quisera eu retribuir todo o carinho que vocês me proporcionaram neste período! Sintam-se abraçadas fraternalmente!

Às Dras. Márcia Inês, Mirian Rinaldi, Regina Moraes e Silvia Ribeiro, pelas incontáveis ajudas no laboratório, esclarecendo as dúvidas mais estúpidas sempre com disposição e atenção.

Às amigas e aos amigos da faculdade, que entenderam minha ausência durante o mestrado, principalmente agora na etapa final, sempre me apoiando, incentivando e muitas vezes me forçando a sair para esvaziar a cabeça. Em especial aos que estiveram mais presentes, Francine Faia, Fernanda Casseiro, Marjorie Tocchini, Thais Santos, Nati Lima e Jay Diniz.

Às demais pessoas que por ventura posso não ter citado, mas que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes para que este projeto fosse realizado. Obrigada!

À minha família, sem ela não existiria motivação para continuar.

Em especial à minha sobrinha Stephanie, minha mãe Marta, meu irmão Vagner e minha Vó Antonia. Esta que sempre acreditou muito no meu potencial e sempre me auxiliou a continuar na caminhada. Amo muito vocês!

À família que estou construindo.

À Ana Clara, por tornar o início do mestrado um tanto quanto conturbado, mas que motivou ainda mais a continuação do mesmo, me fazendo acreditar num futuro melhor e ir a busca dele. Que faz com que todos os meus dias tenham graça e alegria, com seu sorriso fácil e envolvente.

À Beatriz, que ainda nem saiu da barriga, mas já traz muita felicidade e ainda mais disposição para continuar o árduo e delicioso caminho da maternidade.

Ao João Carlos, meu amado marido e companheiro, que apoiou, motivou, incentivou, auxiliou no laboratório durante os finais de semana, entendeu minha ausência e sempre esteve ao meu lado.

Hoje me pergunto, o que seria da minha vida sem vocês???

A Deus, pela oportunidade de viver cada experiência, cada batalha, cada alegria! Que eu seja capaz de usar com sabedoria toda experiência vivida até aqui e possa transmitir à minha continuação os valores que de Ti compartilho!

*“Eu gostaria de lhe agradecer pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou. Pela sua capacidade de me olhar devagar, já que nessa vida muita gente já me olhou depressa demais”.*

*Pe. Fábio de Melo*

## ÍNDICE

<b>Resumo</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	11
<b>3. Material e Métodos</b> .....	12
<b>3.1 Área de Estudo</b> .....	12
<b>3.2 Espécies Estudadas</b> .....	15
<b>3.3 Coletas</b> .....	17
<b>3.4 Caracterização das condições ambientais da Região Metropolitana de Campinas</b> ....	18
<b>3.5 Análises das enzimas antioxidantes e dos indicadores de alterações bioquímicas</b> .....	19
<b>3.6 Análises estatísticas</b> .....	22
<b>4. Resultados</b> .....	23
<b>4.1 Perfil Meteorológico e de Poluentes</b> .....	23
<b>4.2 Análises Bioquímicas</b> .....	25
4.2.1 Análise das enzimas antioxidantes.....	30
4.2.2 Indicadores de Alterações Bioquímicas .....	32
<b>5. Discussão</b> .....	35
<b>6. Conclusão</b> .....	44
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	46

## ABREVIATURAS

AA – ácido ascórbico	MP – material particulado
APX – enzima ascorbato peroxidase	NaCl – cloreto de sódio
ARIE – Área de Relevante Interesse Ecológico	NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
CAT – enzima catalase	fosfato
CO – monóxido de carbono	NBT - azul p-nitrotetrazolio
CO <sub>2</sub> – dióxido de carbono	NO – Monóxido de nitrogênio
COVs – compostos orgânicos voláteis	NO <sub>2</sub> – Dióxido de nitrogênio
DHA – dehidroascorbato	NO <sub>x</sub> – Óxidos de nitrogênio
DPV - déficit de pressão de vapor	O <sup>•</sup> – Oxigênio atômico
DTNB - dithio-bis-(2-ácido nitrobenzoico)	O <sub>2</sub> – Gás oxigênio
DTT – dithiothreitol	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> – Radical superóxido
EAO – exposição acumulada de ozônio	O <sub>3</sub> – Ozônio troposférico
EDTA - etileno diamina ácido tetracético	OH <sup>•</sup> – Radical hidroxila
ERO – Espécie reativa de oxigênio	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> - oxigênio singleto
FCA – Fragmento florestal em Campinas	PAN – Nitrato de peroxiacetila
FCO – Fragmento florestal em Cosmópolis	PVPP - polyvinyl polypyrrolidone
FPA – Fragmento florestal em Paulínia	REPLAN – Refinaria do Planalto Paulista
GR – glutaciona redutase	RMC – Região Metropolitana de Campinas
GSH – glutaciona reduzida	RMSP – Região Metropolitana de São Paulo
GSSG – glutaciona oxidada	Rubisco - enzima ribulose-bisfosfato carboxilase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio	oxigenasse
HNO <sub>3</sub> – ácido nítrico	SOD – enzima superóxido dismutase
HPDC – hidroperóxido dieno conjugado	SO <sub>x</sub> – Óxidos de Enxofre
KI – iodeto de potássio	TCA - ácido tricloroacético
MDHA – monodeidroascorbato	

## Resumo

A toxicidade de poluentes atmosféricos às plantas deve-se ao seu alto poder oxidativo, gerando um quadro de estresse devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Contra a ação oxidativa das ERO, as células vegetais possuem um sistema de defesa antioxidante. Avaliar as respostas antioxidantes das espécies vegetais permite indicar o seu potencial de tolerância aos fatores de estresse oxidativo de origem ambiental. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi conhecer o perfil e a variação espacial e sazonal da atividade das enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidase - APX, glutathione redutase - GR, catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD) em *Astronium graveolens*, *Croton floribundus* e *Piptadenia gonoacantha*, e avaliar se estas são capazes de impedir ou restringir danos celulares por meio da análise de indicadores de danos bioquímicos (peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxido dieno conjugado - HPDC e teores de pigmentos). Para tanto, plantas das espécies citadas foram coletadas em três fragmentos florestais da Região Metropolitana de Campinas e avaliadas quanto ao seu sistema antioxidante e indicadores de danos bioquímicos. As coletas foram realizadas nas estações secas e chuvosas, dos anos de 2012 e 2013. A caracterização do ambiente (condições meteorológicas e qualidade do ar) também foi realizada e o conjunto de dados obtidos foi analisado estatisticamente. Entre os fragmentos florestais não foi possível observar uma tendência clara de que em algum deles as plantas estivessem sob maior ou menor efeito do estresse provocado pelas condições ambientais. Na estação úmida as plantas tiveram maior atividade de SOD e conteúdo de HPDC, tais resultados foram atribuídos à maior temperatura, radiação solar e concentração de O<sub>3</sub>. Na estação seca, as espécies apresentaram alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que atuou como sinalizador para atividade de APX e CAT, ocasionando baixa concentração de HPDC. Tais respostas possivelmente estiveram relacionadas às elevadas concentrações de SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, MP<sub>10</sub>. Comparando as espécies, *A. graveolens* teve menor atividade de APX e GR, elevadas concentrações de pigmentos e altos valores de HPDC. *C. floribundus* apresentou valores intermediários da atividade de enzimas e conteúdo de pigmentos. *P. gonoacantha* teve maior atividade de APX e GR e baixos teores de pigmentos. Analisando comparativamente o potencial de tolerância das espécies estudadas, pode-se concluir que *A. graveolens* é a menos tolerante e *P. gonoacantha* a mais tolerante.

## Abstract

The air pollution is toxic to plants because it is a powerful oxidizing agent that causes stress due to the formation of the reactive oxygen species (ROS). Against oxidative action of ROS, plant cells have an antioxidative defense system. Evaluating the antioxidative responses of plant species is possible to indicate the tolerance potential of them to oxidative stress in response to environmental stresses. Thus, the present study intended to know the activity profile and the spatial and seasonal variations of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase - APX, glutathione reductase - GR, catalase - CAT, superoxide dismutase - SOD) in *Astronium graveolens*, *Croton floribundus* and *Piptadenia gonoacantha*, and to evaluate if these enzymes could avoid cell damages measured through biochemical indicators (hydrogen peroxide - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydroperoxide diene conjugated - HPDC and pigment content). For this, plants were collected in three forest fragments in the Campinas Metropolitan Region and were evaluated in relation to their antioxidant system and biochemical indicators. Samples and environmental (meteorological and air quality) data were collected in the dry and rainy seasons of 2012 and 2013. The set of results were statistically analyzed. Plants from the different forest fragments did not show a clear tendency of greater or lesser stress condition caused by local environmental factors. During the wet season, plants had higher SOD activity and HPDC contents that could be attributed to higher temperature, solar radiation and concentration of O<sub>3</sub>. In the dry season, the species showed higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, which acted as a signal to stimulate the APX and CAT activities, causing low HPDC levels. Such responses were possibly related to the high concentrations of SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> and MP<sub>10</sub> in the air. Comparing the species, *A. graveolens* had lower activity of APX and GR and higher concentrations of pigments and HPDC. *C. floribundus* showed intermediate values of enzymes activity and pigments. *P. gonoacantha* had higher APX and GR activity and lower pigments contents. In general, *A. graveolens* was less tolerant and *P. gonoacantha* more tolerant in relation to environmental stresses.

## 1. Introdução

A poluição tem sido objeto de diversos estudos nas últimas décadas. A intensidade e velocidade de seu aumento em grandes concentrações urbanas e em áreas rurais têm sido consideradas as principais causas de desequilíbrio ambiental global, pois seus efeitos afetam de diversas formas os ecossistemas, os materiais e a saúde humana (Klumpp *et al.* 2000, Domingos *et al.* 2002, Emberson 2003).

A poluição atmosférica e o agravamento na qualidade do ar em países em desenvolvimento são evidentes. O aumento da densidade populacional, a maior circulação de veículos automotores, o rápido crescimento econômico e maiores índices de consumo de energia agravam ainda mais essa realidade (Deniz & Duzenli 2007).

Segundo a Resolução CONAMA nº003, de 28/06/1990, poluente atmosférico pode ser qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis que tornam ou possam tornar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem estar público, danoso aos materiais, a fauna e a flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e as atividades normais da comunidade (CONAMA, 1990).

A poluição do ar pode ter origem natural, por exemplo, através da emissão de grandes quantidades de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) por atividade vulcânica ou a liberação de gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) em processos de decomposição, e também antrópica, como a emissão de hidrocarbonetos e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) através da queima de combustíveis fósseis (Manahan 1999, Morais 2002). As fontes poluidoras podem ser móveis, aquelas que emitem os poluentes ao longo de um curso com maior contribuição dos veículos automotores, ou estacionárias, que produzem carga pontual de poluentes como a produção industrial, a geração de energia e a queima de florestas (Baek *et al.* 1991).

Os poluentes são classificados de acordo com sua origem, estado físico e composição química (Domingos *et al.* 2002, Esposito *et al.* 2009). Basicamente são distinguidos em primários, aqueles emitidos diretamente pela fonte poluidora, como o material particulado (MP), hidrocarbonetos e óxidos de enxofre (SO<sub>x</sub>) e nitrogênio (NO<sub>x</sub>), e secundários, formados a partir das interações entre os poluentes primários ou entre estes e os constituintes naturais da atmosfera em determinadas condições meteorológicas, por exemplo, temperatura e luminosidade, como no caso do ozônio (O<sub>3</sub>) e ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) (Braga *et al.* 2006, Derisio 2007, CETESB 2012).

Em relação ao seu estado físico, os poluentes atmosféricos podem apresentar-se sob a forma gasosa, líquida e sólida. Entre os gasosos têm-se o monóxido e dióxido de carbono (CO e CO<sub>2</sub>), o ozônio (O<sub>3</sub>), os óxidos de enxofre (SO<sub>x</sub>) e de nitrogênio (NO<sub>x</sub>). Já na forma líquida, citam-se principalmente as névoas e, sob a forma sólida as poeiras, fumaça, fuligem e material particulado (MP) em suspensão (Saldiva *et al.* 1995).

A composição e variação da concentração dos poluentes na atmosfera dependem de componentes temporal e espacial, de acordo com as condições meteorológicas e a localização das fontes de emissão (Miguel 1992, Peñuelas *et al.* 1999). Por exemplo, a circulação do ar depende de fatores como: brisa marítima, circulação provocada pelo relevo (vale e montanhas) e efeitos urbanos como barreiras provocadas pelas construções civis e ilhas de calor (Oliveira *et al.* 2003). Também, a interação entre as concentrações de poluentes emitidos no ar pelas diversas fontes e as condições climáticas locais determina a qualidade do ar (INEA 2010), que também pode mudar em função das condições meteorológicas que determinam uma maior ou menor diluição dos poluentes (CETESB 2012).

Em São Paulo, por exemplo, altas concentrações de SO<sub>x</sub> e MP ocorrem no inverno, período com clima não favorável à dispersão de poluentes. Já no verão, pelas condições climáticas permitirem maior circulação atmosférica, as concentrações desses poluentes são reduzidas,

enquanto há maior formação de ozônio devido à maior incidência de radiação solar (CETESB 2012).

O *smog* fotoquímico, possivelmente uma combinação das palavras em inglês *smoke* (fumaça) e *fog* (neblina), é um fenômeno que assinala o que foi descrito acima, pois é caracterizado pelo acúmulo de poluentes no ar em consequência de inversões térmicas, condição topográfica local ou persistência de sistemas atmosféricos de alta pressão que ocorre sob determinadas condições meteorológicas, iniciado pela ação da luz solar, na presença de NO<sub>x</sub> e compostos orgânicos voláteis (COVs), promovendo uma complexa cadeia de reações capaz de produzir O<sub>3</sub>, nitrato de peroxiacetila (PAN), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), entre outros. (Seinfeld 1985; Krupa & Manning 1988; Miguel 1992; Souza & Carvalho 1998; Sawyer *et al.* 2000; Oga 2003).

A maioria das atividades humanas realizadas em larga escala influencia a composição de substâncias da atmosfera tornando-a prejudicial à saúde e ao desenvolvimento dos ecossistemas, no qual a qualidade de vida depende (Morais 2002). Muitos dos constituintes atmosféricos podem influenciar o rendimento das safras agrícolas tanto diretamente, prejudicando crescimento e qualidade, quanto indiretamente, alterando a resistência da planta a estresses bióticos e abióticos (Weigel & Bender 2009), ocasionando grandes perdas econômicas. Além dos cultivos, os poluentes também podem afetar espécies nativas pertencentes a diferentes grupos funcionais e a vegetação como um todo, resultando em alterações em comunidades e ecossistemas (Freedman 1995, Agrawal & Agrawal 1999).

O efeito que um determinado poluente provoca encontra-se no final de uma cadeia de eventos, começando com a emissão do poluente pela fonte emissora, seguida por sua dispersão no ambiente pela ação de fatores climáticos, que finalmente determinam as concentrações que atingem e afetam os organismos vivos ou materiais (Klumpp *et al.* 2001). No entanto, a magnitude do dano e o tipo de resposta dependem de características químicas e físicas de cada poluente, da concentração e duração da exposição, das condições climáticas e de características intrínsecas da espécie

estudada, que pode ser sensível, resistente ou tolerante a cada poluente. A resposta pode, inclusive, variar entre indivíduos de uma mesma espécie, em diferentes variedades ou frequências gênicas. Características como hábito, forma de crescimento, idade, fase de atividade e vigor geral da planta também são importantes (Krupa *et al.* 2001, Manning 2003, Klumpp *et al.* 2006).

Dentre as diversas consequências da exposição à poluição aérea, pode-se destacar a diminuição da fotossíntese com alterações nas membranas e nos tilacóides do cloroplasto, mudanças na fluorescência da clorofila, e principalmente a queda na concentração e inativação da enzima ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), que apresenta grande sensibilidade ao aumento do O<sub>3</sub> (Iriti & Faoro 2007, Dizengremel *et al.* 2008); alterações na eficiência hídrica, com diminuição da entrada de água e sais pelas raízes; aumento de infecções por patógenos (Klumpp *et al.* 2006, Heath 2008); efeitos deletérios na floração e na formação do tubo polínico gerando perda na produtividade (Sharma & Davis 1997); e por fim aceleração da senescência foliar (Krupa & Manning 1988). Estes efeitos em processos bioquímicos e fisiológicos causam danos não somente em nível celular, mas também podem afetar os indivíduos da floresta, podendo levá-los à morte (Tausz *et al.* 2003, Tausz *et al.* 2007). Dependendo da intensidade do estresse e sensibilidade das espécies, podem ocorrer mudanças na estrutura da população e comunidade. Como consequência, a relação de competição entre espécies é alterada, assim como os processos sucessionais, podendo ocorrer também redução da diversidade biológica, simplificação e degradação do ambiente (Domingos *et al.* 2002, Shriner & Karnosky 2003).

Os poluentes gasosos entram nas plantas através dos estômatos durante o processo de trocas gasosas, seguindo, por exemplo, o mesmo caminho do CO<sub>2</sub> dentro da folha e sofrendo as mesmas resistências que este gás para entrar nas células do mesofilo, ou por meio da absorção nas raízes quando depositados no solo (Iqbal *et al.* 1996, Massman *et al.* 2000, Singh *et al.* 2010).

Dentro do tecido foliar, podem sofrer reações que formam espécies reativas de oxigênio (ERO). O apoplasto é o primeiro local de formação e ação das ERO, que são consideradas como

indutoras das respostas celulares. Elas apresentam oxigênio em sua composição e são bastante oxidativas. Podem ser radicais, que são moléculas que possuem elétrons desemparelhados, ou não radicais. E por serem altamente oxidativas, atacam rapidamente moléculas vitais, como lipídeos, ácidos nucleicos, proteínas, membranas, pigmentos e outros componentes dentro e fora das células vegetais, causando distúrbios celulares que podem até acarretar na morte celular (Lascano *et al.* 1998, Halliwell & Gutteridge 2007, Overmyer *et al.* 2009).

No entanto, as ERO também são produzidas naturalmente nas plantas através de seus processos metabólicos (Gill & Tuteja *et al.* 2010). Elas são formadas durante certas reações de oxidação e redução (redox) e durante a redução incompleta do oxigênio ou oxidação da água pela cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto ou na mitocôndria (Bray *et al.* 2000). Organelas como cloroplastos, mitocôndrias ou peroxissomos com uma atividade metabólica altamente oxidante ou com intenso fluxo de elétrons são uma importante fonte de ERO em células vegetais (Gill & Tuteja 2010).

A produção de ERO nas células vegetais é reforçada por condições bióticas e abióticas que limitam a fixação de CO<sub>2</sub>, como a seca, salinidade, deficiência de nutrientes, extremos de temperatura – calor e frio, e pela combinação desses fatores com alta luminosidade, além da poluição aérea como mencionado anteriormente. Todas essas condições geram o estresse oxidativo (Foyer & Noctor 2003, Miller *et al.* 2008, Gill & Tuteja 2010).

Entre as principais ERO que causam danos celulares, destacam-se radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) e as formas não- radicais (moleculares) peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Bray *et al.* 2000, Pastori & Foyer 2002, Gill & Tuteja 2010).

O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é formado quando elétrons são mal direcionados e doados ao oxigênio. Sua formação é resultante da transferência de elétrons no cloroplasto ou mitocôndria e oxida várias moléculas orgânicas, como o ascorbato, ou atua como redutor de metais, como o ferro. Pode ser produzido na planta por meio de vários mecanismos (Deuner *et al.* 2008). Acredita-se que o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> possa ser

substrato para outros radicais tóxicos, tornando sua remoção essencial para a integridade da célula (Yunus & Iqbal 1996).

Os  $\text{OH}^-$  são os mais potentes oxidantes conhecidos, embora tenham meia vida curta, possuem alta afinidade com biomoléculas no seu sítio de produção (Halliwell & Gutteridge, 2007). Causam sérios danos aos componentes celulares e em macromoléculas, além de peroxidação lipídica, mutação de DNA e desnaturação de proteínas, podendo acarretar disfunções metabólicas irreparáveis e até a morte celular (Scandalios 1993).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é uma das mais estáveis formas de ERO, embora moderadamente reativa. Pode oxidar proteínas, por exemplo, através da conversão de grupos tióis para ácidos sulfênicos (SOH) e através da inativação de grupos ferro-enxofre (Mhamdi *et al.* 2012). É gerado durante o estresse oxidativo e é formado nos peroxissomos como parte da via fotorrespiratória (Neill *et al.* 2002). Possivelmente desempenha uma função na sinalização de resposta de defesa, não só contra patógenos, mas também para estresses abióticos, como alterações térmicas ou excesso de luz, devido a sua alta estabilidade e longa meia vida (Vranová *et al.* 2002, Gratão *et al.* 2005). Outros processos biológicos que utilizam a sinalização do  $\text{H}_2\text{O}_2$  também são a morte celular programada e o fechamento estomático (Neill *et al.* 2002).

O  $^1\text{O}_2$  predominantemente é gerado nos cloroplastos por meio de transferência de elétrons de uma clorofila foto-excitada para o elétron do oxigênio molecular. Reage com a maioria das moléculas biológicas, sendo altamente destrutivo. No entanto, a maioria dos danos ocorre próximo ou em seu sítio de produção (Foyer *et al.* 1994).

Assim como a formação das ERO é um fenômeno natural na célula, as plantas também possuem um sistema de defesa natural contra o efeito oxidante das ERO, conhecido como sistema de defesa antioxidante. Estes estão situados em diversos compartimentos subcelulares e são capazes de evitar os danos causados pelo estresse oxidativo, demonstrando a importância da desintoxicação das ERO para a sobrevivência celular (Halliwell & Gutteridge 2007).

Os poluentes de origem antrópica podem provocar a produção excessiva de ERO causando danos diversos (Pedroso 2006, Bray *et al.* 2000). A intensidade desses às plantas dependerá de sua capacidade de oxi-redução e da eficiência do sistema celular antioxidante em manter o equilíbrio oxidante-antioxidante (Bray *et al.* 2000). Plantas com conteúdos altos e/ou alta capacidade de oxi-redução são mais tolerantes à poluição aérea (Guzy & Heath 1993, Iqbal *et al.* 1996, Gadallah 2000).

O sistema de defesa antioxidante tem papel fundamental na aquisição de tolerância pelas plantas. Entre as principais funções desse sistema destacam-se a proteção ao aparato fotossintético, remoção de radicais livres, preservação de membranas e proteção de biomoléculas contra possíveis danos em suas estruturas, entre outras (Halliwell & Gutteridge 2007, Deuner *et al.* 2008).

De acordo com Rendón *et al.* (2013), os principais componentes do sistema de defesas antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos, encontrados principalmente em meio intracelular (superóxido dismutase, catalase, guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase, entre outras) e pequenas moléculas não-enzimáticas, que podem ser subdivididas em solúveis em água (ácido ascórbico, bilirrubina e glutathione) ou solúveis em lipídios ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno e licopeno).

O processo de defesa antioxidante, contra a ação das ERO, é iniciado com a enzima superóxido dismutase (SOD), considerada a primeira linha de defesa em nível celular atuando como importante proteção contra o  $O_2^-$ , dismutando esse radical a  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Favaretto *et.al* 2011). As SODs são metaloenzimas que ocorrem em três isoformas diferentes nos vegetais, de acordo com o metal presente no sítio ativo, sendo manganês SOD (MnSOD), cobre/zinco SOD (Cu/ZnSOD) e ferro SOD (FeSOD) (Culotta 2001, Alscher *et al.* 2002).

O  $H_2O_2$ , formado na reação catalisada pela SOD, é convertido em água por meio da oxidação do ácido ascórbico a ácido monodeidroascórbico, em reação catalisada pela enzima ascorbato peroxidase (APX). A enzima catalase (CAT) igualmente contribui para a conversão de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio molecular. A oxidação da glutathiona reduzida (GSH) também permite a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ainda previne a peroxidação dos lipídios, elimina o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). A redução do ácido monodeidroascórbico (MDHA) a ácido ascórbico (AA) ocorre por ação da enzima monodeidroascorbato redutase (MDHR) nos cloroplastos ou por sua dismutação espontânea, por ser uma molécula instável, a dehidroascórbico (DHA), que reage com a glutathiona (GSH), produzindo AA e glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG, por sua vez, é reduzida pela glutathiona redutase (GR), por meio do consumo de NADPH. Na condição reduzida, ácido ascórbico e glutathiona podem ser novamente utilizados, caracterizando o denominado Ciclo Foyer-Halliwell-Asada (ou simplesmente ciclo ascorbato-glutathiona). Para completar as defesas, os danos provocados pelo oxigênio singlete e íons hidroxila podem ser também minimizados por outros antioxidantes não enzimáticos, entre os quais  $\alpha$ -tocoferol e carotenóides. A figura 1.1 ilustra parte das reações que acontecem no ciclo ascorbato – glutathiona e também como as defesas antioxidantes funcionam de forma integrada (Bray *et al.* 2000, Dizengremel *et al.* 2008, Halliwell & Gutteridge 2007).

Quando as ERO não estão em excesso no tecido celular, o ciclo ascorbato – glutathiona mantém o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante nas células. O aumento na produção das ERO pelos fatores ambientais já mencionados, causadores de estresse oxidativo, pode levar a alteração desse equilíbrio, momento em que os danos oxidativos podem acontecer (Muggli 1993, Bray *et al.* 2000). Sendo assim, a análise das respostas antioxidantes ao estresse oxidativo, bem como de danos causado por esse, podem contribuir para a descrição e avaliação do potencial redox das espécies vegetais aos múltiplos estresses aos quais os ecossistemas florestais estão submetidos, mostrando sua capacidade de tolerância e perpetuação nesses ecossistemas.



Observa-se que grande parte dos estudos sobre os efeitos da poluição sobre florestas são realizados no Hemisfério Norte (Emberson *et al.* 2001, Emberson 2003) . Ainda é muito difícil delimitar a magnitude dos danos causados por poluentes em comunidades vegetais naturais nos países de clima tropical, simplesmente por falta de conhecimento das espécies, apesar de já terem sido verificados níveis de poluição ambiental suficientemente altos para causarem efeitos perceptíveis em espécies isoladas ou em comunidades vegetais. A situação no Brasil, em particular, não é diferente (Klumpp *et al.* 2000, Domingos *et al.* 2002).

No Brasil, o nível de contaminação ambiental por fontes antrópicas é extremamente variável, em função da forte diferenciação no desenvolvimento industrial e urbano ao longo de seu extenso território. O planejamento inadequado para instalação dos complexos industriais e o crescimento desordenado das cidades podem restringir a dispersão dos poluentes, resultando em um acréscimo ainda maior na contaminação atmosférica. As práticas agrícolas e a queima da vegetação são fatores adicionais que também contribuem para o aumento dos níveis de contaminação ambiental em algumas regiões do Brasil (Domingos *et al.* 2002, Molina & Molina 2004), como pode ser observado na Região Metropolitana de Campinas (RMC) (Boian & Andrade 2012).

O monitoramento de respostas antioxidativas em plantas que vivem em locais poluídos oferece uma boa indicação do potencial de tolerância das plantas aos fatores de estresse oxidativo de origem ambiental e, em última análise, de sua condição de sobrevivência. Na literatura, existem alguns trabalhos que avaliaram as respostas antioxidantes de espécies vegetais em florestas submetidas à poluição atmosférica. Entre eles podem ser citados os diversos estudos realizados em florestas de *Pinus ponderosa* em San Bernadino, na Califórnia (Tausz *et al.* 1998, Tausz *et al.* 2001, Tausz *et al.* 2003), em florestas da Índia (Agrawal & Singh 2000) e em florestas de clima temperado da Alemanha (Tausz *et al.* 2007). No entanto, no Brasil, tal abordagem metodológica nunca foi aplicada.

## 2. Objetivos

Tendo em vista as considerações acima apresentadas, este trabalho teve por objetivos:

- Conhecer o perfil da atividade enzimática antioxidante (enzimas ascorbato peroxidase, glutathione redutase, catalase, superóxido dismutase) de espécies arbóreas nativas de Floresta Estacional Semidecidual (*Astronium graveolens* Jacq., *Croton floribundus* Spreng e *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr) e avaliar se estas são capazes de impedir ou restringir danos celulares, indicados por meio dos teores de pigmentos e do acúmulo de peróxido de hidrogênio e hidroperóxido dieno conjugado;
- Determinar a variação espacial - diferentes fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual atingidos por diferentes tipos e níveis de contaminantes atmosféricos - e sazonal - período seco e chuvoso - nestas mesmas reações indicadoras de estresse oxidativo;
- Analisar comparativamente o potencial das atividades enzimáticas antioxidantes das espécies estudadas.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Área de Estudo

A Região Metropolitana de Campinas (RMC) situa-se no Planalto Paulista e está incluída na faixa de vegetação abrangida pelo Domínio Atlântico, sendo referida como Mata Atlântica *sensu lato* (s.l.). A RMC, formada por 19 municípios, possui cerca de 2,3 milhões de habitantes e ocupa uma área de 3348 km<sup>2</sup>. Está situada na região sudeste do Estado de São Paulo e distante cerca de 130 km da capital, com altitudes variando de 550 a 680 metros. Seu clima é caracterizado como tropical de altitude, com verão chuvoso e inverno seco, sendo que o município de Campinas, sede da região, apresenta temperatura média anual de 21,4 °C, com a média das temperaturas mínimas no mês mais frio de 11°C e a média das temperaturas máximas nos meses mais quentes de 29°C. A precipitação média anual é de 1470 mm, sendo que aproximadamente 80% ocorrem no período de outubro a março (Gutjahr & Tarifa 2004; Prezotti & Tresmondi 2006; Ferreira *et al.* 2007, Boian & Andrade 2012).

Muitos dos municípios da região possuem alto grau de industrialização, de serviços e desenvolvimento agrícola. Todas essas atividades trouxeram diversos problemas de ordem ambiental. Destacam-se a cidade de Campinas, com população superior a um milhão de habitantes e frota veicular aproximada de 1,1 milhão de veículos, responsável por parte significativa da poluição atmosférica, e o município de Paulínia, que conta com um grande parque industrial, constituído principalmente por indústrias petroquímicas. Nessa região também se encontram várias áreas onde são realizadas queimas de palha de cana-de-açúcar, fonte também significativa de poluentes para a atmosfera. (Prezotti & Tresmondi 2006, CETESB 2012).

Estudos realizados na área de influência do Parque industrial de Paulínia, que abrange vários municípios da RMC, indicam elevadas concentrações de poluentes (Clemente 2000, Tresmondi 2003). O desenvolvimento de atividades econômicas na região teve início com a instalação do Pólo

Petroquímico de Paulínia. O município abriga a Refinaria do Planalto Paulista (REPLAN) desde 1972, que transformou a cidade em pólo industrial gerando grande crescimento populacional e urbano (Gutjahr & Tarifa 2004, Prezotti & Tresmondi 2006). O desenvolvimento industrial acelerado da região intensificou o transporte por meio de veículos movidos a combustível fóssil, contribuindo para o declínio da qualidade do ar (Carmo & Hogan 2006). É frequente na RMC picos de concentração de O<sub>3</sub> acima dos limites propostos pelo padrão de qualidade do ar (CETESB 2009), assim como, elevadas concentrações de óxidos de enxofre (SO<sub>x</sub>) e nitrogênio (NO<sub>x</sub>) (Carmo & Hogan 2006), representando risco à saúde humana, fauna e flora da região (Klumpp *et al.* 2000; Derisio 2007).

Na RMC, grande parte da floresta remanescente está fragmentada em pequenas áreas, na maioria das vezes, isoladas umas das outras. No meio rural, permanecem nos locais mais íngremes, nos terrenos alagados ou nos topos de morro e estão cercados pelo uso agrícola, geralmente plantações de cana-de-açúcar (Moura 2013). Parte dos remanescentes de vegetação nativa está inserida em unidades de conservação como, por exemplo, a Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) Mata de Santa Genebra, no município de Campinas e a ARIE Matão de Cosmópolis, no município de Cosmópolis (Carmo & Hogan 2006).

Entre esses remanescentes, foram escolhidos três fragmentos florestais para a realização deste projeto (Figura 3.1), os quais estão citados abaixo. Sua localização geográfica e siglas são apresentadas na tabela 3.1:

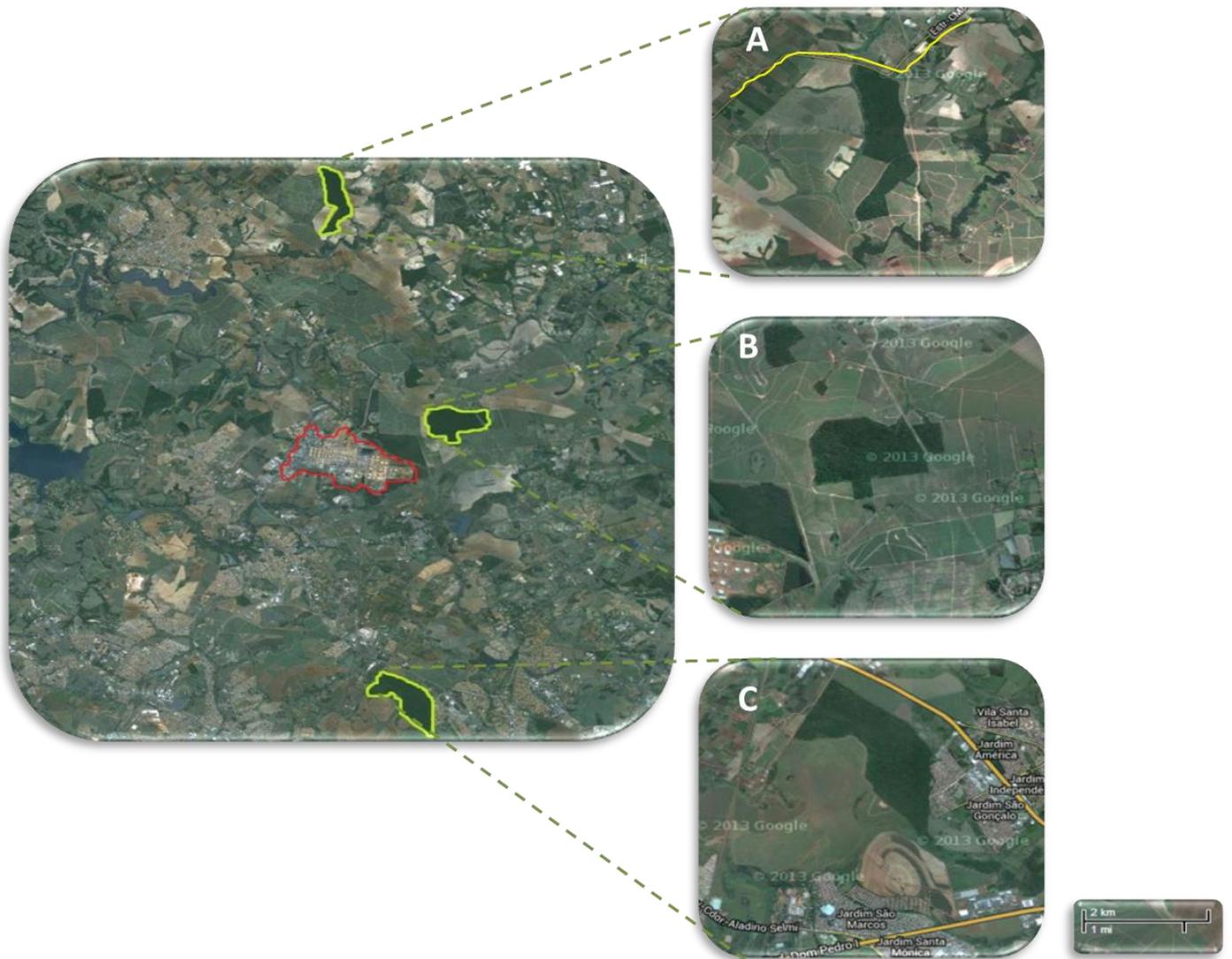
- ARIE Mata de Santa Genebra, situada em área urbano-rural no município de Campinas, e exposta principalmente a poluentes oriundos do tráfego de automóveis e, de acordo com Boian & Andrade (2012), também por poluentes transportados da Região Metropolitana de São Paulo;

- ARIE Matão de Cosmópolis, em Cosmópolis, localizada na direção predominante dos ventos vindos da região do Pólo Industrial, fortemente influenciada pelos poluentes advindos desta e também por poluentes oriundos da atividade agrícola presente no seu entorno.

- Fragmento florestal na Fazenda Meia Lua, em Paulínia, localizado próximo da refinaria de petróleo e cercado por plantação de cana de açúcar e soja.

**Tabela 3.1.** Siglas dos fragmentos florestais estudados, sua área de ocupação e localização geográfica.

<b>Município</b>	<b>Sigla</b>	<b>Área (ha)</b>	<b>Localização (coordenadas)</b>
<b>Cosmópolis</b>	FCO	119,9	22°36'59.52"S 47° 8'2.31"W
<b>Paulínia</b>	FPA	188,9	22°42'50.23"S 47° 5'18.59"W
<b>Campinas</b>	FCA	233,5	22°49'36.81"S 47° 5'18.59"W



**Figura 3.1.** Foto de satélite da Região Metropolitana de Campinas. Em detalhe os fragmentos florestais (verde) e a Refinaria do Planalto Paulista – REPLAN (vermelho). FCO - Cosmópolis (A), FPA – Paulínia (B), FCA - Campinas (C). Fonte: Google Maps. Acesso em julho de 2013.

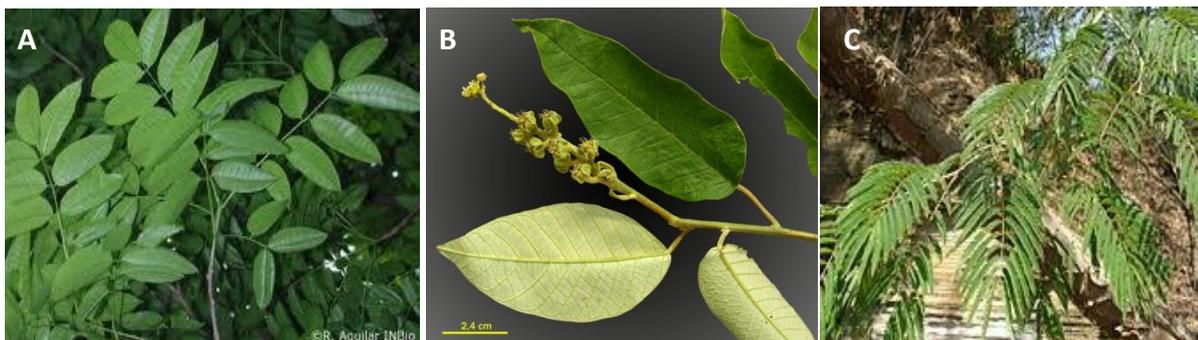
### 3.2 Espécies Estudadas

O estudo foi realizado com três espécies nativas, previamente escolhidas através de levantamento florístico realizado nos locais de estudo. As espécies estudadas foram *Astronium graveolens* Jacq., *Croton floribundus* Spreng. e *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr (Figura 3.2), por apresentarem grande representatividade nestes fragmentos e pertencerem a estágios sucessionais diferentes.

O *Astronium graveolens* Jacq., conhecido popularmente como Guaritá, pertence a família Anacardiaceae e é considerada uma espécie secundária tardia na sucessão ecológica. Ocorre em Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Densa e Mista e também em matas ciliares. Sua distribuição geográfica vai da região sudeste até a nordeste, nos estados BA, ES, MG, PR, RJ e SP. Sua dispersão é anemocórica e a floração ocorre do início do inverno ao início da primavera e a frutificação na primavera. É uma espécie decídua, perdendo suas folhas antes da floração. As folhas novas aparecem juntamente com as flores no final da estação seca (Engel *et al.* 1984, Carvalho 1994, Lorenzi 2002, Guaratini *et al.* 2008).

*Croton floribundus* Spreng. é conhecido popularmente Capixingui, pertence a família Euphorbiaceae e sua ocorrência é principalmente na Floresta Estacional Semidecidual. É classificado como espécie pioneira na sucessão ecológica. Ocorre nos estados MG, MS, PR, SP e RJ. Apresenta crescimento muito rápido e ciclo de vida curto, muito abundante em formações secundárias, repovoando clareiras e proliferando em bordas de mata. A floração ocorre de meados do inverno ao início da primavera e a frutificação ocorre em meados do verão a meados do outono. (Engel *et al.* 1984, Carvalho 1994, Lorenzi 2002, Durigan *et al.* 2002, Guaratini *et al.* 2008).

*Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr, é uma espécie conhecida popularmente como Pau Jacaré ou Angico, pertence a família Fabaceae. É considerada secundária inicial na sucessão ecológica. Ocorre em Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Densa e Mista, com distribuição nos estados BA, ES, MG, MS, PR, RJ, SC e SP. A floração ocorre da primavera ao outono e a frutificação vai do inverno ao verão. No caule há presença de acúleos, característicos da espécie, com até 2cm de comprimento em maior ou menor quantidade. (Engel *et al.* 1984, Carvalho 1994, Lorenzi 2002, Guaratini *et al.* 2008).



**Figura 3.2.** Espécies nativas analisadas neste estudo. *Astronium graveolens* Jacq. (A), *Croton floribundus* Spreng.(B) e *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr (C). Fonte: Google imagem/ www.ib.usp.br.

### 3.3 Coletas

As coletas foram feitas nas estações chuvosas (período úmido) e secas (período seco) entre fevereiro de 2012 e agosto de 2013, totalizando quatro amostragens, conforme Tabela 3.2. Cada uma foi realizada durante oito dias em duas semanas consecutivas (quatro dias por semana). As coletas diárias foram divididas em dois horários, às 10h e às 13h ou às 11h e às 14h, quando em horário de verão.

As amostras das espécies vegetais foram coletadas em estado vegetativo de indivíduos arbóreos presentes na borda norte dos fragmentos florestais, com PAP  $\geq 30$  cm, por meio do uso de tesoura de alta poda (podão). Foram utilizadas folhas de 5 a 6 indivíduos de cada espécie, de acordo com a disponibilidade, para formar uma amostra composta. Foram retiradas folhas totalmente expandidas, maduras, sem herbivoria e expostas ao sol. A escolha dos indivíduos presentes neste lado da borda possibilita coletar folhas que estão sob maior exposição ao sol, e possivelmente, interagindo mais com a atmosfera devido aos processos fotossintéticos. Sendo assim, há maior possibilidade de entrada dos poluentes nestes indivíduos. Este procedimento foi baseado em estudos de efeitos de poluentes atmosféricos em florestas na Europa (ICP 2005).

Após a coleta, as amostras foliares foram homogeneizadas, separadas em alíquotas, identificadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e levadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Ecologia do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo. No laboratório, todo material vegetativo foi armazenado em freezer -80°C, para a realização das análises bioquímicas das enzimas antioxidantes e indicadores de danos bioquímicos, por meio de métodos previamente testados para as espécies estudadas. Cada amostra composta foi analisada em triplicata de acordo com as metodologias descritas abaixo.

**Tabela 3.2.** Datas das coletas realizadas.

<b>Coleta</b>	<b>Data</b>	<b>Estação</b>
<b>1<sup>a</sup></b>	06 a 09 fevereiro 2012 13 a 16 fevereiro 2012	Úmida 12
<b>2<sup>a</sup></b>	23 a 26 julho 2012 30 julho a 02 agosto 2012	Seca 12
<b>3<sup>a</sup></b>	28 a 31 janeiro 2013 04 a 07 fevereiro 2013	Úmida 13
<b>4<sup>a</sup></b>	05 a 08 agosto 2013 12 a 15 agosto 2013	Seca 13

### **3.4 Caracterização das condições ambientais da Região Metropolitana de Campinas**

Para melhor compreensão das respostas bioquímicas das espécies estudadas aos efeitos do ambiente, dados meteorológicos (temperatura, umidade relativa e direção e velocidade dos ventos) e poluição atmosférica (ozônio, óxidos de nitrogênio e enxofre e material particulado) foram obtidos nas estações de monitoramento da CETESB presentes na cidade de Paulínia e Americana. Ainda com os dados de temperatura e umidade relativa foi calculado o Déficit de Pressão de Vapor (DPV), por meio da calculadora automática, elaborada por Autogrow System Ltd.

(<http://www.autogrow.com/downloads/download-software-and-drivers>). Além disso, também foram usados dados de precipitação cedidos pela Petrobras. Para a caracterização da estação úmida foram considerados os dados dos meses de dezembro a março e para estação seca, os de junho a setembro.

### **3.5 Análises das enzimas antioxidantes e dos indicadores de alterações bioquímicas**

#### **a) Enzimas antioxidantes:**

As análises das enzimas foram expressas por unidade de proteína. Para determinação de proteínas e das atividades das enzimas glutathione redutase, catalase e ascorbato peroxidase, as amostras vegetais foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (100mM pH 7,5) contendo etileno diamina ácido tetracético - EDTA (1mM), dithiothreitol - DTT (3mM) e 4% (p/v) de polyvinyl polypyrrolidone - PVPP. O extrato resultante foi centrifugado a velocidade de 10.000 rpm, por 30 minutos, a temperatura de 4°C (Azevedo *et al.* 1998). O sobrenadante foi coletado, dividido em alíquotas e congelado a -80°C.

Atividade da Ascorbato Peroxidase (APX) – Para determinação da APX, foi utilizada a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981), com modificações. A atividade da APX foi determinada em uma mistura de reação que consistiu de tampão fosfato (100mM, pH 7,0), EDTA (1mM), ácido ascórbico (5mM) e peróxido de hidrogênio (2mM). A reação foi iniciada com a adição de 15µL de extrato vegetal à mistura. A oxidação do ácido ascórbico foi medida em espectrofotômetro pela diminuição da absorbância a 290nm, por 1 minuto. A atividade da APX foi expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

Atividade da Catalase (CAT) – Atividade da CAT foi determinada como descrito por Kraus *et al.* (1995) em espectrofotômetro, com algumas modificações conforme Azevedo *et al.* (1998). À

temperatura de 24°C, o extrato vegetal foi adicionado em uma mistura de reação de tampão fosfato de potássio (100mM pH 7,5) contendo peróxido de hidrogênio (25%) preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 15µL de extrato vegetal. A atividade foi determinada seguindo-se a decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 minuto, através das alterações na absorbância a 240nm. A atividade da CAT foi expressa em µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

Atividade da Glutathione Redutase (GR) – A atividade da GR foi determinada como descrito por Smith *et al.* (1988), com modificações. O extrato vegetal (80µL) foi inserido numa mistura de reação contendo tampão fosfato (100mM pH 7,5), 5,5'-dithio-bis-(2-ácido nitrobenzoico) - DTNB (1mM), NADPH (0,1mM) e glutathione oxidada (1mM), a 30°C. A atividade da enzima foi medida em espectrofotômetro a 412nm durante 1 minuto. A atividade da GR foi expressa em µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) – As folhas congeladas (0,4g) foram homogeneizadas com PVPP e solução tampão fosfato (50mM pH 7,5), contendo EDTA (1mM), cloreto de sódio - NaCl (50mM) e ácido ascórbico (1mM). O extrato resultante foi centrifugado à velocidade de 10.000 rpm, sob temperatura de 2°C, durante 25 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados EDTA (0,54mM), tampão fosfato de potássio (100mM pH 7,0), metionina (0,13mM), azul p-nitrotetrazolio -NBT (0,44mM) e riboflavina (1mM), os quais foram expostos a luz fluorescente (80W) por 28 minutos. Extratos preparados seguindo o mesmo procedimento foram mantidos no escuro. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro ( $\lambda = 560\text{nm}$ ) em ambos os tipos de extrato (iluminado e não iluminado) e a diferença entre as duas absorbâncias foi considerada para a determinação da atividade da SOD, que consistiu na inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido (Oswald *et al.* 1992). Somente para a SOD, as leituras foram realizadas em duplicatas.

Proteínas – A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método proposto por Bradford (1976) utilizando o Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent, com albumina de soro bovino como padrão. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 595nm.

#### **b) Indicadores de Alterações Bioquímicas:**

Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – para determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio, 0,1g de amostra vegetal foi macerada com ácido tricloroacético - TCA (0,1%). Após centrifugação a 10.000 rpm sob 4°C de temperatura, ao sobrenadante foi adicionado tampão fosfato de potássio (100mM pH 7,5) e iodeto de potássio - KI (1M) . Esta mistura foi mantida em gelo e no escuro por 1 hora. Após este período, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390nm (Alexieva *et al.* 2001).

Hidroperóxido dieno conjugado (HPDC): a análise de HPDC foi feita a partir dos extratos etanólicos provenientes da extração de teores de pigmentos diluída na proporção de 1:15, em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 234nm (Wannaz & Pignata 2006). O conteúdo de HPDC foi calculado a partir da fórmula  $\epsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Levin & Pignata 1995). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  massa fresca.

Teores de Pigmentos – os pigmentos clorofila *a*, *b* e carotenóides foram determinados com o método proposto por Pignata *et al.* (2002). À 0,120g de amostra vegetal foram adicionados 12mL de etanol à 96% e triturados. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro, em comprimento de onda 649nm para clorofila *a*, 666nm para clorofila *b* e 470nm para carotenóides. Os resultados foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  de massa fresca.

### 3.6 Análises estatísticas

Os resultados de todas as coletas realizadas foram analisados estatisticamente utilizando-se software SIGMA PLOT 11.0. Foram comparados, primeiramente, aqueles obtidos para as amostras coletadas nos dois horários diários. Não havendo diferenças significativas entre eles, foram considerados como sendo média diária. Após essa etapa, foram comparados os dados dos períodos úmidos e secos de cada ano de coleta, não havendo diferenças significativas entre verões e invernos, assumiu-se como repetição das estações. Foram também comparados os dados referentes a cada fragmento florestal estudado, não havendo tendências claras de diferenças entre os locais, assumiu-se que todos eles seriam representantes das condições ambientais da Região Metropolitana de Campinas. Para todas essas análises estatísticas foi usado o Mann-Whitney Rank Sum Test.

Após essas considerações, as diferenças significativas nas respostas bioquímicas entre as espécies *Astronium graveolens*, *Croton floribundus* e *Piptadenia gonoacantha* (Fator 1) e entre os períodos de estudo, úmido e seco (Fator 2), bem como o efeito da interação entre esses dois fatores foi identificada através de análise de variância (ANOVA) com 2 fatores. Se necessário, a transformação adequada dos dados foi realizada para chegar a uma distribuição normal e/ou variâncias iguais.

A apresentação dos resultados da análise fatorial foi em gráficos do tipo *box-plot*. Nesse tipo de gráfico, a mediana dos dados é uma linha que divide os retângulos (*boxes*); os retângulos delimitam os 25% dos dados acima e abaixo da mediana (percentis de 25 e 75); as barras de erro mostram os valores menores situados entre os percentis de 10 e 25 ou maiores entre os de 75 e 90; os símbolos (●) apontam os *outliers* (valores extremos - abaixo do percentil de 10 ou acima do de 90). Essa apresentação possibilita representar a distribuição de um conjunto de dados com base na mediana, podendo-se avaliar a simetria dos dados, sua dispersão e a existência ou não de *outliers*.

## 4. Resultados

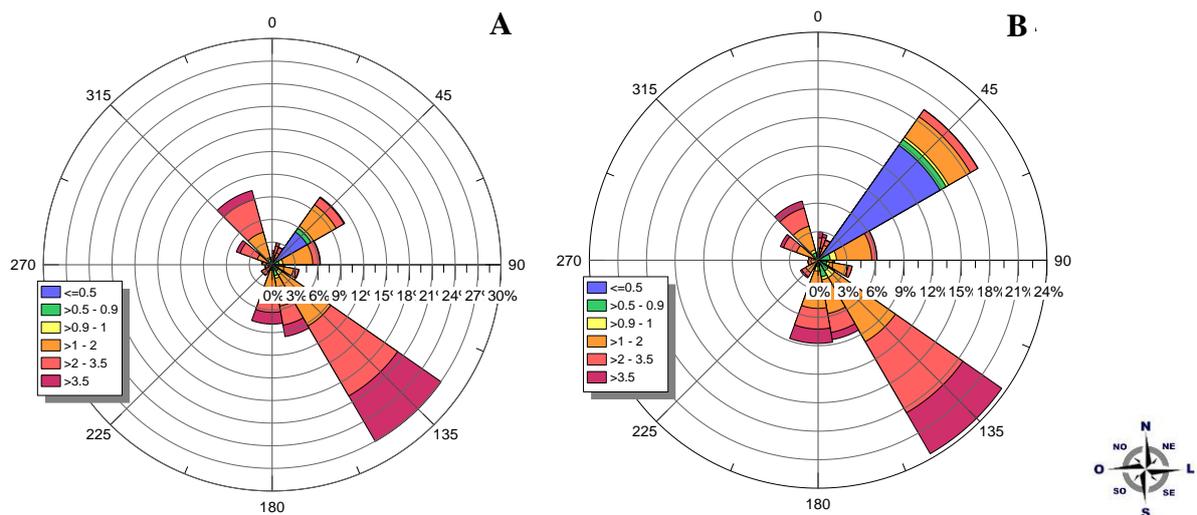
### 4.1 Perfil Meteorológico e de Poluentes

A estação úmida apresentou maior média de temperatura em relação à seca (25 e 23,5 °C, respectivamente). Na estação seca, observou-se maior amplitude de variação entre o valor máximo (35°C) e mínimo (8°C) (tabela 4.1). Os valores médios de umidade relativa obtidos para a estação úmida e seca foram bastante próximos, com a estação seca apresentando valor ligeiramente maior (75%) que a úmida (73%). O volume de chuva foi maior na estação úmida (584 mm), assim como a média de radiação global (204 W/m<sup>2</sup>) e de déficit de pressão de vapor (0,87 KPa). A velocidade média do vento permaneceu a mesma durante as estações estudadas (2 m/s) (tabela 4.1).

**Tabela 4.1.** Média e respectivos valores máximos e mínimos (entre parênteses) de temperatura (°C), umidade relativa (%), velocidade do vento (m/s), radiação global (W/m<sup>2</sup>) e déficit de pressão de vapor (DPV - KPa) e volume acumulado de precipitação (mm), durante a estação úmida (meses de dezembro a março) e estação seca (meses de junho a setembro). Dados obtidos da estação de monitoramento da CETESB em Paulínia e em Americana e dados cedidos pela Petrobras.

Estação	Temperatura	Umidade Relativa	Precipitação	Velocidade do Vento	Radiação Global	DPV
Úmida	25	73	584	2	204	0,87
	(35 – 15)	(100 – 23)		(7 – 0)	(324 – 62)	
Seca	23	75	95	2	162	0,66
	(35 – 8)	(100 – 13)		(7 – 0)	(240 – 15)	

A direção predominante do vento durante a estação úmida (Figura 4.1-A) foi no sentido sudeste para noroeste, assim como para a estação seca (Figura 4.1-B).



**Figura 4.1.** Direção e velocidade dos ventos ( $\text{m/s}^2$ ) em Paulínia no período úmido (A) e seco (B) em todo período de estudo (jan/12 a set/13). Dados fornecidos pela CETESB.

A concentração de  $\text{O}_3$  no período de 24 horas apresentou maior média durante a estação úmida, porém o valor máximo foi obtido na estação seca. O mesmo padrão de contaminação por este poluente foi observado para a concentração de  $\text{O}_3$  durante o período de 10 horas. A exposição acumulada de ozônio (EAO) foi mais alta durante a estação úmida (Tabela 4.2).

Ao contrário do ozônio, a concentração média de  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$  e  $\text{MP}_{10}$  e seus respectivos valores máximos e mínimos foram maiores durante a estação seca, com destaque ao valor máximo de  $\text{SO}_2$  e  $\text{MP}_{10}$  bem acima do encontrado durante a estação úmida (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2.** Concentração média e respectivos valores máximos e mínimos (entre parênteses) dos poluentes: ozônio ( $\text{O}_3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) e material particulado ( $\text{MP}_{10} \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) durante a estação úmida (meses de dezembro a março) e estação seca (meses de junho a setembro).  $\text{O}_3 - 24\text{h}$  = concentração de ozônio no período de 24 horas.  $\text{O}_3 - 10\text{h}$  = concentração de ozônio no período das 7 às 17 horas. EAO = exposição acumulada de ozônio. Dados obtidos da estação de monitoramento da CETESB em Paulínia.

Estação	$\text{O}_3 - 24\text{h}$	$\text{O}_3 - 10\text{h}$	EAO	$\text{SO}_2$	$\text{NO}_2$	$\text{MP}_{10}$
Úmida	55 (182 - 2)	65 (182 - 2)	11219	5,0 (16 - 1)	18,3 (89 - 0)	23,3 (53,8 - 10,7)
Seca	46 (225 - 1)	64 (225 - 1)	10960	6,5 (110 - 1)	33,8 (150 - 1)	39,6 (223 - 1)

## 4.2 Análises Bioquímicas

Os resultados das respostas bioquímicas obtidas para as três espécies estudadas, coletadas nos diferentes fragmentos da RMC, nas duas estações (úmida e seca) são apresentados em duas etapas. A primeira etapa mostra a comparação das médias obtidas dessas respostas em amostras coletadas em cada um dos fragmentos florestais estudados, nos períodos úmido e seco (Tabelas 4.3 e 4.4). A segunda etapa mostra as diferenças nas respostas bioquímicas entre as espécies *Astronium graveolens*, *Croton floribundus* e *Piptadenia gonoacantha* (Fator 1), entre os períodos de estudo, úmido e seco (Fator 2), bem como o efeito da interação entre esses dois fatores (Figuras 4.1 a 4.5 e tabela 4.4).

A tabela 4.3 apresenta os valores médios e desvio padrão obtidos para as variáveis analisadas em cada uma das espécies na estação úmida. Os valores foram separados por espécie nos diferentes fragmentos florestais estudados.

- *Astronium graveolens*

Diferenças significativas foram observadas para a atividade da enzima APX nas plantas de FPA ( $16,6 \pm 5,7$ ) e FCA ( $19,3 \pm 7,0$ ), para as demais enzimas não houve diferença significativa entre os locais. Maiores valores de HPDC foram observados em amostras oriundas de FPA ( $73,0 \pm 6,7$ ), e de conteúdo de  $H_2O_2$  e clorofila *b* para aquelas oriundas de FCA ( $0,011 \pm 0,002$  e  $0,60 \pm 0,12$ , respectivamente).

- *Croton floribundus*

Maior atividade da enzima CAT foi observada em plantas coletadas em FCA ( $2039 \pm 1117$ ), enquanto que a concentração total de proteína foi mais alta naquelas de FPA ( $0,3 \pm 0,1$ ). Maiores valores de  $H_2O_2$  para esta espécie foram observados nas plantas de FPA ( $0,011 \pm 0,002$ ) e nas de FCA para clorofila *b* e clorofila total ( $0,47 \pm 0,05$  e  $1,56 \pm 0,30$ , respectivamente).

- *Piptadenia gonoacantha*

A maior atividade da enzima CAT foi observada nas plantas coletadas em FCA ( $1508 \pm 682$ ). Entre os danos bioquímicos, diferenças significativas foram observadas para conteúdo de  $H_2O_2$  ( $0,007 \pm 0,002$ ) naquelas oriundas de FCO, e de clorofila *a* para as de FCA ( $0,92 \pm 0,20$ ).

Semelhante à tabela 4.3, a tabela 4.4 apresenta os valores médios e desvio padrão obtidos para as variáveis em cada uma das espécies na estação seca. Os valores também foram separados por espécie nos fragmentos florestais estudados.

- *Astronium graveolens*

Em plantas de FCA foi observada maior atividade das enzimas APX, CAT e SOD ( $49,0 \pm 19,8$ ,  $4956 \pm 2249$  e  $0,8 \pm 0,6$ , respectivamente). Nas plantas de FCO também foram obtidos elevados valores de APX ( $41,1 \pm 6,2$ ), e nas plantas de FPA, SOD e também concentração de proteínas ( $0,6 \pm 0,2$  e  $0,5 \pm 0,1$ , respectivamente). Maiores valores de HPDC e conteúdo de  $H_2O_2$  foram obtidos em plantas de FCO ( $61,1 \pm 18,7$  e  $0,013 \pm 0,001$ , respectivamente). Em plantas de FPA também foram observados maiores médias  $H_2O_2$  ( $0,015 \pm 0,003$ ), assim como da razão entre clorofila *a* e *b* ( $2,70 \pm 0,40$ ). Plantas de FCA apresentaram maior conteúdo de clorofila *b* ( $0,61 \pm 0,09$ ).

- *Croton floribundus*

As plantas apresentaram maior atividade de CAT e GR naquelas oriundas de FPA ( $6870 \pm 3490$  e  $122,5 \pm 28,7$ , respectivamente). Em plantas coletadas em FCA foram observados altos valores de CAT e SOD ( $6482 \pm 2385$  e  $1,0 \pm 0,6$ , respectivamente). A concentração de proteínas foi maior nas plantas de FCO ( $0,4 \pm 0,01$ ). Entre os danos bioquímicos, maiores valores de HPDC e

clorofila *b* foram obtidos em plantas coletadas em FCO ( $21,2 \pm 4,4$  e  $0,43 \pm 0,08$ , respectivamente). As plantas de FCA também tiveram altos valores de clorofila *b* ( $0,45 \pm 0,04$ ).

- *Piptadenia gonoacantha*

Maior atividade da enzima APX foi observada nas plantas de FPA e FCA ( $115,1 \pm 15,1$  e  $125,0 \pm 56,5$ , respectivamente). Ainda, nas plantas de FCA, também foram observados altos valores de CAT ( $22245 \pm 5147$ ). As plantas de FCO apresentaram maior atividade de SOD e concentração de proteína ( $0,5 \pm 0,2$  e  $0,2 \pm 0,06$ , respectivamente). Altos valores de GR foram obtidos nas plantas de FPA ( $286,1 \pm 70,6$ ). Entre os danos bioquímicos, médias de HPDC,  $H_2O_2$  e razão entre clorofila *a* e *b* ( $18,1 \pm 5,1$ ,  $0,011 \pm 0,001$  e  $2,89 \pm 0,69$ , respectivamente) foram mais elevadas nas plantas de FCO. Plantas oriundas de FPA também apresentaram altos valores médios de  $H_2O_2$  ( $0,011 \pm 0,004$ ). As plantas coletadas em FCA apresentaram médias maiores para clorofila *a* e *b* e clorofila total ( $1,02 \pm 0,23$ ,  $0,42 \pm 0,10$  e  $1,44 \pm 0,37$ , respectivamente).

**Tabela 4.3.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão da atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX-  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ ), catalase (CAT-  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ ), superóxido dismutase (SOD-  $\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ ), glutaciona redutase (GR-  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ ), concentração de proteínas (PRO-  $\text{mg}/\text{mL}$ ), hidroperóxido dieno conjugado (HPDC-  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$   $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  mf), clorofila *a* (CLOa-  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), clorofila *b* (CLOb-  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), razão entre clorofila *a* e *b* (CLOa/b), conteúdo de clorofila total (CLOtot-  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e carotenóides (CAR-  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em amostras foliares de *A. graveolens*, *C. floribundus* e *P. gonoacantha* coletadas na estação úmida nos fragmentos florestais localizados em Cosmópolis (FCO), Paulínia (FPA) e Campinas (FCA). Letras indicam diferença estatística entre locais para a mesma espécie ( $p < 0,05$ ).

Variável	ÚMIDA								
	<i>A.graveolens</i>			<i>C. floribundus</i>			<i>P.gonoacantha</i>		
	FCO	FPA	FCA	FCO	FPA	FCA	FCO	FPA	FCA
APX	8,9 $\pm$ 2,1 b	16,6 $\pm$ 5,7 a	19,3 $\pm$ 7,0 a	50,8 $\pm$ 32,7	28,3 $\pm$ 13,1	44,0 $\pm$ 22,4	39,3 $\pm$ 10,9	35,9 $\pm$ 12,8	34,2 $\pm$ 11,2
CAT	444 $\pm$ 174	649 $\pm$ 320	810 $\pm$ 510	1095 $\pm$ 143 ab	662 $\pm$ 302 b	2039 $\pm$ 1117 a	1146 $\pm$ 190 ab	808 $\pm$ 301 b	1508 $\pm$ 682 a
SOD	1,2 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,8	0,8 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,1 b	0,7 $\pm$ 0,3 a	0,7 $\pm$ 0,5 a
GR	19,0 $\pm$ 8,8	36,6 $\pm$ 22,1	21,5 $\pm$ 11,0	62,8 $\pm$ 18,5	48,5 $\pm$ 7,9	61,3 $\pm$ 14,8	54,6 $\pm$ 16,0	47,9 $\pm$ 13,2	64,2 $\pm$ 14,3
PRO	0,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,00 ab	0,3 $\pm$ 0,1 a	0,1 $\pm$ 0,03 b	0,1 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,06	0,2 $\pm$ 0,1
HPDC	50,8 $\pm$ 6,0 b	73,0 $\pm$ 6,7 a	60,9 $\pm$ 11,9 ab	17,6 $\pm$ 3,5	27,8 $\pm$ 13,7	18,3 $\pm$ 3,9	20,3 $\pm$ 4,7	21,4 $\pm$ 5,4	19,0 $\pm$ 5,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,008 $\pm$ 0,001 b	0,009 $\pm$ 0,002 ab	0,011 $\pm$ 0,002 a	0,007 $\pm$ 0,001 b	0,011 $\pm$ 0,002 a	0,006 $\pm$ 0,002 b	0,007 $\pm$ 0,002 a	0,005 $\pm$ 0,001 b	0,006 $\pm$ 0,001 ab
CLOa	1,04 $\pm$ 0,13	0,98 $\pm$ 0,15	1,16 $\pm$ 0,22	0,87 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,21	1,08 $\pm$ 0,17	0,65 $\pm$ 0,19 b	0,73 $\pm$ 0,11 ab	0,92 $\pm$ 0,20 a
CLOb	0,44 $\pm$ 0,04 b	0,46 $\pm$ 0,06 ab	0,60 $\pm$ 0,12 a	0,34 $\pm$ 0,05 b	0,42 $\pm$ 0,08 ab	0,47 $\pm$ 0,05 a	0,30 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,11
CLOa/b	2,46 $\pm$ 0,55	2,26 $\pm$ 0,69	2,00 $\pm$ 0,66	2,67 $\pm$ 0,54	2,42 $\pm$ 0,60	2,36 $\pm$ 0,45	2,37 $\pm$ 0,81	2,20 $\pm$ 0,58	2,39 $\pm$ 0,59
CLOtot	1,48 $\pm$ 0,30	1,44 $\pm$ 0,24	1,76 $\pm$ 0,55	1,21 $\pm$ 0,25 b	1,39 $\pm$ 0,30 ab	1,56 $\pm$ 0,30 a	0,95 $\pm$ 0,28	1,08 $\pm$ 0,21	1,31 $\pm$ 0,56
CAR	0,19 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,09	0,22 $\pm$ 0,08	0,15 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,05

As letras indicam diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) e foram colocadas somente para as variáveis que apresentaram tais diferenças.

**Tabela 4.4.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão da atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX-  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína), catalase (CAT-  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína), superóxido dismutase (SOD-  $\text{mg}^{-1}$  proteína), glutiona redutase (GR-  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína), concentração de proteínas (PRO-  $\text{mg}/\text{mL}$ ), hidropéroxido dieno conjugado (HPDC-  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$   $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  mf), clorofila *a* (CLOa-  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), clorofila *b* (CLOb-  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), razão entre clorofila *a* e *b* (CLOa/b), conteúdo de clorofila total (CLOtot-  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e carotenóides (CAR-  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em amostras foliares de *A. graveolens*, *C. floribundus* e *P. gonoacantha* coletadas na estação seca nos fragmentos florestais localizados em Cosmópolis (FCO), Paulínia (FPA) e Campinas (FCA). Letras indicam diferença estatística entre locais para a mesma espécie ( $p < 0,05$ ).

Variável	SECA								
	<i>A.graveolens</i>			<i>C. floribundus</i>			<i>P.gonoacantha</i>		
	FCO	FPA	FCA	FCO	FPA	FCA	FCO	FPA	FCA
APX	41,1 $\pm$ 6,2 a	18,7 $\pm$ 9,6 b	49,0 $\pm$ 19,8 a	32,8 $\pm$ 8,8	72,8 $\pm$ 40,0	56,3 $\pm$ 30,2	63,2 $\pm$ 15,1 b	115,1 $\pm$ 15,5 a	125,0 $\pm$ 56,5 a
CAT	3341 $\pm$ 2622 ab	2080 $\pm$ 1049 b	4956 $\pm$ 2249 a	2534 $\pm$ 873 b	6870 $\pm$ 3490 a	6482 $\pm$ 2385 a	13730 $\pm$ 4310 b	16121 $\pm$ 5264 ab	22245 $\pm$ 5147 a
SOD	0,3 $\pm$ 0,1 b	0,6 $\pm$ 0,2 a	0,8 $\pm$ 0,6 a	0,3 $\pm$ 0,2 b	0,5 $\pm$ 0,4 ab	1,0 $\pm$ 0,6 a	0,5 $\pm$ 0,2 a	0,2 $\pm$ 0,06 b	0,3 $\pm$ 0,1 ab
GR	58,1 $\pm$ 31,1	38,7 $\pm$ 26,7	54,0 $\pm$ 19,8	58,1 $\pm$ 18,5 b	122,5 $\pm$ 28,7 a	66,3 $\pm$ 18,9 ab	111,4 $\pm$ 57,3 b	286,1 $\pm$ 70,6 a	113,6 $\pm$ 17,7 ab
PRO	0,4 $\pm$ 0,1 ab	0,5 $\pm$ 0,1 a	0,2 $\pm$ 0,1 b	0,4 $\pm$ 0,01 a	0,2 $\pm$ 0,1 b	0,2 $\pm$ 0,1 b	0,2 $\pm$ 0,06 a	0,1 $\pm$ 0,02 b	0,1 $\pm$ 0,02 b
HPDC	61,1 $\pm$ 18,7 a	35,6 $\pm$ 3,8 ab	22,8 $\pm$ 3,2 b	21,2 $\pm$ 4,4 a	13,1 $\pm$ 5,5 b	9,2 $\pm$ 1,8 b	18,1 $\pm$ 5,1 a	10,3 $\pm$ 1,7 ab	5,0 $\pm$ 1,8 b
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,013 $\pm$ 0,001 a	0,015 $\pm$ 0,003 a	0,011 $\pm$ 0,002 b	0,015 $\pm$ 0,005	0,017 $\pm$ 0,002	0,016 $\pm$ 0,004	0,011 $\pm$ 0,001 a	0,011 $\pm$ 0,004 a	0,008 $\pm$ 0,001 b
CLOa	1,22 $\pm$ 0,20	1,26 $\pm$ 0,21	1,46 $\pm$ 0,10	1,14 $\pm$ 0,30	0,96 $\pm$ 0,11	1,07 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,30 ab	0,71 $\pm$ 0,13 b	1,02 $\pm$ 0,23 a
CLOb	0,53 $\pm$ 0,14 ab	0,47 $\pm$ 0,07 b	0,61 $\pm$ 0,09 a	0,43 $\pm$ 0,08 a	0,34 $\pm$ 0,04 b	0,45 $\pm$ 0,04 a	0,32 $\pm$ 0,06 ab	0,27 $\pm$ 0,06 b	0,42 $\pm$ 0,10 a
CLOa/b	2,52 $\pm$ 0,80 ab	2,70 $\pm$ 0,40 a	2,43 $\pm$ 0,42 b	2,67 $\pm$ 0,59	2,86 $\pm$ 0,32	2,36 $\pm$ 0,59	2,89 $\pm$ 0,69 a	2,69 $\pm$ 0,45 ab	2,46 $\pm$ 0,44 b
CLOtot	1,75 $\pm$ 0,48	1,73 $\pm$ 0,30	2,07 $\pm$ 0,61	1,58 $\pm$ 0,55	1,30 $\pm$ 0,21	1,52 $\pm$ 0,35	1,26 $\pm$ 0,45 ab	0,98 $\pm$ 0,37 b	1,44 $\pm$ 0,37 a
CAR	0,26 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,07	0,22 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,04

As letras indicam diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) e foram colocadas somente para as variáveis que apresentaram tais diferenças.

#### 4.2.1 Análise das enzimas antioxidantes

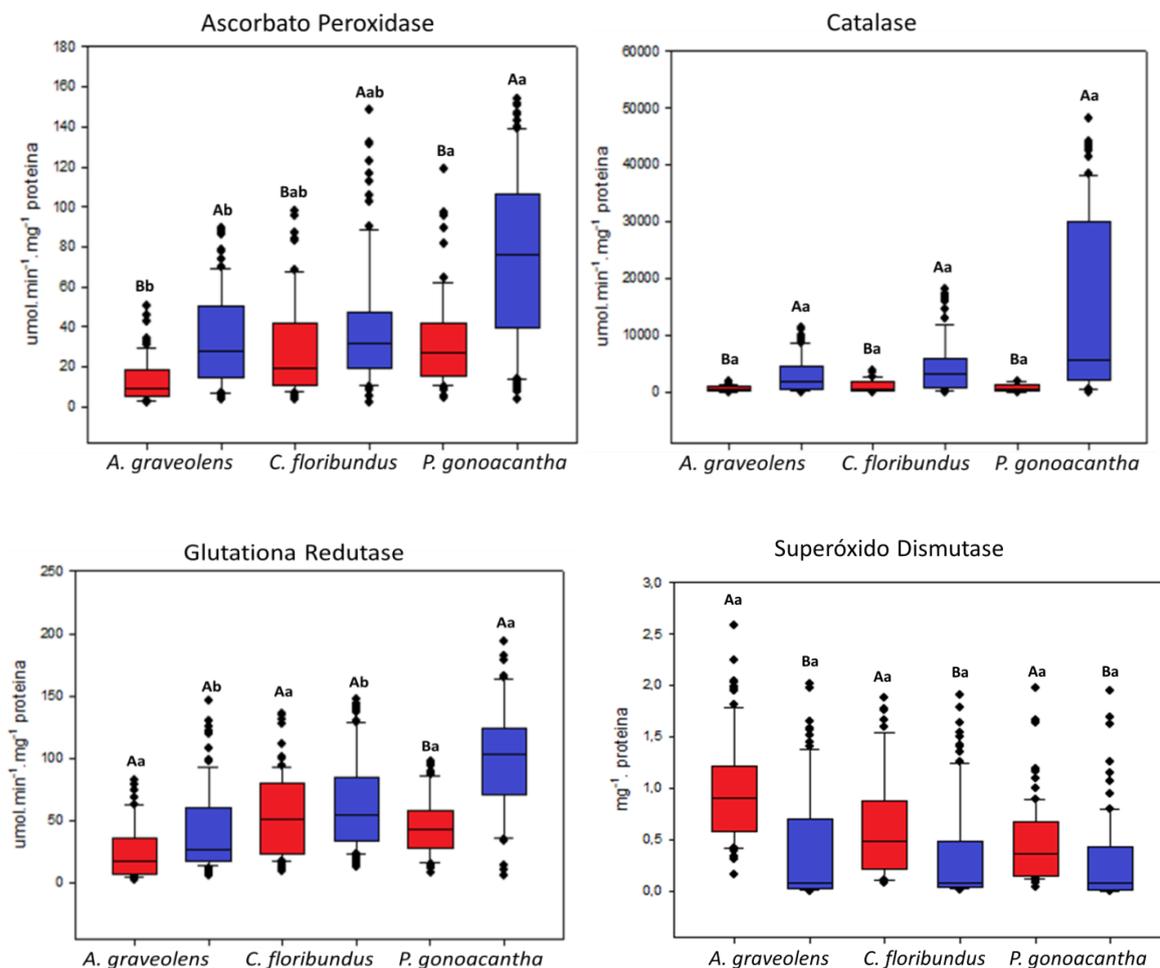
A atividade da SOD, ao contrário das demais enzimas estudadas, apresentou sua maior atividade nas amostras obtidas na estação úmida não havendo diferenças entre as espécies (Figura 4.2, Tabela 4.4).

A figura 4.2 mostra a variação da APX medida nas amostras foliares das três espécies estudadas, coletadas no período úmido e seco. Na estação seca foram observadas as maiores médias de atividade da APX. *P.gonoacantha* foi a espécie que apresentou a maior atividade e *A. graveolens* a menor.

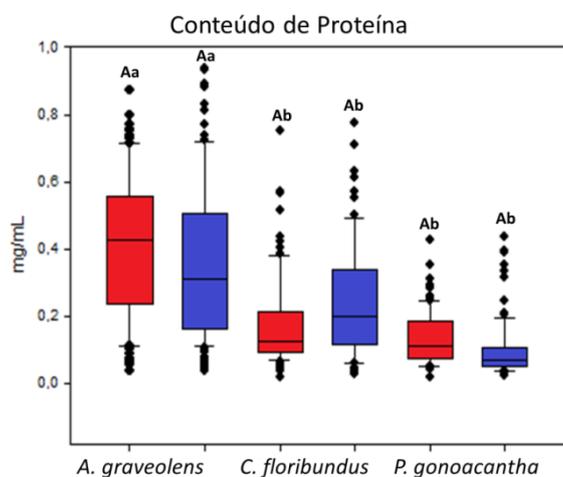
As espécies estudadas não apresentaram diferenças estatísticas para a atividade da CAT, porém houve diferença entre os resultados obtidos para as estações, com a estação seca apresentando os maiores valores (Figura 4.2, Tabela 4.4).

A atividade da GR não diferiu significativamente entre as espécies na estação úmida. Porém na estação seca, *P. gonoacantha* apresentou maior atividade desta enzima. As outras espécies estudadas não apresentaram diferenças estatísticas para a atividade da GR entre as estações (Figura 4.2, Tabela 4.4).

A variação da concentração de proteína nas espécies estudadas não mostrou diferença significativa entre as estações. Já entre as espécies houve diferença, com *A. graveolens* apresentando os maiores valores e *C.floribundus* e *P.gonoacantha* os menores (figura 4.3, Tabela 4.4).



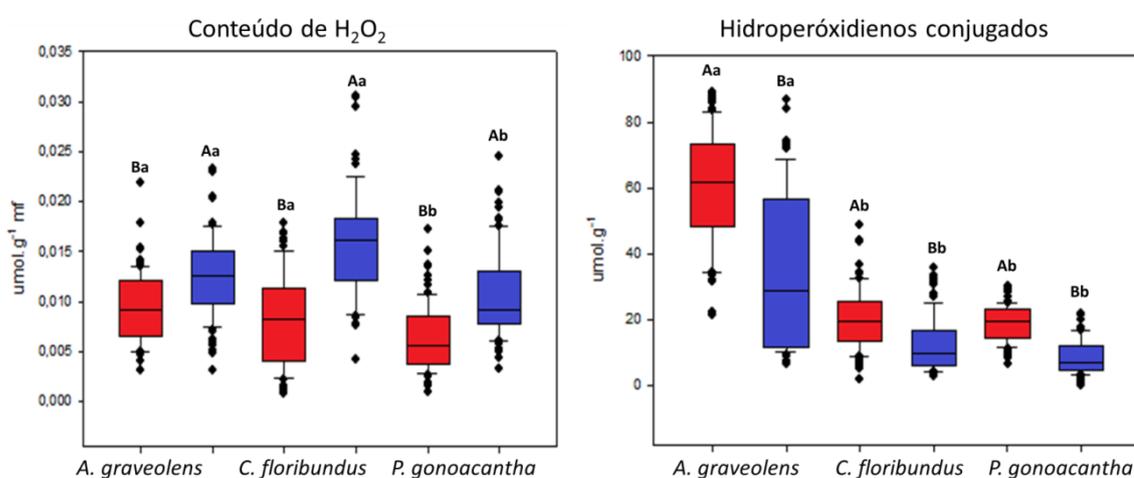
**Figura 4.2.** Variação da atividade das enzimas: ascorbato peroxidase, catalase, glutaciona redutase e superóxido dismutase para as espécies *A. graveolens*, *C. floribundus* e *P. gonoacantha*. Os gráficos em vermelho representam a estação úmida e em azul a estação seca. Letras maiúsculas comparam as estações e letras minúsculas espécies. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.3.** Variação na concentração de proteínas nas espécies *A. graveolens*, *C. floribundus* e *P. gonoacantha*. Os gráficos em vermelho representam a estação úmida e em azul a estação seca. Letras maiúsculas comparam as estações e letras minúsculas espécies. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

## 4.2.2 Indicadores de Alterações Bioquímicas

A concentração de  $H_2O_2$  foi maior nas amostras foliares obtidas na estação seca, sendo que entre as espécies, *P. gonoacantha* foi a que apresentou menor valor nesta estação (Figura 4.4, Tabela 4.4). Os maiores valores de HPDC foram observados em *A. graveolens*. Entre as estações, maior conteúdo foi encontrado nas amostras obtidas na estação úmida (Figura 4.4, Tabela 4.4).



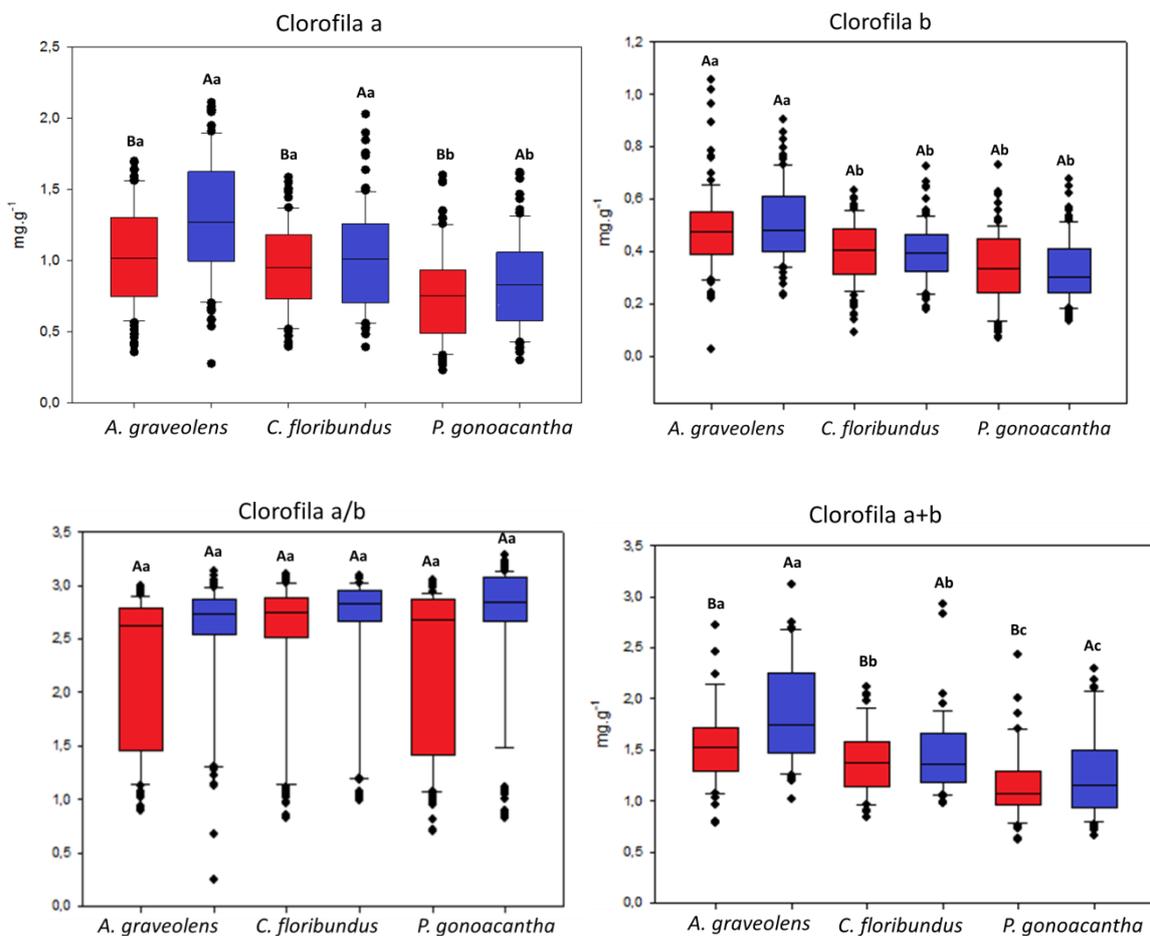
**Figura 4.4.** Variação na concentração de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos conjugados (HPDCs) para as espécies *A. graveolens*, *C. floribundus* e *P. gonoacantha*. Os gráficos em vermelho representam a estação úmida e em azul a estação seca. Letras maiúsculas comparam as estações e letras minúsculas espécies. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

A concentração de clorofila *a* foi maior nas amostras coletadas na estação seca, sendo que as espécies *A. graveolens* e *C. floribundus* apresentaram os valores mais elevados. Na estação úmida, este mesmo padrão se repetiu para as espécies (Figura 4.5). A concentração de clorofila *b* não apresentou diferenças entre as estações. *A. graveolens* obteve os maiores valores destes pigmentos. A razão entre clorofila *a* e *b* não mostrou diferenças estatísticas entre as estações e entre as espécies.

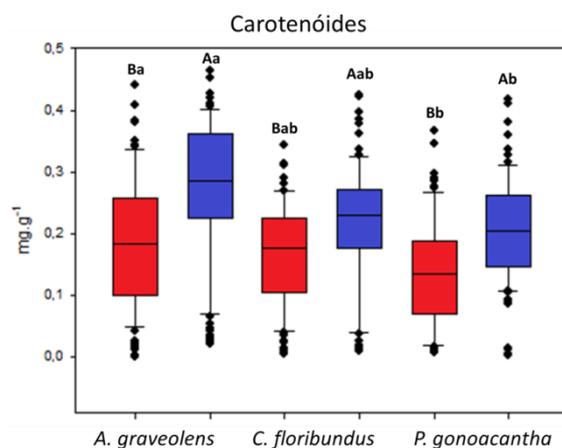
A razão entre clorofila *a* e *b* não apresentou diferenças estatísticas entre as estações nem entre as espécies. O contrário pode ser observado para os valores obtidos em clorofila total, onde

houve diferença significativa entre as estações, com o período seco apresentando valores mais elevados. Entre as espécies, *A. graveolens* obteve os maiores valores e *P. gonoacantha* os menores (Figura 4.5, Tabela 4.4).

As maiores concentrações de carotenóides foram observadas na estação seca. Entre as espécies, os maiores valores foram encontrados em *A. graveolens* e os menores em *P. gonoacantha*, como demonstrado pela figura 4.6, tabela 4.4.



**Figura 4.5.** Variação da concentração de clorofila *a* e *b*, razão entre clorofila *a* e *b* e conteúdo total de clorofila (*a*+*b*) nas espécies *A.graveolens*, *C.floribundus* e *P. gonoacantha*. Os gráficos em vermelho representam a estação úmida e em azul a estação seca. Letras maiúsculas comparam as estações e letras minúsculas espécies. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.6.** Valores médios da concentração de carotenóides para as espécies *A.graveolens*, *C.floribundus* e *P. gonoacantha*. Os gráficos em vermelho representam a estação úmida e em azul a estação seca. Letras maiúsculas comparam as estações e letras minúsculas espécies. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

A tabela 4.5 apresenta o resultado da análise fatorial realizada com as amostras obtidas para as espécies nativas *A.graveolens*, *C.floribundus* e *P. gonoacantha* (Fator 1) durante as estações úmida e seca dos anos de 2012 e 2013 (Fator 2).

**Tabela 4.5.** Dados de F e  $p$  da análise de variância com dois fatores (espécies e estações), bem como a interação entre eles (espécies x estações). Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX); catalase (CAT); superóxido dismutase (SOD); glutatona redutase (GR) e concentração de proteínas (PRO); hidroperoxidienos conjugados (HPDC); conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); clorofila *a* (CLOa); clorofila *b* (CLOb); razão entre clorofila *a* e *b* (CLOa/b); conteúdo total de clorofila (CLOa+b); carotenóides (CAR).

Variável	Espécies		Estações		Espécies x Estações	
	F	P	F	P	F	P
APX	6,453	0,005	12,054	0,002	2,595	0,091
CAT	1,015	0,374	17,596	<0,001	0,154	0,858
SOD	2,127	0,137	4,326	0,046	0,466	0,632
GR	8,179	0,001	13,792	<0,001	4,137	0,026
PRO	12,889	<0,001	0,145	0,706	1,181	0,321
HPDC	12,131	<0,001	11,272	0,002	0,470	0,630
$H_2O_2$	7,245	0,003	39,844	<0,001	2,999	0,065
CLOa	8,945	<0,001	4,371	0,045	0,438	0,650
CLOb	9,923	<0,001	0,082	0,777	0,251	0,780
CLOa/b	0,144	0,866	2,685	0,112	0,222	0,802
CLOa+b	9,760	<0,001	2,537	0,122	0,468	0,631
CAR	4,384	0,021	18,678	<0,001	0,372	0,693

## 5. Discussão

Os valores de umidade relativa obtidos para o período úmido e seco foram muito próximos, com média um pouco maior na estação seca. De acordo com o relatório da CETESB de 2013, na RMC nos anos de estudo, os meses de fevereiro e março foram caracterizados pela diminuição das precipitações. Além disso, a região apresentou média de precipitação acima da média histórica dos últimos 10 anos para o que são considerados os meses mais secos do ano. Esses dados explicam o alto valor de umidade relativa da estação seca no presente estudo. Ainda, este relatório mostra que a distribuição das chuvas foi irregular entre os meses de inverno (estação seca), com junho e julho apresentando maior precipitação, o que pode ter elevado o valor médio de umidade relativa para o período, e os meses de maio e agosto apresentando valores inferiores às respectivas médias históricas. Dias excessivamente secos levam a uma condição meteorológica que pode provocar inversões térmicas que dificultam a dispersão dos poluentes, explicando os valores mais elevados de  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$  e  $\text{MP}_{10}$  observados durante a estação seca (CETESB 2013).

No clima tropical em que a RMC está inserida, elevada concentração de  $\text{O}_3$  pode ocorrer durante todo o ano (CETESB 2013). A formação deste poluente acontece ao longo do dia. Conforme a intensidade da radiação solar aumenta, ocorre a fotólise do  $\text{NO}_2$  com consequente aumento da sua concentração na atmosfera. Os altos valores de  $\text{O}_3$  encontrados ao longo do ano na RMC podem ser consequência das condições favoráveis a sua formação na estação úmida, como dias mais longos e quentes e também pela alta incidência de radiação solar (Tabela 4.1), e na estação seca pela maior concentração de  $\text{NO}_2$ , precursor do  $\text{O}_3$  (Tabela 4.2). Esses dados demonstram que a vegetação nativa da região pode sofrer com os efeitos deste poluente durante todo o ano quando comparada com a vegetação de clima temperado, onde existe uma época bem marcada para a formação de  $\text{O}_3$  (durante a primavera e verão) (Klumpp *et al.* 2000, Domingos *et al.* 2002, Emberson 2003). Ainda, a menor quantidade de  $\text{NO}_2$  na atmosfera, observada na estação úmida, deve-se não somente a formação do ozônio, como também a maior deposição úmida deste,

em decorrência da quantidade de chuvas que ocorreram no período. O mesmo pode ser dito para  $\text{SO}_2$  e  $\text{MP}_{10}$  (CETESB 2012).

Regiões com áreas urbanas, industriais e agrícolas, como a RMC, representam grande fonte de poluentes, com consequências tanto para a qualidade do ar local como também para áreas próximas devido ao transporte aéreo da poluição (Boian & Andrade 2012). Segundo o Relatório da Qualidade do Ar do Estado de São Paulo (CETESB 2009), os valores de AOT40 (concentração acumulada de ozônio acima de 40 ppb) trimestrais para a estação de monitoramento situada em Paulínia, em 2008, ultrapassaram o Valor de Referência para Proteção da Produtividade Agrícola (VRPP), tanto no verão como na primavera, em concentrações superiores até 2,7 vezes o VRPP limite (AOT40 de 3.000 ppb/h de ozônio acumulada no período de 3 meses), indicando que além de perdas agrícolas, provavelmente os fragmentos florestais na região estão sofrendo também os efeitos prejudiciais do ozônio troposférico (Moura 2013).

Os valores elevados da concentração de  $\text{O}_3$  atmosférico em Paulínia, que apresenta frequentes picos de concentração deste poluente, são devidos principalmente aos seus precursores emitidos pelo tráfego local, pela emissão de poluentes pelo Pólo Industrial localizado na cidade (CETESB, Moura 2013) e também pela contribuição do transporte de poluentes vindos da Região Metropolitana de São Paulo para a RMC (Boian & Andrade 2012). Porém, a situação da poluição na região não é recente. O desenvolvimento industrial acelerado, principalmente depois da implantação da REPLAN, na década de 70, expandiu a construção de estradas e rodovias, tornando a região susceptível aos efeitos oxidativos dos poluentes emitidos por diversas fontes (Gutjahr & Tarifa 2004, Prezotti & Tresmondi 2006). Destacam-se também na RMC, elevadas concentrações de óxidos de enxofre ( $\text{SO}_x$ ) e de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ) oriundos do Pólo Industrial de Paulínia e do aglomerado urbano (Carmo & Hogan, 2006).

Através dos resultados obtidos com as plantas coletadas em cada um dos fragmentos florestais estudados, não foi possível observar uma tendência clara de que em algum deles as

plantas estivessem sob maior ou menor efeito do estresse provocado pelas condições ambientais. Durante o período úmido, pode-se observar pouca diferença entre locais para as variáveis analisadas nas três espécies. No período seco, a ocorrência de diferença estatística foi maior, porém, ainda assim, não demonstrou claramente um local com condições ambientais que possa potencializar o estresse, causando maior resposta antioxidante e/ou de dano bioquímico. Talvez essas diferenças encontradas sejam reflexos de vieses amostrais impostos pelas condições no momento da coleta, como por exemplo, a idade da folha e posição desta na copa, apesar de sempre se ter buscado a uniformidade na coleta. Também pode ser uma resposta à condição microclimática em determinado dia e local nos períodos amostrais.

No entanto, os resultados obtidos mostraram variação sazonal da atividade das enzimas antioxidantes, como relatado por alguns autores na literatura (Bulbovas *et al.* 2005, Ferreira *et al.* 2007, Halliwell & Guteridge 2007), também dos indicadores de danos oxidativos.

Durante a estação úmida, observou-se maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e maior concentração de hidroperóxidos dienos conjugados (HPDC) nas espécies estudadas (Figuras 4.1 e 4.3 respectivamente). Nesta mesma estação, também foi registrada maior concentração de O<sub>3</sub> na atmosfera e maior incidência de radiação solar e média de temperatura (Tabelas 4.2 e 4.1 respectivamente).

Bermudez *et al.* (2009) observaram aumento na atividade de SOD em *Tillandsia capillaris*, uma espécie de bromélia bioindicadora de poluição, em área agrícola sob influência do O<sub>3</sub>. Aumento na atividade de SOD em plantas sob altas concentrações de O<sub>3</sub> também foi observado por Bernardi *et al.* (2004) e Esposito *et al.* (2009). Ueda *et al.* (2013) verificaram que em exposição aguda de O<sub>3</sub>, isoformas de SOD reagiram diferentemente de acordo com sua localização na célula. As isoformas que estão no peroxissomos, mitocôndrias e cloroplastos reagiram mais ativamente contra a ação oxidativa do O<sub>3</sub>, enquanto que a isoforma do citosol respondeu pouco, mostrando que o O<sub>3</sub> pode desencadear respostas em diferentes organelas da célula, ativando formas diferentes da

SOD. Apesar das isoformas de SOD não terem sido avaliadas neste estudo, é possível que aquelas que respondem mais ao O<sub>3</sub> tenham sido ativadas durante a estação úmida, uma vez que a atividade total da SOD foi maior nesta estação, que teve o O<sub>3</sub> como seu principal poluente, uma vez que as concentrações de SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e MP<sub>10</sub> foram mais baixas.

Por o sistema antioxidante ser fundamentalmente importante na proteção do aparato fotossintético da destruição foto-oxidativa, altas atividades de SOD indicam um potencial de tolerância aos danos causados pela foto-oxidação, como observado por Favaretto *et al.* (2011). Esses autores relacionaram o aumento da atividade da SOD a elevados valores de radiação quando expuseram espécies nativas brasileiras à alta luminosidade. Yang *et al.* (2008) em experimento para verificar o crescimento de sementes de *Picea asperata* sob alta luminosidade e seca também observaram aumento nos valores da atividade de SOD e ainda Dafré *et al.* (2011) relacionaram o aumento da atividade da SOD com aumento da temperatura, padrão também observado neste estudo. Há muitas evidências de que a temperatura (Ali *et al.* 2005) e o excesso de luz (Michael & Krishnaswamy 2011) causam alterações nos processos enzimáticos envolvendo o metabolismo antioxidante em resposta ao estresse causado por esses fatores.

A luz é essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta, porém ela também pode ser um fator ambiental de risco (Asada 2006). A exposição à luz excessiva pode aumentar a produção de ERO no interior da célula, podendo resultar na peroxidação de lipídeos de membrana (Lima & Abdalla 2001). O O<sub>3</sub> também tem sido relatado como um poderoso oxidante que origina danos à membrana plasmática (Kumari *et al.* 2013), causando peroxidação lipídica (Ueda *et al.* 2013).

O conteúdo de HPDC é um indicador de peroxidação lipídica, e constitui uma medida de alteração no grau da integridade das membranas celulares expostas a poluição (González *et al.* 1996). O hidroperóxido dieno é formado no início da peroxidação, onde o ácido graxo poli-insaturado sofre a ação de uma espécie reativa, abstraindo um átomo de H a partir de um grupo

metileno (-CH<sub>2</sub>-), ocorrendo formação de um radical carbono. Este é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (Halliwell & Gutteridge 2007). Sendo assim, os hidroperóxidos são produtos primários da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, daí a importância da sua medida (Lima & Abdalla 2001). É bastante utilizado como marcador biológico para poluição aérea, especialmente em espécies do gênero *Tillandsia* (Bromeliaceae) (Carreras *et al.* 2005, Wannaz & Pignata 2006, González *et al.* 2012). O O<sub>3</sub> é indicado como um dos poluentes atmosféricos que pode iniciar a formação de hidroperóxidos. Estudos tem relacionado maior concentração de HPDC com altas concentrações de O<sub>3</sub> (González *et al.* 1996, Wannaz & Pignata 2006).

O aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tecidos foliares promove o fechamento dos estômatos e, conseqüentemente, diminui a taxa transpiratória, causando alterações na assimilação de carbono e na entrada de poluentes na planta (Favaretto *et al.* 2011, Gill & Tuteja 2010). Ainda, pode agir como um sinal indutor para a expressão de genes referentes à ativação das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e outras peroxidases (Soares & Machado 2007, Deuner *et al.* 2008).

A sinalização através do acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está relacionada de forma intrínseca com a atividade das enzimas APX e CAT, sendo que a APX, devido a sua alta afinidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reage a alterações muito pequenas nas concentrações deste, sendo responsável pela regulação fina do sinal, enquanto que a atividade da CAT é induzida em concentrações mais altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assim, qualquer concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acima de um limiar normal pode gerar resposta de ativação destas enzimas (Mittler 2002). Neste estudo, na estação seca, ao mesmo tempo em que ocorreu aumento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> houve aumento da atividade das enzimas APX e CAT (Figuras 4.2 e 4.4), mostrando que neste período o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agiu como um sinalizador da atividade destas enzimas.

Além de neutralizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a CAT também age sobre alguns hidroperóxidos (Gill & Tuteja 2010), podendo assim também reagir com o HPDC, inativando-o, como observado com os

resultados obtidos na estação seca, onde houve aumento da CAT e diminuição do HPDC (Figuras 4.1 e 4.3, respectivamente).

Peltzer & Polle (2001) afirmam que mudanças no sistema antioxidante podem estar correlacionadas com variações na temperatura e luz, indicando que ambos os fatores são importantes na modulação da defesa antioxidante. Peltzer *et al.* (2002) relataram que a atividade da APX e GR diminuíram significativamente em plantas sob altas temperaturas, corroborando com o presente estudo, onde menor atividade dessas enzimas foi observada na estação úmida, período com maior média de temperatura (Figura 4.1). Por outro lado, a atividade da SOD aumentou nesta mesma estação. Dias *et al.* (2011) também observaram diminuição na atividade da GR e aumento da SOD sob altas temperaturas. Sobre a radiação, Favaretto *et al.* (2011) observaram que em plantas submetidas a alta luminosidade a atividade da CAT diminuiu. No presente estudo também ocorreu diminuição da atividade da CAT durante a estação úmida, época com maior incidência de radiação solar.

A GR não age diretamente na remoção de ERO, porém é responsável pela regeneração da glutathiona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo a manutenção do ciclo metabólico da glutathiona (Junior *et al.* 2001, Gill & Tuteja 2010). O aumento da atividade da GR observado durante a estação seca deste estudo demonstra que o ciclo ascorbato-glutathiona manteve-se ativo durante o período, combatendo as ERO. O aumento na atividade da GR é crucial para determinar a tolerância de espécies sob vários estresses, como por exemplo, os impostos pela seca (Sharma & Dubey 2005). Lascano *et al.* (1998) relacionaram o aumento na atividade da GR com o aumento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estudo feito com folhas de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Oasis), mostrando que esta enzima também responde a variações desta substância.

A concentração de clorofila *a* e total e de carotenóides foi menor nas plantas coletadas na estação úmida. Os valores de DPV (déficit de pressão de vapor) foram mais altos nesta estação,

assim como observado por Moura (2013) no mesmo local de estudo. Alta incidência solar associada a um DPV elevado pode ocasionar fechamento dos estômatos e com isso, resultar em diminuição na concentração de CO<sub>2</sub> intercelular e ocorrer depressão da fotossíntese. Nesta situação, a quantidade de fótons absorvida em excesso pode causar fotoinibição, com queda no potencial do fotossistema II e na concentração de pigmentos (Sanches *et al.* 2010). Ainda, o conteúdo de pigmentos também pode variar em função da poluição atmosférica, como observado por Kumari *et al.* (2013) em plantas expostas ao O<sub>3</sub> e Robinson & Sicher (2004) em exposição de *Hordeum vulgare* (cevada) à altas concentrações de poluentes e elevada luminosidade.

Os carotenóides destacam-se também como agentes antioxidantes (Junior *et al.* 2001). Tem papel importante de fotoproteção por dissipar o excesso de energia de excitação na forma de calor e também pela tolerância ao estresse oxidativo (Gill & Tuteja 2010). Os carotenóides podem eliminar o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e também são capazes de reagir diretamente com O<sub>2</sub><sup>-</sup> e outros radicais livres, assim como podem prevenir a peroxidação lipídica (Smirnoff 2005). No presente estudo, observou-se alta concentração de carotenóides e baixa concentração de HPDC no período seco, podendo os carotenóides então também ter evitado a ação oxidativa das ERO neste período.

Espécies de diferentes grupos sucessionais podem diferir quanto as suas características ecofisiológicas, como a capacidade fotossintética ou tolerância a fotoinibição e estresse oxidativo (Nogueira *et al.* 2004). Essas diferenças lhes permitem crescer e sobreviver sob diferentes condições de luminosidade (Favaretto *et al.* 2011), e também influenciam em maior ou menor tolerância às variações do ambiente em que ocorrem.

Espécies secundárias tardias, como *A. graveolens*, são adaptadas a se desenvolverem em condições de sombreamento no sub-bosque, com baixa intensidade de luz e temperatura (Gandolfi 2000, Guaratini *et al.* 2008). Em geral, apresentam altas concentrações de clorofila pela necessidade de captação de luz (Favaretto *et al.* 2011). Neste estudo observou-se alta concentração de pigmentos (clorofila *a*, *b* e total, e carotenóides) em *A. graveolens* (Figuras 4.5 e 4.6). As

clorofilas podem atuar na proteção das membranas (González *et al.* 2012) e, como visto anteriormente, os carotenóides atuam como antioxidantes (Smirnoff 2005, Gill & Tuteja 2010). Apesar de ter suas defesas aumentadas em relação aos pigmentos, estas não impediram a produção de ERO e a ocorrência de danos em *A.graveolens*, que apresentou valores altos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HPDC. Além dos altos valores desses indicadores de danos bioquímicos, também apresentou menor atividade de APX em relação a outras espécies estudadas e de GR no período seco.

Em espécies pioneiras, como *C.floribundus*, espera-se encontrar altas taxas fotossintéticas, maior acúmulo de biomassa e teor de pigmentos inferior a espécies sucessionais tardias (Nogueira *et al.* 2004). No entanto, espécies pioneiras necessitam de maior proteção antioxidante para compensar o estresse oxidativo imposto pela alta luminosidade as quais estão expostas (Hansen *et al.* 2002, Favaretto *et al.* 2011). No presente estudo, *C.floribundus* apresentou alta concentração de clorofila *a*, queda na concentração de clorofila *b* e valores intermediários de clorofila total e carotenóides quando comparado com as demais espécies estudadas (Figura 4.4 e 4.5). Valores altos ou intermediários de pigmentos em plantas de *C.floribundus* contribuíram para a proteção das membranas, uma vez que nesta espécie foi obtida baixa concentração de HPDC. Em relação às enzimas do sistema de defesa antioxidante, estas não apresentaram muita variação durante o período de estudo. O conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi alto, mas como as enzimas também não alteraram sua atividade significativamente, ele pode ter sido um sinalizador para induzir a atividade enzimática em níveis capazes de prover proteção, corroborando também para os baixos níveis de HPDC.

Espécies secundárias iniciais, como *P. gonoacantha*, são capazes de viver em níveis intermediários de luz e podem ocorrer na transição entre clareiras, no sub bosque ou clareiras parcialmente preenchidas (Gandolfi 2000, Guaratini *et al.* 2008). Essa espécie, entre as demais estudadas, foi a que apresentou menor concentração de pigmentos, mostrando que ela pode ser sensível às variações do ambiente, tanto meteorológicas como de qualidade do ar (Robinson & Sicher 2004, Favaretto *et al.* 2011). Porém, as baixas concentrações de pigmentos foram

compensadas pelo aumento das atividades enzimáticas da APX e GR, visto que houve baixa concentração de HPDC e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 6. Conclusão

Os resultados, em seu conjunto, permitem concluir que as espécies estudadas possuem perfil de atividade enzimática antioxidante diferente. *A. graveolens* teve menor atividade de APX e GR, e *P. gonoacantha* maior, enquanto que *C. floribundus* apresentou valores intermediários da atividade dessas enzimas. A atividade de CAT e SOD não diferiu entre as espécies estudadas. Esse perfil antioxidante resultou em maior quantidade de HPDC e  $H_2O_2$  em *A. graveolens* e baixos teores dessas substâncias em *P. gonoacantha*.

Apesar da variação do conteúdo de pigmentos ser um indicador de estresse oxidativo, os resultados obtidos no presente estudo também mostraram seu efeito antioxidante e de protetor de membranas. *C. floribundus*, que teve alta concentração de clorofila *a* e valores intermediários de conteúdo total de clorofila e carotenóides, mostrou menores teores de HPDC. Tal efeito protetor não foi observado em *A. graveolens* que teve elevadas concentrações de pigmentos, porém altos valores de HPDC. Já os baixos teores de pigmentos em *P. gonoacantha* foram compensados pela eficiência da atividade das enzimas antioxidantes. Dessa forma, analisando comparativamente o potencial de tolerância das espécies estudadas, pode-se concluir que *A. graveolens* é a menos tolerante e *P. gonoacantha* a mais tolerante.

As respostas bioquímicas das espécies estudadas não mostraram uma tendência clara de diferença de efeito de contaminação atmosférica entre os fragmentos florestais estudados, sendo que os mesmos podem ser considerados como representantes da condição de ambiental da RMC. Já entre as estações úmida e seca, a variação das respostas das plantas mostrou diferenças sazonais. Na estação úmida as espécies apresentaram maior atividade de SOD e conteúdo de HPDC, e baixo teor de pigmentos como resposta a elevados valores de temperatura, radiação e concentração de ozônio. Na estação seca, as espécies apresentaram alta concentração de  $H_2O_2$ , que possivelmente atuou como sinalizador para intensificar a atividade de APX e CAT ocasionando baixa concentração de

HPDC. Tais respostas possivelmente estiveram relacionadas às elevadas concentrações de SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, MP<sub>10</sub>.

## 7. Referências Bibliográficas

- Agrawal, M. & Agrawal, S.B.** 1999. Effects of air pollution on plant diversity. In: M. Agrawal & S.B. Agrawal (eds.). Environmental pollution and plant responses. Lewis Publishers, Washington, pp. 137-152.
- Agrawal, M. & Singh, J.** 2000. Impact of coal power plant emission on the foliar elemental concentrations in plants in a low rainfall tropical region. *Environmental Monitoring and Assessment* 60: 261–282.
- Alexieva, V., I. Sergiev, S. Mapelli & E. Karanov.** 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.*, 24, 1337–1344.
- Ali, A., Alfarhan, A., Aldjain, I., Bokharid, N. & Khaled, W.A.T.** 2008. Photosynthetic responses of pea plants (*Pisum sativum* L. cv. Little marvel) exposed to climate change in Riyadh city, KSA. *African Journal of Biotechnology* 15: 2630-2636.
- Alscher, R.G., Erturk, N. & Heath, L.S.** 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1331-1341.
- Asada, K.** 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*. Vol. 141, pp. 391–396.
- Ashmore, M.R.** 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment*. 28: 949–964.
- Azevedo, R.A.; Alas, R.M.; Smith, R.J. & Lea, P.J.** 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104 (2): 280-292.

- Baek, S.O., Field, M.E., Goldstone, P.W., Kirk, P.W. & Lester, J.N.** 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water, Air and Soil Pollution*, 60, 279-300.
- Bauer, M.L. & Tejada, T.H.** 2007. A review of ozone-induced effects on the forests of central Mexico. *Environmental Pollution* 147: 446-453.
- Bender, J.; Bergmann, E. & Weigl H-J.** 2006. Responses of biomass production and reproductive development to ozone exposure differ between european wild plant species. *Water, Air and Soil Pollution*, 176(1-4): 253-267.
- Bernardi, R., Nali, C., Ginestri, P., Pugliesi, C., Lorenzini, C. & Durante, M.** 2004. Antioxidant enzyme isoforms on gels in two poplar clones differing in sensitivity after exposure to ozone. *Biologia Plantarum* 48 (1): 41-48.
- Bermudez, G.M.A., Rodriguez, J.H. & Pignata, M.L.** 2009. Comparison of the air pollution biomonitoring ability of three *Tillandsia* species and the lichen *Ramalina celastriin* Argentina. *Environmental Research* 109: 6-14.
- Boian, C. & Andrade, M.F.** 2012. Characterization of ozone transport among metropolitan regions. *Revista Brasileira de Meteorologia*, v.27, n.2, 229 – 242.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 71: 248 – 254.
- Braga B., Hespanhol I., Conejo J.G.L., Mierzwa J.C., Barros M.T.L., Spencer M., Porto M., Nucci N., Juliano N. & Eiger S.** 2006. *Introdução à engenharia ambiental*. 2ª edição. Pearson Prentice Hall, São Paulo, pp 318.
- Bray, E.A., Baylei-Serres, J. & Werentilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. 2000 eds). American Society of Plant Physiologists. USA, New York, pp. 1158 –1203.

- Bulbovas, P., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C. & Domingos, M.** 2005. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Revista Brasileira de Botânica 28: 687-696.
- Carmo, R. L., Hogan & D. J.** 2006. Questões ambientais e riscos na Região Metropolitana de Campinas. In: José Marcos Pinto da Cunha. (Org.). Novas metrópoles paulistas - População, vulnerabilidade e segregação. Campinas-SP: Sitta Gráfica e Editora Ltda. p. 581-604.
- Carreras, H.A., Wannaz, E.D., Pe´rez, C.A. & Pignata, M.L.** 2005. The role of air pollutants on the performance of heavy metals accumulation in *Usnea amblyoclada*. Environ. Res. 97, 50–57.
- Carvalho, P.E.R.** 1994. Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa–CNPQ/SPI, Brasília, 676p.
- CETESB.** 2009. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2009. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. P.208.
- CETESB.** 2012. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2012. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. P.125.
- CETESB.** 2013. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2013. Operação Inverno - Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. P.59.
- Clemente, D.A.** 2000. Estudo do impacto ambiental das fontes industriais de poluição do ar no município de Paulínia - SP empregando o modelo ISCST3. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente.** 1990. Resolução nº 3 de 28/06/1990. Diário Oficial da União de 22/08/1990. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/CONAMA/index.cfm>
- Culotta, V.C.** 2001. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. Current Topics in cellular regulation, 36: 117- 132.

- Dafré, M.M., Nakasato, R.K, Dias, A.P.L., Rinaldi, M.C.S. & Domingos, M.** 2011. The redox state of *Ipomoea nil* ‘Scarlet O’Hara’ growing under ozone in a subtropical area. *Ecotoxicology and Envir. Safety*, 74: 1645–1652.
- Deniz, M. & Duzenli S.** 2007. The effect of refinery pollution on non-enzymatic foliar defense mechanisms in four evergreen plant species in Turkey. *Acta Physiol Plant* 29:71–79
- Derisio, J.C.** 2007. Introdução ao controle de poluição ambiental. 3ª ed. São Paulo: Signus Editora. 89-131.
- Deuner, S., Alves, J.D., Fries, D.D., Zanandrea, I., Lima, A.A., Henrique, PC. & Goulart, P.F.P.** 2008. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. *Revista Ceres* 55: 135-140.
- Dias, A.P.L., Dafré, M.M., Rinaldi, M.C.S & Domingos, M.** 2011. How the redox state of tobacco ‘Bel-W3’ is modified in response to ozone and other environmental factors in a subtropical area? *Environmental Pollution*, 159: 458 e 465.
- Dizengremel, P., Thiec, D. L., Bagard, M. & Jolivet, Y.** 2008. Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution*. 156: 11-15.
- Domingos, M., Bourotte, C., Klumpp, A., Klumpp, G. & Forti, M.C.** 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Imprensa Oficial, São Paulo, p.221-250.
- Durigan, G., Franco, G.A.D.C., Saito, M. & Baitello, J.B.** 2000. Estrutura e diversidade do componente arbóreo da floresta na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 23:369-382.
- Emberson, L.** 2003. Air pollution on crops and forests: an introduction. In: L. Emberson, M. Ashmore & F. Murray (eds.). *Air pollution impacts on crops and forests. A global assessment*. Imperial College Press, Singapore, pp. 3-34.

- Emberson, L.D.; Ashmore, M.R.; Murray, F.; Kuylenstierna, J.C.I.; Percy, K.E.; Izuta, T.; Zheng, Y.; Shimizu, H.; Sheu, B.H.; Liu, C.P.; Agrawal, M.; Wahid, A.; Abdel-Latif, N.M.; van Tienhoven, M.; de Bauer, L.I. & Domingos, M.** 2001. Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. *Water, Air and Soil Pollution*. 130(1/4): 107-118.
- Engel, V.L., Morais, A.L. & Poggiani, F.** 1984. Guia de localização e reconhecimento das principais espécies arbóreas do Parque da Esalq. Relatório de Pesquisa. FEALQ.
- Esposito, M.P., Ferreira, M.L., Sant'Anna, S.M.R., Domingos, M. & Souza, S.R.** 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' under environmental conditions in São Paulo, SE – Brazil. *Environmental Pollution*, 43(3): 619-623.
- Favaretto, V.F., Martinez, C.A., Soriani, H.H. & Furriel, R.P.M.** 2011. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environmental and Experimental Botany* 70: 20–28.
- Ferreira, I.C.M., Coelho, R.M., Torres, R.B. & Bernacci, L.C.** 2007. Solos e vegetação nativa remanescente no Município de Campinas. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.9, p.1319-1327.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. & Kunert, K.J.** 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92, 696–717.
- Foyer, C.H. & Noctor, G.** 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119,355–364.
- Freedman, B.** 1995. *Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses.* 2nd ed. Academic Press Inc., San Diego.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Sanz, M.J., Domingos, M. & Salatino, A.** 2008. *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., a native Atlantic Forest species, as a bioindicator of ozone: visible injury. 2008. *Environmental Pollution* 152, 361 – 365.

- Gadallah, F. M.** 2000. Seed density in relation to germination and seedling quality in cotton *Gossypium barbadense* L. Alexandria Journal of Agricultural Research (Egypt) v. 45(2) p. 119-137.
- Gandolfi, S.** 2000. História natural de uma Floresta Estacional Semidecidual no município de Campinas, SP. Tese de Doutorado, Universidade de Campinas, São Paulo.
- Gill, S.S. & Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 12: 909 – 930.
- González, C.M., Casanovas, S.S. & Pignata, M.L.** 1996. Biomonitoring of air pollutants from traffic and industries employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot. in Córdoba, Argentina. Environmental Pollution, Vol. 91, No. 3, pp. 269-277.
- González, C.M., Lingua, M. & Gudiño, G.L.** 2012. Evaluación de la calidad atmosférica sobre una sección de la cuenca del río suquia (Córdoba, Argentina) mediante el empleo del biomonitor *Usnea amblyoclada*. Rev. Int. Contam. Ambie. 28 (4) 311-322.
- Gratão, P.L., Prasad, M.N.V., Cardoso, P.F., Lea, P.J. & Azevedo, R.A.** 2005. Phytoremediation: green technology for the cleanup of toxic metals in the environment. Brazilian Journal of Plant Physiology 7: 53-64.
- Guaratini, T.M.G., Gomes, E.P.C., Tamashiro, J.Y. & Rodrigues, R.R.** 2008. Composição florística da Reserva Municipal de Santa Genebra. Revista Brasileira de Botânica 31, 323-337.
- Gutjahr, M.R. & Tarifa, J.R.** 2004. Avaliação da qualidade do ar em Paulínia – SP. Boletim Goiano de Geografia 24: 55-68.
- Guzy, M.R. & Heath, R.L.** 1993. Responses to ozone of varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). New Phytologist 124, 617 – 625.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.** 2007. Free Radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford University Press. pp. 1 – 851.

- Halliwell, B.** 2009. The wandering of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine* 46 p. 531 – 542.
- Hansen, U., Fiedler, B. & Rank, B.** 2002. Variation of pigment composition and antioxidative systems along the canopy light gradient in a mixed beech/oak forest: a comparative study on deciduous tree species differing in shade tolerance. *Trees* 16, 354–364.
- Heath, R. L.** 2008. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change?. *Environmental Pollution*. 155: 453-463.
- ICP – Forest.** 2005. United Nations Economic Commission for Europe Convention on Long-range Transboundary Air Pollution – International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests. Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests Part IV – Sampling and Analysis of needles and leaves.
- INEA.** Instituto Estadual de Engenharia do Meio Ambiente. 2010. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inea.rj.gov.br/fma/qualidade-ar.asp#poluentes>.
- Iqbal, M., Abdin, M. Z., Mahmooduzzafar, Y.A. & Agrawal, M.** 1996. Resistance mechanism in plants against air pollution. In: M. Yunus, M. Iqbal (Eds.). *Plant Response to Air Pollution*. Jhon Wiley and sons, Chischester, pp.195-204.
- Iriti, M. & Faoro, F.** 2007. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollut.* 187: 285–301.
- Júnior, L.R., Hoehr, N.F. & Vellasco, A.P.** 2001. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 112-119.
- Klumpp, G., Furlan, C.M., Domingos, M. & Klumpp, A.** 2000. Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Science of Total Environment* 246, 79 – 91.

- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. & Fomin, A.** 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (Eurobionet). *Revista Brasileira Botânica* 24 (4): 511 – 518.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M. J., Rasmussen, S., Ribas, H., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P. & Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment*. 40 (38): 7437 – 7448.
- Kraus, T.E.; Evans, R.C.; Fletcher, R.A. & Paul, S.K.P.** 1995. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Canadian Journal Botany* 73(6): 797-806.
- 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.
- Kumari, S. Agrawal, M. & Tiwari, S.** 2013. Impact of elevated CO<sub>2</sub> and elevated O<sub>3</sub> on *Beta vulgaris* L.: Pigments, metabolites, antioxidants, growth and yield. *Environmental Pollution* 174: 279-288.
- Lascano, H.R., Gómez, L.D., Casano, L.M. & Trippi, V.S.** 1998. Changes in glutathione reductase activity and protein content in wheat leaves and chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 36 (4). 321-329.
- Levin A.G. & Pignata M.L.** 1995. *Ramalina ecklonii* a bioindicator of atmospheric pollution in Argentina. *Can. J. Bot.* 73, 1196-1202.

- Lima, E.S. & Abdalla, D.S.P.** 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 37, n. 3.
- Lorenzi, H.** 1992. Árvores brasileiras. Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa. Ed. Plantarum. 352p.
- Manahan, S.E.** 1999. *Environmental chemistry*. 7 ed. Florida: CRC Press LLC. p 898.
- Manning, W.L.** 2003. Detecting plants effects is necessary to give biological significance to ambient ozone monitoring data and predictive ozone standards. *Environmental Pollution* 126: 375-379.
- Massman, W.J., Musselman, R.C. & Lefohn, A.S.** 2000. A conceptual ozone dose-response model to develop a standard to protect vegetation. *Atmospheric Environment* 34: 745-759.
- Mhamdi, A., Noctor, G. & Baker, A.** 2012. Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 525: 181–194.
- Michael, P.I. & Krishnaswamy, M.** 2011. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 74:171– 177.
- Miguel, A.H.** 1992. Poluição atmosférica urbana no Brasil: uma visão geral. *Química nova* 15 (2): 138-142.
- Miller, G., Shulaev, V. & Mittler, R.** 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.* 133, 481–489.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405 – 410.
- Molina, M.J. & Molina, L.T.** 2004. Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association* 54: 644 – 680.

- Morais, J.A.D.** 2002. Estudo do impacto ambiental na utilização do gás natural em substituição ao óleo combustível nas fontes industriais no município de Paulínia – SP empregando o modelo ISCST3. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Moura, B.B.** 2013. Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Muggli, R.** 1993. Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: Free radicals and antioxidants in nutrition (F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi and C. Rice-Evans eds.). Richelieu Press, London, p. 189 – 250.
- Nakano, Y. & Asada, K.,** 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.
- Neill, S., Desikan, R. & Hancock, J.** 2002. Hydrogen peroxide signalling, *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 388-395.
- Nogueira, A., Martinez, C.A., Ferreira, L.L. & Prado, C.H.B.A.** 2004. Photosynthesis and water use efficiency in twenty tropical tree species of differing succession status in a Brazilian reforestation. *Photosynthetica* 42 (3): 351-356.
- Oga, S.** 2003. Fundamentos de Toxicologia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu Editora.
- Oliveira, A.P., Bornstein, R.D. & Soares, J.** 2003. Annual and diurnal wind patterns in the city of São Paulo. *Water, air and soil pollution*, 3:3-15.
- Oswald, W.F., Kraus, R., Hipelli, S., Benz, B., Volpert, R. & Elstner, E.F.** 1992. Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Physiology*, v.139, p.742-748.
- Overmyer, K., Wrzaczek, M. & Kangasjärvi, J.** 2009. Reactive Oxygen Species in Ozone Toxicity. In: Baluška, F., Vivanco, J. (Eds.), *Signaling and Communication in Plants*, pp. 191-207.

- Pastori, G.M. & Foyer, C.H.** 2002. Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology*, v.129, p.460-468.
- Pedroso, A.N.V.** 2006. Avaliação estrutural de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ sob diferentes níveis de contaminação atmosférica. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Peltzer, D. & Polle, A.** 2001. Diurnal fluctuations of antioxidative systems in leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*): response to light and temperature. *Physiol. Plant.* 111, 158–164.
- Peltzer, D., Dreyer, E. & Polle, A.** 2002. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 141–150.
- Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B.S. & Filella, L.** 1999. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (N.E. Spain) 56: 221-224.
- Percy, K.E., Legge, A.H. & Krupa, S.V.** 2003. Tropospheric ozone: A continuing threat to global forests? In: Karnosky, D.F., Percy, K., Chappelka, A.H., Simpson, C., Pikkarainen, J., Versteeg-Buschman. (Eds.), *Air Pollution, Global Change and Forests in the New Millennium*, pp. 85-118.
- Pignata, M.L., Gudiño, G.L., Wannaz, E.D., Pla, R.R., González, C.M., Carreras, H.A. & Orellana, L.** 2002. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. *Environmental Pollution* 120: 59-68.
- Prezotti, P.R. & Tresmondi, A.C.C.L.T.** 2006. Inventário de emissões de compostos orgânicos voláteis de uma indústria petroquímica: tanques e emissões fugitivas. *Engenharia Ambiental* 3: 58-72.

- Rendón, M.Y., Gratão, P.L., Salva, T.J.G. Azevedo, R.A. & Bragagnolo, N.** 2013. Antioxidant enzyme activity and hydrogen peroxide content during the drying of Arabica coffee beans. *Eur Food Res Technol.* 236:753–758.
- Robinson, J.M. & Sicher, R.C.** 2004. Antioxidant levels decrease in primary leaves of barley during growth at ambient and elevated carbon dioxide levels. *Int. J. Plant Sci.* 165(6):965–972.
- Saldiva, P.H.N., Pope, C.A., Schwartz, J., Dockery, D.W., Lichtenfels, A.J., Salge, J.M., Barone, I. & Bohm, G.M.** 1995. Air pollution and mortality in elderly people – A time series study in São Paulo, Brazil. *Archives of Environmental Health*, 50, 159-163.
- Sanches, M.C., Ribeiro, S.P., Dalvi, V.C., Da Silva, M.B., De Souza, H.C. & Lemos-Filho, J.P.** 2010. Differential leaf traits of a neotropical tree *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (Lecythidaceae): comparing saplings and emergent trees. *Trees* 24, 79–88.
- Sawyer, F. R., 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.
- Scandalios, J.G.** 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7- 12.
- Seinfeld, J.H.** 1985. The relations between ozone, NO<sub>x</sub> and hydrocarbons in urban and polluted rural environments. *Atmospheric Environment*, 33:1821-1845.
- Sharma, Y. K. & Davis, K. R.** 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology , Medicine*, Vol. 23, No. 3, pp. 480–488.
- Sharma, P. & Dubey R.S.** 2005. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J. Plant Physiol.* 162. 854-864.
- Shriner, D.S. & Karnosky, D.F.** 2003. What is the role of demographic factors in air pollution and forests? In: *Air Pollution, Global Change and Forests in the New Millennium*.

- Singh, E., Tiwari, S. & Agrawal, M.** 2010. Variability in antioxidant and metabolite levels, growth and yield of two soybean varieties: An assessment of anticipated yield losses under projected elevation of ozone. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 135:168–177.
- Smirnoff, N.** 2005. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. in: N. Smirnoff (Ed.), *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 53-86.
- Smith, I.K.; Vierheller, T.L. & Thorne, C.A.** 1998. Assay of glutathione reductase in crude tissue-homogenates, using 5,5'-DITHIOBIS (2-nitrobenzoic acid). *Annals of Biochemistry* 125: 27-58.
- Soares, A.M.S. & Machado, O.L.T.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* V.1, n. 1, p. 9.
- Souza, S.R. & Carvalho, L.R.F.** 1998. Determinação de ácidos carboxílicos na atmosfera de São Paulo. Uma abordagem analítica e ambiental. *Química Nova*, São Paulo, 20(3): 245-249.
- Tausz, M., Bytnerowicz, A., Arbaugh, M.L., Wonisch, A. & Grill, D.** 2001. Multivariate patterns of biochemical responses of *Pinus ponderosa* trees at field plots in the San Bernardino Mountains, southern California. *Tree Physiology* 21: 329–336.
- Tausz, M., Jiménez, M.S. & Grill, D.** 1998. Antioxidative defence and photoprotection in pine needles under field conditions. A multivariate approach to evaluate patterns of physiological response at natural sites. *Physiologia Plantarum* 104:170-764.
- Tausz, M., Landmesser, H., Posch, S., Monschein, S., Grill, D. & Wienhaus, O.** 2007. Multivariate patterns of antioxidative and photoprotective defence compounds in spruce needles at two central European forest sites of different elevation. *Environ Monit Assess* 128:75–82.
- Tausz, M., Wonisch, A., Grill, D., Morales, D. & Jiménez, M.S.** 2003. Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *Journal of Experimental Botany*, 387 (4): 1505-510.

- Tresmondi, A.C.C.L.T.** 2003. Qualidade do ar na área de Influência do pólo industrial de Paulínia - SP: 2000-2002. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP.
- Ueda, Y., Uehara, N., Sasaki, H., Kobayashi, K. & Yamakawa, T.** 2013. Impacts of acute ozone stress on superoxide dismutase (SOD) expression and reactive oxygen species (ROS) formation in rice leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 396-402.
- Vranova, E., Atichartpongkul, S., Villarroel, R., Montagu, M.V. & Inze, D.W.V.** 2002. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99 870-875.
- Wannaz, E.D. & Pignata, M.L.** 2006. Calibration of four species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry* 53: 185-209.
- Weigel, H. J. & Bender, J.** 2009. Atmospheric composition – a threat to crop growth and health? In: F. Feldmann, D.V. Alford, & C. Furk (eds.). *Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic*. Selbstverlag, Berlin, pp. 22-32.
- Yang, Y., Han, C., Liu, Q. Lin, B. & Wang, J.** 2008. Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 30: 433 e 440.
- Yunus, M. & Iqbal, M.** 1996. *Plant response to air pollution*. 1 ed. England: John Wiley & Sons, 558 p.