

SOLANGE EULÁLIA BRANDÃO

Potencial redox de árvores nativas do domínio da Mata Atlântica, em São Paulo, expostas a perturbações ambientais

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 – 2016

SOLANGE EULÁLIA BRANDÃO

Potencial redox de árvores nativas do domínio da Mata Atlântica, em São Paulo, expostas a perturbações ambientais

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. MARISA DOMINGOS

Ficha Catalográfica elaborada pelo NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA

Brandão, Solange Eulália

B817p Potencial Redox de arvores nativas do domínio da Mata Atlântica, em São Paulo, expostas, as perturbações ambientais /Solange Eulália Brandão -- São Paulo, 2016.
87p. il

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, 2016.

Bibliografia.

1. Mata Atlântica. 2. Estresse Ambientais. 3. Antioxidantes. I. Título

CDU:581.526.422.2

À minha família: Teresinha Brandão,
Eurípedes Brandão (*in memoriam*),
Andréa e Simone.

“...quando dois pontos de vista são expressados com a mesma intensidade, a verdade não se encontra necessariamente entre as duas opiniões. É possível que uma delas esteja simplesmente errada.”

Richard Dawkins

AGRADECIMENTOS

Olha que interessante estou na página de agradecimentos da minha tese de Mestrado, para chegar até esta página o caminho foi enorme, quantos passos, quantas incertezas, derrotas, vitórias, mais incertezas e o principal tantas pessoas que passaram por mim e graças a Deus a maioria me trouxeram só coisas boas e quero mantê-las na minha vida de uma forma ou de outra.

Primeiramente a minha orientadora, Marisa Domingos, pessoa singular que muito vem me ensinando, obrigada pela confiança, obrigada pelo exemplo profissional, obrigada pela oportunidade, obrigada por me deixar fazer parte de sua vida profissional, obrigada por tudo, quando eu “Crescer” quero ser igual a você.

A minha outra Orientadora Patrícia Bulbovas que muito me ensinou e sei que sempre que eu precisar ela estará pronta para me ajudar, obrigada por tudo.

A Carla Zuliani obrigada por ter me levado para o Instituto de Botânica, por seus ensinamentos, obrigada.

Ao eterno grupo Paulínia, um grupo de trabalho que se tornou muito mais que colegas de trabalho, que foi muito mais que um emprego se eu pude realizar este Mestrado foi graças a vocês: Patrícia Bulbovas e Carla Zuliani foram muito mais que coordenadoras, Patrícia Giampaoli me identifiquei muito e aprendi muito com você, Cristiane Aguiar, Andressa Ribeiro, Leonardo Fujita, obrigada pelos momentos de descontração.

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

À coordenação e funcionários da Pós Graduação.

À Capes, pela bolsa de mestrado concedida.

Os agregados do grupo Paulínia: Giovanna, que também fez parte do meu mestrado, obrigada por sua espontaneidade, o que seria das coletas sem suas frases de efeito tipo “aprendi com a vida”, você sabe do que estou falando.

Ricardo com toda sua calma e serenidade, gostaria de ter metade dessa calma, obrigado por tirar dúvidas na estatística e instalar o sigma um milhão de vezes no meu computador. Ao Thiago Tassinari, que coletou as plantas com tamanha competência (só você não sofre com o Podão).

Ao Marcos Enoque obrigado por participar de todas as minhas coletas em Paranapiacaba, pelas conversas após coletas, por me dar aula de identificação entre uma cerveja e outra, graças a isso sou capaz de identificar algumas plantas com suas dicas.

A Amariles, o que seria de nós sem você, sem seu Tutu, sem sua amizade, sem seus ensinamentos, sem suas piadas sem sua companhia. Você é figura importante em todos os trabalhos da Ecologia, sua dedicação nos contagia. Te amamos

A Giselle Pedrosa, pela amizade, sou uma pessoa muito feliz por ter te conhecido, você é uma guerreira que merece tudo de bom em sua vida, obrigada por sempre me ouvir, a Débora, a Vanessa, Josiane que junto com a Giovanna e Giselle me proporcionarão momentos incríveis.

A Marcela que vem caminhando comigo desde a Faculdade, compartilhamos juntas, tristezas, frustrações, incertezas, conhecimentos e muitas alegrias, obrigada pelos momentos de descontração e de amizade. Foram muitas mudanças na nossa vida, e que as mudanças continuem.

Às Dras. Mirian Rinaldi, Regina Moraes, pelas incontáveis ajudas no laboratório, esclarecendo as dúvidas sempre com disposição e atenção.

Ao meu querido Amigo Edval Faria obrigada pelas incontáveis conversas desde a Facul, obrigada por deixar eu fazer parte da sua vida e de sua linda Família, obrigada pela boa Música que você proporciona a cada Show da sua Banda.

Um agradecimento especial aos amigos que fiz durante todo o período: Aninha Dias, Celle Dafré, Pedro Ivo (mesmo com Receio), Yukio Hayashi, Bruno, Douglas Dourado e Mauricio. Obrigada por dividirem todos esses anos comigo.

Aos aquáticos, Thiago, Krysna, Samantha, Mayara, Diego e Richard e em especial ao Stéfano “Aquamen” o que seria da sala dos alunos sem você.

Enfim a minha Família ao meu Pai (in memorian), sei que você sempre está ao meu lado e torcendo por mim, a minha Mãe que sem ela nada seria possível Te Amo.

RESUMO

Os ecossistemas florestais têm sido afetados por estresses naturais, como extremos nas condições climáticas e estresses de origem antrópica, como a poluição atmosférica, que vem aumentando ao longo dos anos, devido ao crescente uso e ocupação do solo pelo homem. Os estresses ambientais podem ocasionar o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), que agirão em nível celular, ocasionando diversas alterações nos processos bioquímicos e fisiológicos de plantas, podendo ocasionar a morte de indivíduos e, com isso, causar mudanças na estrutura de populações e ocasionar a eliminação de espécies sensíveis da comunidade vegetal, alterando sua estrutura e fisionomia. A intensidade dos efeitos causados pelas ERO nas plantas, no entanto, depende de quão eficiente é seu sistema de defesas antioxidantes, que são capazes de impedir ou restringir a produção excessiva dessas ERO. Assim, o presente estudo foi proposto objetivando: conhecer o perfil das defesas antioxidantes em espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras presentes em remanescentes de Mata Atlântica em São Paulo; avaliar se estes antioxidantes são potencialmente capazes de impedir ou restringir danos celulares; determinar se há variação espacial e sazonal nessas características bioquímicas das espécies incluídas no estudo e indicar possíveis fatores de estresse ambiental indutores das variações no potencial redox nos dois grupos de espécies. Assumimos as seguintes hipóteses gerais de trabalho: as espécies arbóreas pioneiras apresentam níveis de tolerância ao estresse oxidativo similares entre si e maiores dos das espécies arbóreas não pioneiras; as características antioxidantes de espécies arbóreas pertencentes a ambos os grupos funcionais variam espacialmente em função de efeitos combinados de fatores de estresse ambiental, de origens natural e antrópica. Para isso, foram realizadas coletas de folhas de espécies pertencentes a cada uma dessas categorias sucessionais em três fragmentos de Mata Atlântica incluídos em unidades de conservação no Estado de São

Paulo (Parque Municipal Nascentes de Paranapiacaba/Santo André, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga/São Paulo, ARIE Mata de Santa Genebra/Campinas) expostos a condições climáticas e fontes de poluição distintas, em períodos úmido e seco, para análise de ácido ascórbico, glutathione, catalase, superóxido dismutase, glutathione reductase, indicadores de danos oxidativos como teor de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) e hidroperóxido dienos conjugados. As espécies arbóreas pioneiras apresentaram características bioquímicas similares entre si e distintas das características das espécies não pioneiras. Essas características bioquímicas das espécies de ambos os grupos funcionais variaram espacialmente em função de efeitos combinados de fatores de estresse ambiental, de origens natural e antrópica. No Parque de Paranapiacaba, as espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras mostraram ser menos suscetíveis ao estresse oxidativo. As respostas bioquímicas das árvores pertencentes a ambos os grupos funcionais seguiram gradientes lineares nas condições climáticas e de concentração de e poluentes gasosos oxidativos estabelecidos entre os locais de estudo.

Palavras chaves: Estresses ambientais, Mata Atlântica, espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras, antioxidantes, danos oxidativos,

ABSTRACT

Forest ecosystems have been affected by natural stresses, such as extreme climatic conditions, and stresses of anthropogenic origin, such as air pollution, which has been increasing over the years due to the use and land occupation by man. These environmental stresses increase the reactive oxygen species (ROS) formation in plant cells, which may cause several changes in biochemical and physiological processes in plants, death of individuals, elimination of susceptible species and alterations in the structure of populations and the entire plant community. The severity of oxidative damage caused by ROS in plants, however, depends on how effective is their antioxidant defense system, which is able to prevent or restrict the excessive production of ROS. Thus, this study was proposed aiming to: know the profile of antioxidant defenses in pioneer and non-pioneer species present in Atlantic Forest remnants in São Paulo; assess whether these antioxidants are potentially capable of preventing or restricting oxidative cell damage; determine whether spatial and seasonal variations in these biochemical characteristics of the species included in the study are evidenced and indicate possible environmental inducers of changes in the redox potential in the two successional groups of species. We assumed the following general working hypotheses: the tolerance level against oxidative stress is similar in the pioneer tree species and higher than the tolerance level of the non-pioneer tree species; antioxidant characteristics in tree species belonged to both successional groups vary spatially in response to combined effects of natural and anthropogenic stresses. Therefore, leaf samples from pioneer and non-pioneer species were collected in three Atlantic Forest fragments included in conservation unities in São Paulo State (*Parque Municipal Nascentes de Paranapiacaba* in Santo André, *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga* in São Paulo, *ARIE Mata de Santa Genebra* in Campinas) exposed to distinct climatic conditions and air pollution sources, during wet

and dry periods, for analyses of ascorbic acid, glutathione, catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, indicators of oxidative damage, such as pigments (chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids) and hydroperoxide diene conjugated. The pioneer tree species showed similar biochemical characteristics and different from the characteristics of non-pioneer species. These biochemical characteristics of both successional groups varied spatially in response to combined effects of natural and anthropogenic stresses. The pioneer and non-pioneer tree species from the Paranapiacaba Park were less susceptible to oxidative stress than the species sampled in the other conservation unities. The biochemical responses of trees belonging to both functional groups followed linear gradients in climatic conditions and concentrations oxidative gaseous established between the study sites.

Key words: environmental stresses, Atlantic Forest, pioneer tree species and non-pioneer, antioxidants, oxidative damage.

SUMÁRIO

1. Introdução e Justificativas	1
1.1 Espécies reativas de Oxigênio (EROS): definição, formação e efeitos em plantas.....	2
1.2 Defesas Antioxidantes Associadas ao Ciclo Ascorbato-Glutationa.....	5
1.3 Abordagem Ecosistêmica Funcional.....	9
2. Hipoteses e Objetivo	15
3. Material e Métodos	17
3.1 Áreas de Estudo	17
3.2 Espécies Arbóreas incluídas no Estudo.....	21
3.3 Coletas de folhas das espécies arbóreas escolhidas.....	25
3.4 Análises das defesas antioxidantes e dos indicadores de danos oxidativos.....	26
3.5 Caracterizações de variáveis abióticas relevantes para o estudo (clima e qualidade do ar).....	30
3.6 Análises estatísticas	34
4. Resultados	37
5. Discussão	71
6. Conclusão	77
7. Referências Bibliográficas	78

1.Introdução e Justificativas

Os ecossistemas florestais estão sujeitos e se aclimatam aos estresses ambientais naturais causados por oscilações climáticas, como extremos de temperatura, déficit hídrico e excesso de radiação solar (Tausz *et al.* 2007, Favaretto *et al.* 2011). Mudanças no clima com eventos extremos, aumento das concentrações de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico e aumento da deposição de nitrogênio estão entre os estresses ambientais que têm afetado as florestas durante a últimas décadas. Esses estresses podem causar efeitos diretos, como, por exemplo, os causados pelo CO₂ elevado sobre o crescimento florestal e uso de água, e indiretos, tais como o aumento da vulnerabilidade a grandes ataques de insetos e incêndios (Bentz *et al.* 2009, Turetsky *et al.* 2010).

Individualmente e em conjunto, estes grandes fenômenos de perturbação ambiental estão alterando paisagens florestais e possivelmente poderão causar mudanças permanentes em longo prazo, na estrutura da floresta, função e composição de espécies (Hickey *et al.* 2012, McKenzie *et al.* 2004).

Além disso, devido à expansão das cidades e das atividades agrícolas e industriais nas últimas décadas, os ecossistemas florestais vêm sendo fragmentados e afetados pela crescente emissão de poluentes para atmosfera por atividades antrópicas (Emberson *et al.* 2001, McKee *et al.* 2004, Giam *et al.* 2010, Pérez-Veja *et al.* 2012). Sendo assim, aos estresses naturais aos quais as florestas estão submetidas, devem ser acrescentados também aqueles causados pela poluição atmosférica, há muito reconhecida como tóxica aos seres vivos (Emberson *et al.* 2001).

Em São Paulo, por exemplo, a Mata Atlântica, além de severamente fragmentada por usos diversificados da terra em função do grande adensamento populacional (Freitas *et al.* 2010; Groeneveld *et al.* 2009; Lira *et al.* 2012; Ribeiro *et al.* 2009), está também

exposta à emissão de quantidades consideráveis de poluentes para a atmosfera (Domingos *et al.* 2003, 2015).

O estresse causado por condições climáticas como seca, salinidade, baixas temperaturas, e a radiação UV-B pode ser consequência do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula vegetal. Estas são produzidas naturalmente nas plantas através de seus processos metabólicos como a respiração e a fotossíntese (Gill & Tuteja 2010). Mas, sua formação pode ser intensificada em resposta à absorção de poluentes atmosféricos, com poder oxidativo, pelas plantas. Podemos citar entre os poluentes o ozônio, que pode levar à diminuição da área foliar e da condutância estomática levando à diminuição da taxa fotossintética e consequentemente baixa produção de biomassa, dependendo da condição de nutrição e disponibilidade de água para as plantas (Matyssek & Sandermann 2003)

Quando em excesso, as EROs podem agir no apoplasto e em diferentes compartimentos celulares, desencadeando uma série de reações oxidativas e também de respostas de defesa contra o estresse oxidativo, conforme será detalhado a seguir.

1.1 Espécies reativas de Oxigênio (EROS): definição, formação e efeitos em plantas

As EROs apresentam oxigênio em sua composição e são bastante oxidativas. Podem ser radicais, que são moléculas que possuem elétrons desemparelhados, ou não radicais. 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).

Entre as principais EROs causadoras de danos celulares, destacam-se radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}) e as formas não-radicalares (moleculares) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (Bray *et al.* 2000, Pastori & Foyer 2002, Gill & Tuteja 2010).

As EROs 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 (Apel e Hirt 2004, Arora *et al.* 2002, Bray *et al.* 2000). A atividade metabólica altamente oxidante e o intenso fluxo de elétrons em organelas como cloroplastos, mitocôndrias ou peroxissomos, são uma importante fonte de EROs em células vegetais (Gill & Tuteja 2010).

Superóxido é o primeiro produto de redução do oxigênio molecular e pode ser sujeito a ambas as reações de oxidação e redução. Superóxido é capaz de reagir com algumas moléculas para produzir outras espécies reativas, ou pode ser dismutado a H_2O_2 espontaneamente ou por via enzimática (Arora *et al.* 2002).

O peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado um radical livre, atua como oxidante ou redutor em muitas reações celulares. Ao contrário de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 é muito difusível através das membranas e pode inativar diretamente algumas enzimas sensíveis, mesmo em concentrações muito baixas. O peróxido de hidrogênio é bastante estável e, portanto, menos tóxico do que outras EROs. A principal ameaça imposta por ambos ($O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) reside na sua capacidade de gerar radicais hidroxila (HO^{\bullet}) (Møller *et al.* 2007).

O radical hidroxila é a espécie com maior potencial para oxidar várias moléculas. Ela é capaz de reagir com quase todas as moléculas biológicas e danos componentes celulares. Não existe nenhum mecanismo enzimático para neutralizar (HO^{\bullet}); portanto, sua geração excessiva geralmente leva à morte celular (Møller *et al.*, 2007).

As EROs, ao oxidar as biomoléculas, criam uma lesão oxidativa que resulta em redução do crescimento e desenvolvimento das plantas (Hernandez-Jimenez *et al.* 2002). Uma vez que as meia-vidas das EROs são extremamente curtas, são seus produtos finais estáveis os causadores de danos oxidativos em macromoléculas celulares (Bhaduri & Fulekar, 2012).

Estas reações promovem alterações em processos bioquímicos e fisiológicos, além de alterações ultraestruturais e estruturais (Cheng *et al.* 2007, Fiscus *et al.* 2005, Fuhrer & Booker 2003, Morgan *et al.* 2006, Oksanen *et al.* 2013, Ueda *et al.* 2013), mostrando danos não somente em nível da célula vegetal, mas também em níveis mais altos da organização biológica, como em tecidos órgãos, indivíduos, populações e comunidades. Podem surgir lesões, como cloroses e necroses nas folhas, como consequência da desorganização celular; fechamento estomático e redução da absorção de água, com consequências ao crescimento, podendo, em casos extremos, levar à morte de indivíduos (Calatayud *et al.* 2011, Cheng *et al.* 2007, Feng & Kobayashi 2009, Fuhrer 2009). Em nível de ecossistema, dependendo da intensidade do estresse e sensibilidade das espécies, podem ocorrer mudanças na estrutura de populações e comunidades, devido à eliminação de espécies sensíveis, resultando em mudanças nos processos sucessionais e na diminuição da diversidade (Miller & McBride 1999, Sandermann & Matyssek 2004).

No entanto, vale destacar que as plantas, como todos os demais seres vivos, possuem defesas antioxidantes, que são substâncias encontradas em diferentes organelas celulares, como cloroplastos, mitôcondrias e peroxissomos (Apel & Hirt, 2004; Moller *et al.* 2007), que restringem ou impedem a ocorrência de danos oxidativos, por meio da manutenção do equilíbrio entre a produção e neutralização das EROs.

A intensidade dos danos nos diferentes níveis de organização, assim, dependerá do quão eficiente a espécie vegetal é para mobilizar as defesas antioxidantes, mantendo

o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante (Blokina *et al.* 2003, Foyer & Shigeoka 2011, Gratão *et al.* 2005, Irit i& Faoro 2008, Nali *et al.* 2005).

1.2 Defesas Antioxidantes Associadas ao Ciclo Ascorbato-Glutationa

Entre as defesas antioxidantes, estão as substâncias de baixo peso molecular, ácido ascórbico e glutaciona, e as enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutaciona redutase, todas pertencentes ao ciclo ascorbato-glutaciona, (Figura 1) (Baier *et al.* 2005, Bray *et al.* 2000, Tausz *et al.* 2003, Favaretto *et al.* 2011).

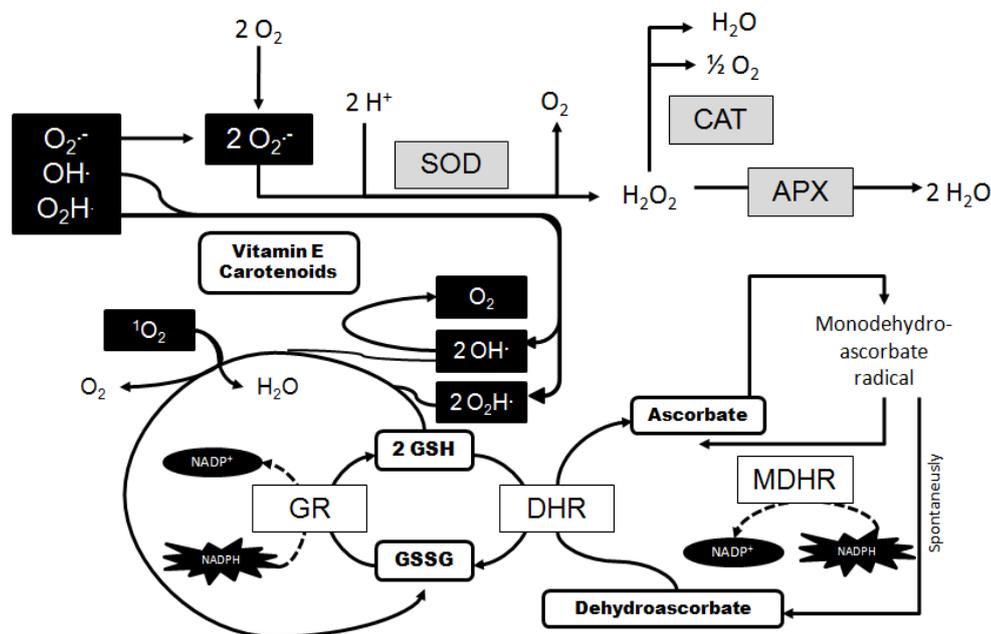


Figura 1. Sistema de defesa antioxidante nas células na presença de espécies reativas de oxigênio (adaptado de Halliwell, 2009). Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); oxigênio singlete (1O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}); enzima superóxido dismutase (SOD); enzima catalase (CAT); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); enzima ascorbato peroxidase (APX); monodehidroascorbato (MDHA - forma intermediária); monodehidroascorbato redutase (MDHR); glutaciona (forma reduzida – GSH e forma oxidada – GSSG); enzima glutaciona redutase (GR).

A enzima superóxido dismutase (SOD), considerada a primeira linha de defesa em nível celular, protege as células contra o $O_2^{\cdot-}$, que é dismutado 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 a manganês SOD (MnSOD) localizada nas mitocôndrias, cobre/zinco SOD (Cu/ZnSOD) localizada nos cloroplastos, peroxissomas e citossol e ferro SOD (FeSOD) localizada nos cloroplastos (Culotta 2001, Alscher *et al.* 2002). Essas isoenzimas são ativadas por vários estresses abióticos, como estresse hídrico, oscilações de temperatura, hipóxia e concentrações tóxicas de metais pesados (Mittler, 2002; Apel e Hirt, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007; Kauppanapandian *et al.* 2011).

A catalase (CAT) é uma enzima com um grupo heme que catalisa a reação que reduz H_2O_2 , produzido em peroxissomos durante β -oxidação e na foto-respiração, em H_2O e O_2 . A catalase assim como a superóxido dismutase, possui três isoformas denominadas catalases classe I, classe II e classe III, sendo localizadas em tecidos fotossintetizantes, tecidos vasculares e tecidos reprodutivos, respectivamente e seus genes são expressos e regulados de forma independente (Willekens *et al.*, 1995; Mittler, 2002; Blokina *et al.*, 2003; Karuppanapandian *et al.*, 2011).

Ascorbato peroxidase (APX) catalisa a reação que reduz H_2O_2 no cloroplasto e citosol, usando ácido ascórbico como um doador de hidrogênio e produzindo monodehydroascorbate (MDHA). Há quatro isoformas principais: (a) tilacóide APX (tAPX), (b) formas glioxissomos de membrana (gmAPX), (c) forma solúvel no estroma do cloroplasto (sAPX), (d) forma citosólica (cAPX) (Asada, 2000; Ahmad e Umar, 2011).

O ácido ascórbico (AA) é um dos antioxidantes não enzimáticos mais importantes, sendo encontrado em várias organelas celulares e no apoplasto (Horemans *et al.*, 2000, Smirnoff, 2000). Sob condições fisiológicas normais, o AA existe principalmente na sua forma reduzida nos cloroplastos. A capacidade de o AA doar elétrons em uma ampla gama de reações enzimáticas e não enzimáticas faz com que seja o principal composto

desintoxicante de EROs. O AA é capaz de neutralizar $O_2^{\bullet-}$ -OH e O_2H^{\bullet} e também auxilia na redução de H_2O_2 em H_2O , reação catalisada pela APX, como comentado anteriormente. Além de seu papel fundamental no ciclo-ascorbato glutationa, o ácido ascórbico atua também em outras linhas de defesas como co-fator de violaxantina de-epoxidase contribuindo para a dissipação térmica do excesso de energia de excitação (EEE) e também é responsável pela regeneração do tocoferol (Horemans *et al*, 2000; Smirnoff, 2000; Noctor e Foyer, 2011).

A glutationa reduzida (GSH) tem um importante papel na proteção das plantas contra danos oxidativos. Este tripeptídeo multifuncional é abundante nos tecidos das plantas, existe em todos os componentes celulares, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, vacúolos e citoplasma (Noctor e Foyer, 1998). Em conjunto com sua forma oxidada (GSSG), a GSH está envolvida na regulação do metabolismo celular, em ambas as condições de estresse e não estresse. Sua principal função na defesa antioxidante é regenerar o ácido ascórbico oxidado (deidroascorbato; Figura 1), no ciclo ascorbato – glutationa. Ocorre alteração na concentração de sua forma reduzida (GSH), para a forma oxidada (GSSG) sob condição de estresse (Horemans *et al*, 2000; Smirnoff, 2000; Foyer e Noctor, 2011).

A glutationa redutase (GR) catalisa a redução glutationa oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH), utilizando NADPH. Esta enzima é importante para manter a concentração de GSH e um aumento na atividade da GR melhora o desempenho da planta em condições desfavoráveis (Karuppanapandian *et al*. 2011).

A análise de possíveis mudanças nos níveis dos componentes do ciclo ascorbato-glutationa frente ao estresse oxidativo contribui, assim, 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. Além disso, medidas de indicadores de estresse oxidativo, como alterações na quantidade de pigmentos (clorofila *a* e *b*), quantidade de peróxido de hidrogênio e de subprodutos da peroxidação lipídica nas membranas celulares, como malondialdeído e hidroperóxidos conjugados, também podem auxiliar na interpretação do quanto suscetível uma espécie florestal é aos fatores de estresse impostos pelas oscilações climáticas e atividades antrópicas (Tausz *et al.* 2001, Tausz *et al.* 2003).

Na literatura, existem estudos direcionados à análise de componentes do sistema antioxidante como indicadores ecológicos do potencial das espécies nativas de tolerarem o estresse oxidativo imposto pela poluição atmosférica, déficit hídrico, frio ou calor, interpretando os resultados de forma integrada, com base nas condições ambientais às quais as florestas estão submetidas. Entre eles, podem ser citados os diversos estudos realizados em florestas de regiões de clima temperado, como as de San Bernadino, na Califórnia (Tausz *et al.* 1998, Tausz *et al.* 2001, Tausz *et al.* 2003) e na Saxônia, Alemanha (Tausz *et al.* 2007). Porém, nas regiões tropicais e subtropicais, inclusive no Brasil, há uma lacuna de conhecimento acerca do assunto, embora o nível de poluição ambiental seja suficientemente alto e as alterações climáticas sejam também perceptíveis (Emberson *et al.* 2001, Emberson 2003, Favaretto *et al.* 2011, Domingos *et al.* 2015). Esse fato e ainda o de que a Mata Atlântica tem sido considerada como um dos hotspots para conservação da biodiversidade (Forzza *et al.* 2012) nos estimularam a propor o presente estudo.

Entretanto, ao se estudar as regiões tropicais e sub-tropicais, deve-se considerar sua alta biodiversidade, que impõe uma barreira para reproduzir modelos metodológicos aplicados nos ambientes de clima temperado, onde apenas poucas espécies são consideradas para avaliar e inferir sobre os efeitos oxidativos causados pelos diferentes estresses ambientais nas florestas. Uma alternativa seria fazer uso de uma abordagem

ecossistêmica funcional, avaliando-se o potencial redox de espécies florestais submetidas a diferentes fatores de estresse (naturais ou antrópicos), que possuem funções ecológicas similares.

1.3 Abordagem Ecossistêmica Funcional

A busca de regras gerais que associam espécies e condições ambientais e, em particular, a busca de associações entre fatores abióticos e bióticos e características de espécies tem preocupado ecólogos por décadas. No início deste século, o desejo de prever simultaneamente respostas da vegetação às mudanças globais e alterações nas funções mais importantes dos ecossistemas terrestres (como ciclos biogeoquímicos, resistência à invasão, a estabilidade em face de perturbação) reavivou este conceito de classificação funcional das espécies vegetais. Um quadro conceitual (Figura 2) e métodos foram desenvolvidos por Lavorel & Garnier (2002) para prever mudanças em processos ecossistêmicos, como nos ciclos biogeoquímicos, considerando o papel das plantas na estrutura e processos dos ecossistemas.

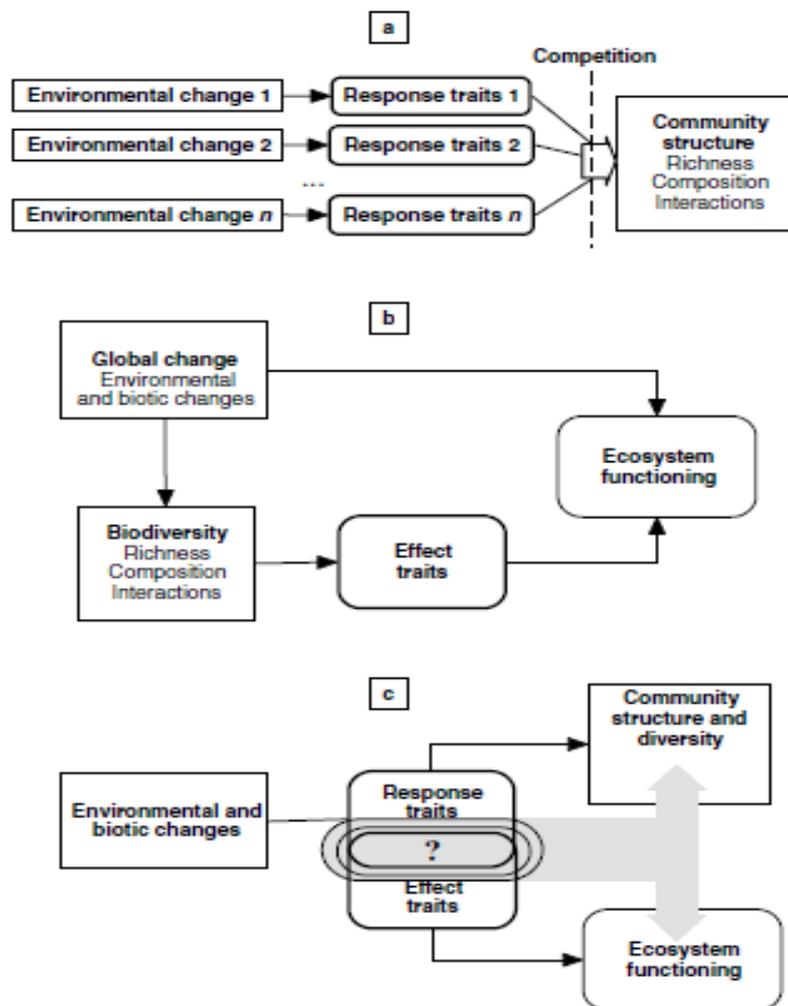


Figura 2. Estrutura conceitual proposto por Lavorel & Garnier (2002) para estudar efeitos das mudanças ambientais sobre a estrutura da comunidade vegetal (ou biodiversidade) e funcionamento do ecossistema. (a) A simplificação da teoria do filtro de Keddy (1992) e Woodward & Diament (1991), onde a resposta da estrutura da comunidade às condições ambientais é o resultado de respostas características de diferentes espécies. (b) Síntese do quadro de Chapin et al. (2000), prevendo as consequências das mudanças ambientais nos ecossistemas através de efeitos característicos. (c) Representação do modelo conceitual proposto, que articula resposta ambiental e efeitos no ecossistema através de diferentes graus de sobreposição entre as características relevantes.

Lavorel & Garnier (2002), baseado em pesquisas anteriores, destacaram que muitas características de grupos funcionais, podem ser utilizadas para estudar os efeitos

das mudanças ambientais sobre a estrutura da comunidade vegetal e funcionamento do ecossistema, como por exemplo:

1. Formulário de vida, características foliares e tamanho do genoma em resposta ao clima;
2. Área foliar específica (SLA) e composição química da folha em resposta à disponibilidade de recursos do solo;
3. Ciclo de vida, taxa de crescimento relativo (TCR) e via fotossintética em resposta ao CO₂;
4. TCR, morfologia das folhas e raízes e massa de sementes em resposta ao sombreamento;
5. Ciclo de vida, altura, arquitetura, rebrota e traços de semente em resposta às perturbações ambientais ou agrícolas.

No entanto, não há estudos descritos na literatura científica que tenham testado a viabilidade de uso da abordagem ecossistêmica funcional para determinar o potencial redox, ou seja, o nível de tolerância em espécies florestais tropicais submetidas a diferentes fatores de estresse ambiental.

De qualquer modo, segundo Favaretto *et al.* (2011), já é sabido que as espécies arbóreas nativas das florestas tropicais, pelo menos na fase de plântulas, podem ser classificadas, em dois grandes grupos ecológicos, com base na exigência de luz e tolerância ao sombreamento: as intolerantes ao sombreamento (espécies pioneiras) e as tolerantes ao sombreamento (espécies secundárias tardias). As espécies pioneiras têm sido caracterizadas por taxas mais altas de fotossíntese e de acúmulo de biomassa e menor conteúdo de pigmentos do que as espécies secundárias tardias.

Ainda, espécies intolerantes à sombra (Pioneiras) possuem sementes pequenas, amplamente dispersas e os jovens se estabelecem somente em clareiras. Nesse grupo,

podem ser incluídas as árvores e os arbustos de ciclo de vida curto (< 50 anos de idade) e as pioneiras de ciclo de vida longo (> 50 anos), também classificadas como grandes pioneiras (Martínez-Ramos, 1985; Swaine & Whitmore, 1982). Espécies tolerantes a sombra (Não Pioneiras) possuem sementes maiores que podem germinar sob o dossel da floresta e persistir como juvenis ou crescer vagarosamente até a formação de clareiras (Whitmore, 1989; Schupp *et al.* 1989).

Porém, Favaretto *et al.* (2011) acrescentaram que ainda não se conhece se as espécies pioneiras apresentariam capacidade fotossintética ou nível de tolerância à fotoinibição e ao estresse oxidativo similares entre si e distintas das características do grupo de espécies não pioneiras, no caso de todas as espécies coabitarem o mesmo ambiente modificado pelo homem, durante o processo sucessional. Em caso positivo, as mencionadas respostas de fotossíntese e tolerância poderiam ser buscadas nesses dois grandes grupos funcionais das florestas tropicais, oferecendo maior amplitude ecológica à interpretação dos resultados. Tal amplitude seria também de alta aplicabilidade no planejamento da restauração de florestas fragmentadas.

Assim, Favaretto *et al.* (2011) realizaram um estudo experimental com plântulas de quatro espécies arbóreas pioneiras e quatro espécies não pioneiras, todas nativas da Floresta Atlântica, para testar a hipótese de que o grau de fotoinibição e a eficiência de enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT) dependem das características ecofisiológicas de cada grupo funcional e do nível de radiação a que estão expostas. Os resultados indicaram que o impacto da alta radiação sobre o desempenho fisiológico das espécies geralmente dependeu do grupo ecológico ao qual pertenciam, com efeitos notadamente mais intensos nas espécies secundárias tardias, confirmando a hipótese original. A atividade da SOD, a enzima antioxidante mais afetada pelas condições experimentais, tendeu a aumentar nas espécies pioneiras e reduzir nas não pioneiras, quando expostas a

alta radiação. Os autores concluíram, também, que esse aumento na atividade de SOD nas espécies pioneiras pareceu ter sido associado a aumentos da temperatura do ar ao longo do crescimento das plantas no tratamento sem sombreamento.

Aguiar *et al.* (2016) avaliaram pela primeira vez respostas antioxidantes associadas ao ciclo ascorbato-glutationa, em árvores adultas de espécies nativas ocorrentes em fragmentos de Floresta Atlântica Semidecidual, na região metropolitana de Campinas, como indicadoras do aumento da tolerância ao estresse oxidativo, quando expostas a poluentes atmosféricos e clima tropical sazonal. As respostas antioxidantes foram analisadas durante períodos úmidos e secos em folhas de uma espécie pioneira (*Croton floribundus*), uma secundária inicial (*Piptadenia gonoacantha*) e uma secundária tardia (*Astronium graveolens*). A espécie pioneira mostrou ser a espécie mais eficiente em termos de tolerância ao estresse oxidativo do que as não pioneiras. Além disso, as espécies arbóreas apresentaram padrões bioquímicos distintos em resposta ao estresse oxidativo durante os períodos seco e úmido. As defesas antioxidantes foram alteradas em resposta ao estresse fotooxidativo durante a estação úmida, estimulado por condições climáticas mais favoráveis à fotossíntese e ao crescimento das árvores. Por outro lado, as condições ambientais durante os períodos secos foram estressantes às árvores, induzindo a quebra do equilíbrio oxidante/antioxidante e aumento de respostas indicadoras de danos oxidativos, em nível celular, como peroxidação lipídica e redução no conteúdo de clorofilas.

Os resultados desses dois estudos pioneiros realizados com espécies arbóreas nativas da Floresta Atlântica valida a possibilidade de utilizar a abordagem ecossistêmica funcional, para inferir sobre o nível potencial de tolerância de fragmentos de Floresta Atlântica expostos ao estresse oxidativo induzido por fatores naturais e/ou antrópicos no Estado de São Paulo, assim como indicar qual grupo de espécies, entre as pioneiras e não

pioneiras, estaria mais apto a tolerar o estresse oxidativo. Além disso, a aplicação de tal abordagem ecossistêmica em fragmentos florestais escolhidos em função de variações espaciais previamente conhecidas em fatores climáticos e/ou nos níveis de poluentes atmosféricos reconhecidamente oxidativos, é também teoricamente possível, fazendo uso de ferramentas estatísticas multiexploratórias, indicar os fatores de estresse ambiental indutores das variações nas respostas antioxidantes mensuradas nos distintos grupos funcionais ocorrentes nos fragmentos florestais incluídos no estudo.

2. Hipóteses e Objetivos

Tendo em vista a base conceitual apresentada anteriormente, o presente trabalho visou a testar as seguintes hipóteses:

1. Espécies arbóreas pioneiras presentes em remanescentes florestais do domínio Mata Atlântica em São Paulo apresentam níveis de tolerância ao estresse oxidativo similares entre si e mais altos do que o potencial redox do grupo de espécies arbóreas não pioneiras;
2. As respostas antioxidantes em ambos os grupos funcionais em remanescentes florestais do domínio Mata Atlântica em São Paulo variam espacialmente em função de efeitos combinados de fatores de estresse ambiental, de origens natural e antrópica.

Sendo assim, este trabalho objetivou:

1. Conhecer o perfil das defesas antioxidantes (ácido ascórbico, glutathiona, superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathiona redutase) em árvores de espécies nativas presentes em remanescentes florestais do domínio Mata Atlântica em São Paulo, pertencentes a dois grupos funcionais distintos (pioneiras e não pioneiras), e avaliar se estes antioxidantes são potencialmente capazes de impedir ou restringir danos celulares, por meio da determinação de indicadores de danos oxidativos em nível celular (conteúdo de pigmentos e ocorrência de peroxidação lipídica, indicada pelo conteúdo de hidroperoxidienos conjugados);
2. Determinar se há variação espacial e sazonal nestas mesmas reações indicadoras de tolerância ao estresse oxidativo, por meio da análise de amostras foliares obtidas em períodos seco e úmido e provenientes de árvores das espécies ocorrentes em três unidades de conservação situadas nas Regiões Metropolitanas de Campinas e São Paulo e em

Paranapiacaba/Santo André e expostas a padrões climáticos e de contaminação atmosférica por poluentes oxidativos previamente conhecidos;

3. Indicar possíveis fatores de estresse ambiental indutores das variações no potencial redox nos dois grupos de espécies pioneiras e não pioneiras ocorrentes nos remanescentes florestais do domínio Mata Atlântica selecionados.

3. Materiais e Métodos

3.1. Áreas de estudo e amostragem

No estado de São Paulo, o Domínio da Mata Atlântica é composto por um mosaico diversificado de ecossistemas, como manguezais, florestas de "restinga" em solos arenosos, florestas ombrófilas densas, florestas sub-montanas e florestas semi-decíduais, com características estruturais e florísticas distintas, resultantes da alta diversidade de condições abióticas, que gera uma diversidade de habitats. Esse mosaico de vegetação está exposto a diferentes tipos climáticos, destacando: o clima caracterizado por chuvas bem distribuídas e dias quentes ao longo do ano em localidades próximas ao nível do mar; o clima caracterizado por verões chuvosos e quentes e invernos secos e frios na borda do planalto paulista e o clima caracterizado por estações seca e úmida bem definidas na região centro-oeste do Estado. Esses ecossistemas atlânticos estão estabelecidos, ainda, sobre uma diversidade de tipos de solo (Mello Filho 1991/1992, Pivello & Peccinni 2002). Devido ao intenso desenvolvimento urbano e industrial no Estado de São Paulo, esse mosaico de vegetação vem sendo alvo de inúmeras perturbações (Rocha 2008), entre elas as causadas por poluentes atmosféricos (Domingos *et al.* 2003).

As amostragens de folhas de espécies arbóreas nativas, em São Paulo, foram realizadas em três unidades de conservação, (Figura 3) onde são encontrados remanescentes de Mata Atlântica, submetidos a regimes climáticos e expostos a fontes de poluição atmosférica distintos:

- Parque Municipal Nascentes de Paranapiacaba/PP (760 - 900 m de altitude; 336 ha).

Esta unidade de conservação está localizada no alto da Serra de Paranapiacaba, distrito de Paranapiacaba, município de Santo André, distando cerca de 50 km da cidade de São Paulo (Lopes & Kirizawa 2009), (Figura 3A). O clima local, situado em domínio dos climas subtropicais, apresenta características de clima tropical de altitude, mesotérmico e

superúmido. A temperatura anual apresenta baixa amplitude térmica, em torno de 6°C, variando em média de 14 a 15°C no inverno a 21 a 22°C no verão, explicada pela presença muito próxima do oceano e pela atuação dos sistemas de circulação atmosférica. A precipitação anual média é de cerca de 3300 mm e a área está inserida na célula de maior índice pluviométrico do Brasil. Os maiores totais pluviométricos estão concentrados nos meses de primavera e verão e os menores nos meses de outono e inverno. A neblina é um fenômeno frequente na região (Gutjahr & Tavares 2009). Predominam na região solos do tipo Latossolo, Argissolo e Cambissolo (Rossi *et al.* 2009). A região é coberta pela Floresta Pluvial Atlântica, predominantemente secundária e em diferentes estágios sucessionais. Atividades antrópicas diversas ao longo de anos passados afetaram a vegetação na região de Paranapiacaba, como a retirada de madeiras de valor econômico, de plantas ornamentais e de palmito. Entre 1950 e 1980, a contínua ação de poluentes atmosféricos provenientes do pólo industrial de Cubatão degradou fortemente a vegetação local, especialmente nas escarpas do vale do Mogi, onde estão instaladas diversas indústrias químicas e siderúrgica (Sugiyama *et al.* 2009, Domingos *et al.* 2009).

- Parque Estadual das Fontes do Ipiranga/PEFI (770 - 825 m de altitude; 540 ha): Trata-se de parque urbano situado na zona sul da cidade de São Paulo (Figura 3B). O clima da região é denominado Cwb, de acordo com a classificação de Koeppen, que é descrito como clima temperado, com regime de chuvas de verão, inverno seco, temperatura média do mês mais quente abaixo de 22°C e a do mês mais frio abaixo de 18°C. A média anual de precipitação fica em torno de 1500 mm (Santos & Funari 2002). Predominam no parque solos do tipo Latossolo Vermelho Amarelo (Fernandes *et al.* 2002). A vegetação do PEFI pertence ao domínio da Mata Atlântica e, mais especificamente, ao grupo das florestas estacionais semidecíduais de planalto, que estão entre os ecossistemas mais fragmentados e devastados do país, embora desempenhem

papel muito importante na manutenção dos processos ecológicos, como a conservação de aquíferos e mananciais (Pivello & Peccinni 2002). Além da fragmentação, a floresta do PEFI, por estar inserida na malha urbana da cidade de São Paulo, tem sido afetada por poluentes atmosféricos de origem urbana (Domingos *et al.* 2002).

- Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra (ARIE MSG) (670 m de altitude; 251,7 ha): Esta ARIE está localizada em Campinas, no distrito de Barão Geraldo, distando cerca de 100 km da cidade de São Paulo (Figura 3C). A ARIE MSG é federal, sendo que 85% se constituem em Floresta Estacional Semidecídua, que também pertence ao domínio da Mata Atlântica em São Paulo, e os outros 15% em floresta higrófila ou floresta de brejo. Está inserida num contexto urbano, porém a maior parte de seu entorno imediato é constituído de áreas rurais. Adotando-se a classificação de Köppen, o clima é do tipo Cwa, caracterizado pela ocorrência de uma estação quente e chuvosa entre os meses de outubro e março, nos quais a temperatura média varia entre 22 e 24°C e o total da precipitação atinge 1.057mm; e uma estação seca, entre os meses de abril e setembro, a temperatura situa-se entre 18 e 22°C e a precipitação total soma 35 mm.

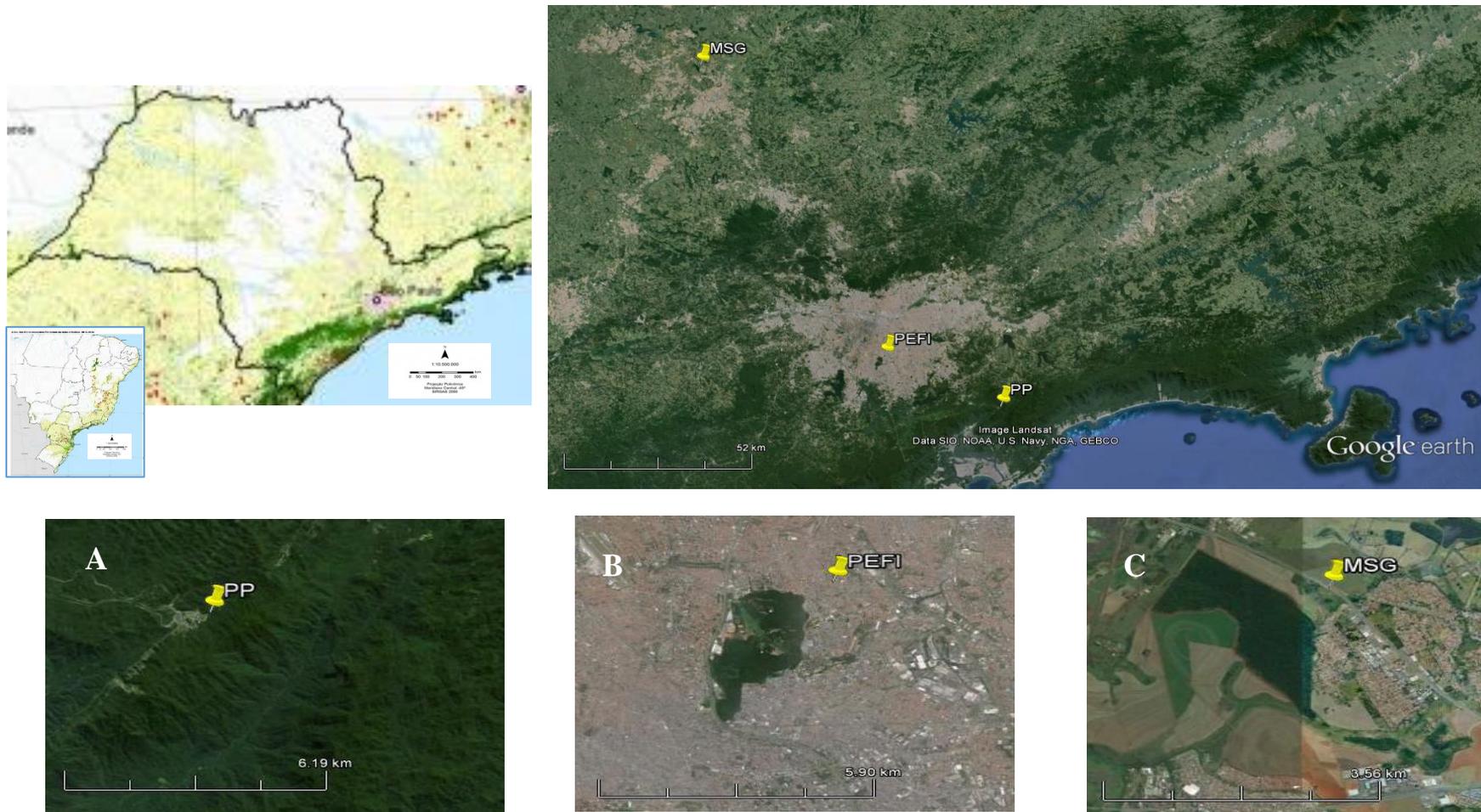


Figura 3. Locais de amostragens de folhas de espécies pioneiras e não pioneiras em São Paulo. (A) Parque Municipal Nascentes de Paranapiacaba (PP), (B) Parque Estadual das Fontes de Ipiranga (PEFI) e (C) ARIE Mata de Santa Genebra (MSG)). **Fonte:** Imagem mapa do Brasil Atlas dos Remanescentes da Mata Atlântica 2013-2014 (SOS Mata Atlântica). Imagens de satélite Google Earth.

3.2 Espécies arbóreas incluídas no estudo

Para seleção das espécies arbóreas que seriam amostradas em cada remanescente de floresta, aplicamos os preceitos da ecologia funcional, mencionados anteriormente, e do biomonitoramento com espécies nativas, relacionados por Franzle (2003). Dessa forma, procuramos escolher três espécies arbóreas consideradas como pioneiras por vários autores e três espécies consideradas não pioneiras (Tabela 1; Figuras 4 e 5). Essas espécies foram incluídas entre as mais representativas de cada unidade de conservação em levantamentos florísticos/fitossociológicos previamente realizados nos locais (MSG, Guaratini *et al.* 2008, PEFI, Tanus *et al.* 2012 e PP, Lima *et al.* 2011). Quando houve possibilidade, a escolha das espécies em cada remanescente florestal foi também baseada na similaridade taxonômica (pertencentes aos mesmos gêneros e/ou famílias). As espécies pioneiras selecionadas foram: *Alchornea sidifolia* Mull.Arg., *Alchornea triplinervea* Mull.Arg., *Croton floribundus* Spreng., *Miconia cabussu* Hoenne, *Myrsine umbellata* Mart., *Solanum granuloso-leprosum* Dunal, *Piptadenia gonoachanta* (Mart.)J.F. Macbr e *Tibouchina pulchra* Cong. (Tabela 1; Figura 4). As espécies não pioneiras foram *Amaioua intermedia* Mart., *Astronium graveolens* Jacq, *Eugenia excelsa* O.Berg., *Guarea macophylla* Vahl., *Guarea kunthiana* A.Juss., *Ocotea beulahiane* Baitello, *Ocotea paranapiacabensis* Coe.Tex, *Psychotria suterella* Mull.Arg. (Tabela 1; Figura 5). As famílias representadas nas amostragens foram: Anarcadiaceae (1 sp), Euphorbiaceae (3 spp), Fabaceae (1 sp), Lauraceae (2 spp), Melastomataceae (2 spp), Meliaceae (2 spp), Myrtaceae (2 spp), Myrcinaceae (1 sp), Rubiaceae (1 sp) e Solanaceae (1 sp).

Tabela 1. Espécies amostradas no Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI), Parque Municipal Nascentes de Paranapiacaba (PP) e Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra (ARIE MSG), P= espécies pioneiras “sensu lato” (pioneiras e secundárias iniciais); NP= não pioneiras “sensu lato” (secundárias tardias e clímax); PAP = perímetro à altura do peito (Valores médios) das árvores incluídas na amostragem.

<i>Família/Espécie</i>	<i>Categoria Sucessional</i>	<i>Local de amostragem</i>	<i>PAP (cm)</i>
<i>Anarcadiaceae</i>			
<i>Astronium graveolens</i>	NP	ARIE MSG	(38,0)
<i>Euphorbiaceae</i>			
<i>Alchornea sidifolia</i>	P	PEFI	(45,0)
<i>Alchornea triplinervea</i>	P	ARIE MSG	(32,7)
<i>Croton floribundus</i>	P	ARIE MSG	(42,5)
<i>Fabaceae</i>			
<i>Piptadenia gonoachanta</i>	P	ARIE MSG	(48,0)
<i>Lauraceae</i>			
<i>Ocotea beulahiae</i>	NP	ARIE MSG	(32,0)
<i>Ocotea paranapiacabensis</i>	NP	PP	(25,1)
<i>Melastomataceae</i>			
<i>Miconia cabussu</i>	P	PP/PEFI	(30,0)
<i>Tibouchina pulchra</i>	P	PP	(28,01)
<i>Meliaceae</i>			
<i>Guarea macophylla</i>	ST	PP /PEFI	(30,1)
<i>Guarea kunthiana</i>	ST	ARIE MSG	(34,6)
<i>Myrsinaceae</i>			
<i>Myrsine umbellate</i>	P	PP	(28,03)
<i>Myrtaceae</i>			
<i>Amaioua intermedia</i>	NP	PEFI	(30,0)
<i>Eugenia excelsa</i>	NP	PEFI	(20,0)
<i>Rubiaceae</i>			
<i>Psychotria suterella</i>	NP	PP	(25,0)
<i>Solanaceae</i>			
<i>Solanum granuloso-leprosum</i>	P	PEFI	(28,0)

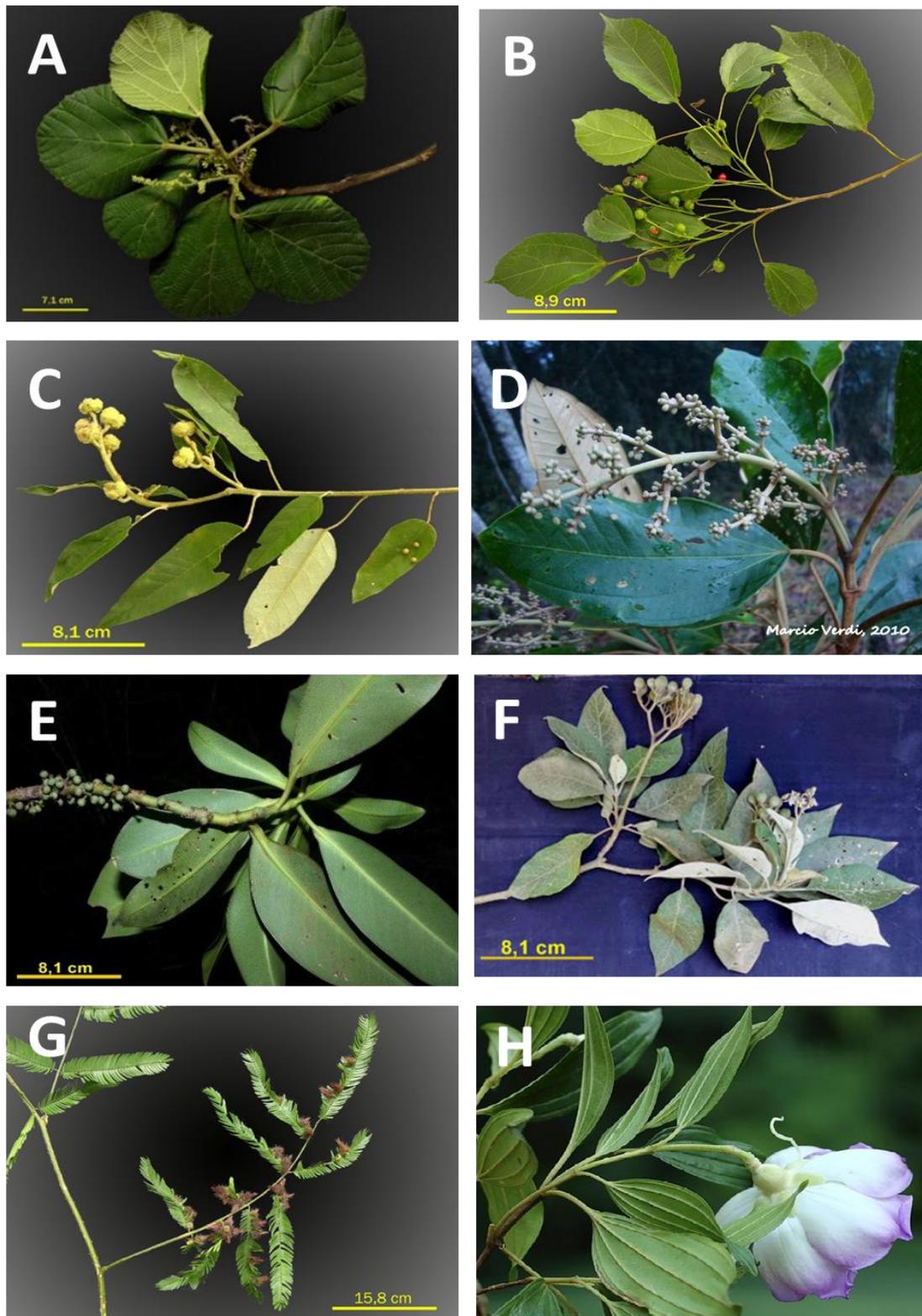


Figura 4. Fotos ilustrativas das espécies pioneiras estudadas: *Alchornea sidifolia* (A), *Alchornea triplinervea* (B), *Croton floribundus* (C), *Miconia cabussu* (D), *Myrsine umbellata* (E), *Solanum granuloso-leprosum* (F), *Piptadenia gonoachanta* (G) e *Tibouchina pulchra*. (H). Fonte: Google imagens/www.ib.usp.br.

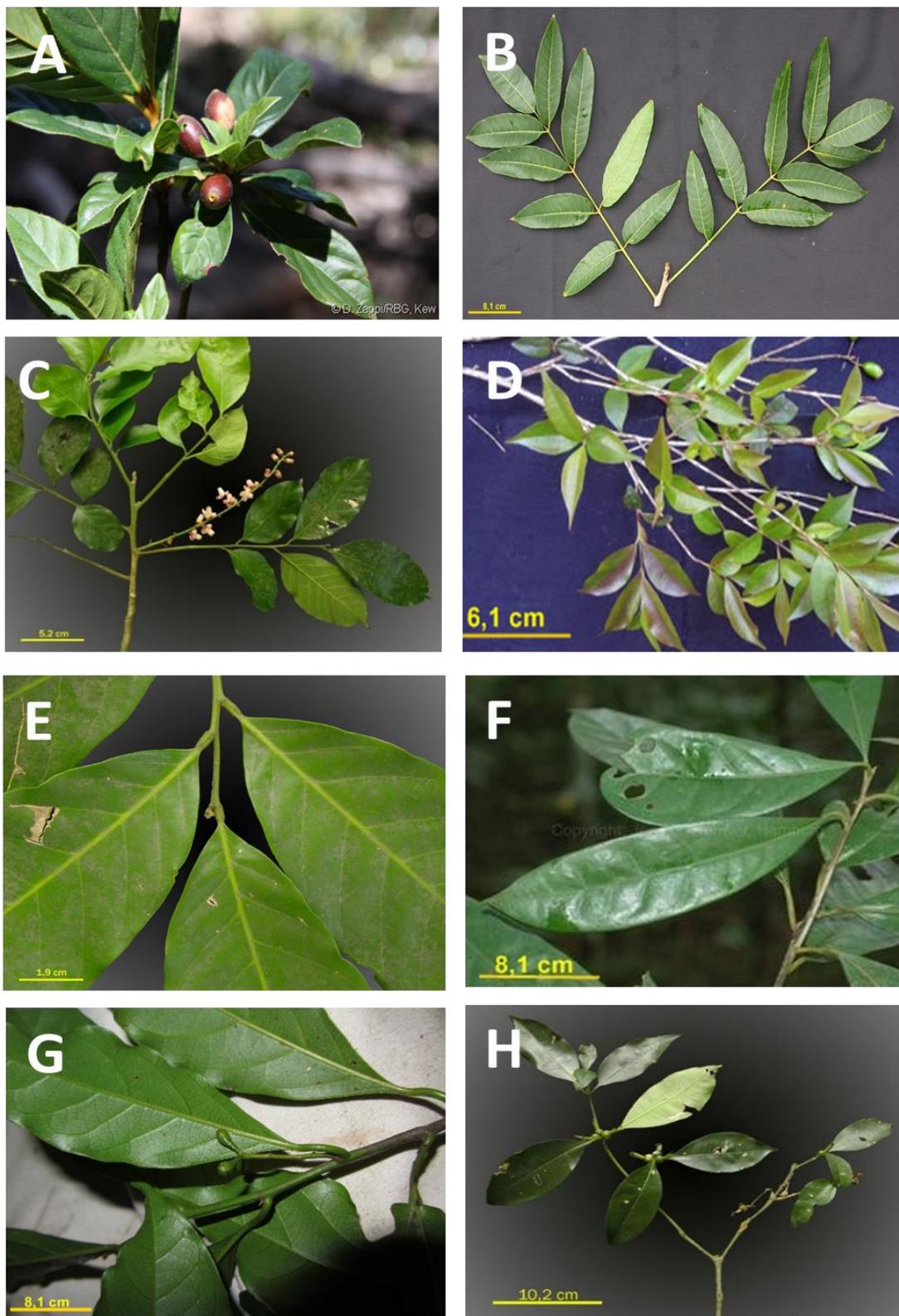


Figura 5. Fotos ilustrativas das espécies não pioneiras estudadas: *Amaioua intermedia* (A), *Astronium graveolens* (B), *Guarea macophylla* (C), *Eugenia neoglomerata* (D), *Guarea kunthiana*. (E), *Ocotea beulahiane* (F), *Ocotea paranapiacabensis* (G), *Psychotria suterella*.(H). Fonte: Google imagens/www.ib.usp.br.

3.3 Coletas de folhas das espécies arbóreas escolhidas

As coletas foram feitas nas estações úmida (janeiro de 2015) e seca (Junho de 2015), totalizando duas amostragens. Em cada período, as amostragens de folhas foram realizadas durante cinco dias consecutivos (Tabela 2). As coletas diárias foram sempre realizadas às 10h da manhã.

Em cada dia de amostragem, coletaram-se folhas totalmente expandidas, sem herbívora e não senescentes de ramos totalmente expostos ao sol, de 4 a 6 indivíduos por espécie arbórea, presentes no lado norte dos fragmentos florestais, utilizando tesoura de alta poda (podão). A escolha dos indivíduos presentes no lado norte possibilitou coletar folhas que estão mais expostas ao sol, havendo maior possibilidade de entrada dos poluentes nestes indivíduos em resposta à provável maior atividade fotossintética nessas folhas. Este procedimento de amostragem foi baseado em estudos de efeitos de poluentes atmosféricos em florestas na Europa (ICP 2005). As folhas retiradas diariamente de cada árvore foram finalmente reunidas para formar uma amostra composta por dia, obtendo-se 05 amostras compostas por espécie e por período de amostragem.

Tabela 2. Datas das coletas realizadas

Coleta	Data	Local	Estação
1 ^a	26 a 29 Janeiro 2015	PP	Chuvosa/2015
	03 a 04 Fevereiro 2015	PEFI	
	09 a 13 Fevereiro 2015	MSG	
2 ^a	03 a 07 Agosto 2015	PP	Seca/2015
	13 a 17 Julho 2015	PEFI	
	29 a 03 Julho 2015	MSG	

Após a coleta, as amostras foliares compostas foram identificadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e levadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Ecologia do Instituto de Botânica, sediado em São Paulo. No laboratório, todo o material

foi armazenado em freezer -80°C, até o momento da realização das análises bioquímicas, que incluíram defesas antioxidantes (ácido ascórbico, glutathione, superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase) e indicadores de danos oxidativos (clorofila *a*, clorofila *b* e hidroperóxido dienos conjugados). Antes do início da rotina analítica, os métodos foram testados e ajustados para as espécies estudadas, quando necessário. Cada amostra composta foi analisada em triplicata de acordo com as metodologias descritas abaixo.

3.4 Análises das defesas antioxidantes e dos indicadores de danos oxidativos

a) Defesas antioxidantes:

Ácido ascórbico: as formas reduzidas (AA), oxidada (DHA) e total (AA + DHA) de ácido ascórbico foram determinadas por meio de cromatografia líquida com detector UV, em 245 nm. A separação foi realizada em coluna C18, com uma vazão de 1,00mL/min, utilizando-se como fase móvel uma solução aquosa acidificada (pH 2,3) preparada com ácido ortofosfórico (H₃PO₄). O material vegetal foi homogeneizado com ácido metafosfórico (HPO₃) 6% contendo 0,5 mM de ácido etileno diamina tetra-acético (EDTA). Após centrifugação, os extratos foram filtrados em papel filtro. Para a determinação do AA, o extrato resultante foi diluído em água e filtrado em membrana com poro de 0,22 µm. Para análise do ácido ascórbico total, foi adicionado aos extratos uma solução preparada com dithiothreitol (DTT) 0,2% em tampão de fosfato de sódio pH 7,0 e fosfato de potássio monobásico (K₂HPO₄) 45%. A mistura foi mantida no escuro por 15 min, para que ocorresse a redução total do DHA para AA. A reação foi interrompida com a adição de 0,2M H₃PO₄. Após filtragem foi realizada a leitura. O conteúdo de DHA foi calculado pela diferença entre AA total e AA reduzido (López *et al.* 2005). Com essas concentrações, foi calculada a razão AA/AA+DHA (referida como

AA/AAtotal), seguindo proposta de Burkey *et al.* (2006), com a finalidade de avaliar a capacidade de oxi-redução do ácido ascórbico.

Glutathiona: os conteúdos de glutathiona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e total (GSH + GSSG) foram obtidos em extratos preparados a partir de 0,500g de folhas homogeneizadas em ácido sulfosalicílico 0,1%. Após centrifugação, foram realizadas duas reações e leituras em espectrofotômetro UVvis em 412nm. Para a primeira reação, para obtenção da GSH, foi adicionado ao extrato uma mistura de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,0 com 0,5mM de EDTA e ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 3mM. Após 5 minutos, foi realizada a leitura. Na segunda reação, para a obtenção de GSH total, nesta mesma mistura, foram adicionados glutathiona redutase e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) 0,4mM. Após 20 minutos foi realizada a leitura (Israr *et al.* 2006). O conteúdo de GSSG foi calculado pela diferença entre GSH total e GSH reduzida. Também foi calculada a razão GSH/GSH+GSSG (referida como GSH/Gtotal), com a finalidade de determinar a capacidade de oxi-redução da glutathiona.

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

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 ($\lambda=595$ nm).

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 (100 mM, pH 7,0), EDTA (1 mM), ácido ascórbico (5 mM) e peróxido de hidrogênio (2 mM). A reação foi iniciada com a adição de 15 μ L de extrato vegetal à mistura. A oxidação do ácido ascórbico foi medida em espectrofotômetro pela diminuição da absorvância ($\lambda=290$ nm), por 1 minuto. A atividade da APX foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de 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 (100 mM pH 7,5) contendo peróxido de hidrogênio (25%) preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 15 μ L de extrato vegetal. A atividade foi determinada seguindo-se a decomposição de H₂O₂ por 1 minuto, através das alterações na absorvância ($\lambda=240$ nm). A atividade da CAT foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Atividade da Glutathione Redutase (GR) – A atividade da GR foi determinada como descrito por Smith *et al.* (1988), com modificações. O extrato vegetal (80 μ L) foi inserido numa mistura de reação contendo tampão fosfato (100 mM pH 7,5), 5,5'' dithio-bis- (2-ácido nitrobenzoico) - DTNB (1 mM), NADPH (0,1 mM) e glutathione oxidada (1

mM), a 30°C. A atividade da enzima foi medida em espectrofotômetro a 412 nm durante 1 minuto. A atividade da GR foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) – As folhas congeladas (0,4g) foram homogeneizadas com PVPP e solução tampão fosfato (50 mM pH 7,5), contendo EDTA (1 mM), cloreto de sódio - NaCl (50 mM) e ácido ascórbico (1 mM). O extrato resultante foi centrifugado à velocidade de 10.000 rpm, sob temperatura de 2°C, durante 25 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados EDTA (0,54 mM), tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,0), metionina (0,13 mM), azul p-nitrotetrazolio -NBT (0,44 mM) e riboflavina (1 mM), os quais foram expostos a luz fluorescente (80 W) por 45 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).

b) Indicadores de Danos Oxidativos:

Teores de Pigmentos – os pigmentos clorofila *a*, *b* e carotenoides foram determinados com o método proposto por Pignata *et al.* (2002). Uma alíquota de 0,100g de amostra vegetal foi triturada com 12mL de etanol 96%. O extrato resultante foi filtrado e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro, sob $\lambda = 649 \text{ nm}$ para clorofila *a*, $\lambda = 666 \text{ nm}$ para clorofila *b* e $\lambda = 470 \text{ nm}$ para carotenoides. Os resultados foram expressos em mg.g^{-1} de massa fresca.

Hidroperóxido dieno conjugado (HPDC)- a análise de HPDC foi feita em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 234 nm, a partir dos extratos etanólicos provenientes da extração de teores de pigmentos, diluídos com água deionizada na proporção de 1:15, (Wannaz & Pignata 2006). O conteúdo de HPDC foi calculado a partir

da constante $\varepsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Levin & Pignata 1995). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de massa fresca.

3.5. Caracterização de variáveis abióticas relevantes para o estudo (clima e qualidade do ar)

Para melhor compreensão das respostas bioquímicas aos efeitos dos estresses ambientais durante as amostragens, foram tomados dados de temperatura, umidade relativa, precipitação e radiação solar global nos locais de estudo com o uso de miniestações meteorológicas foi utilizada para os dados de temperatura e radiação para os locais de PP e MSG, os dados de precipitação foram obtidos no Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (CEMADEN). Já para o PEFI, os dados meteorológicos foram provenientes de estação meteorológica instalada no Parque de Ciência e Tecnologia da Universidade de São Paulo, localizado no próprio PEFI.

Para caracterizar a qualidade do ar durante o período experimental, foram usados amostradores passivos, cujos métodos foram previamente testados.

A amostragem passiva vem sendo utilizada principalmente pela sua independência de energia elétrica, possibilitando assim a sua utilização em lugares remotos sem a disponibilidade desta, além do baixo custo e de ser de fácil manuseio, possibilitando assim o seu uso em mapeamentos e monitoramento em diversos locais de amostragens (Melchert & Cardoso 2006).

O amostrador passivo de ozônio possuía um corpo de 19 mm de diâmetro por 26 mm de comprimento. Nas bases inferior e superior do corpo, havia um rebaixamento com 15 mm de diâmetro e 7 mm de profundidade, onde foi colocado um filtro de fibra de vidro entre duas telas de aço inoxidável (38,5% de porosidade), todos possuindo 14 mm de diâmetro. Para fechar o conjunto havia uma tampa porosa. O filtro de vidro foi

impregnado com solução de nitrito de sódio. O O₃ foi amostrado por períodos de 7 dias ao longo do ano experimental e por períodos de 24 horas, durante os 05 dias de coleta de folhas, em cada estação do ano. Após o período de amostragem, foi feita a extração dos filtros através de agitação em água deionizada e o conteúdo de nitrato na amostra, formado a partir da reação do nitrito com O₃ durante o período de amostragem, foi analisado por cromatografia iônica (Ogawa 2001).

A amostragem de NO_x foi feita com um amostrador cilíndrico comercialmente disponível para coleta de partículas (Millipore[®]), com 33 mm de altura e 19 mm de raio interno. Na base inferior, foi inserido papel de filtro (Whatman[®] N° 41) impregnado com solução de trietanolamina 11%, em combinação com etilenoglicol 3,6%, acetona 25% e um conversor contendo CrO₃. Ainda, este amostrador contou com uma barreira porosa feita em Teflon[®] (Millipore[®] de raio 20 mm e porosidade 0,5 µm), colocada a 11 mm de distância do papel de filtro. O NO₂ também foi amostrado por períodos de 7 dias ao longo do ano experimental e por períodos de 24 horas, durante os 05 dias de coleta, em cada estação do ano. Após o período de amostragem, nas duas condições, os compostos foram solubilizados, fixados e determinados por espectrofotometria ($\lambda = 540$ nm), utilizando a reação de Griess-Saltzman (Machado *et al.* 2008).

Com a finalidade de validar essa técnica alternativa para caracterização da qualidade do ar nos diferentes locais de estudo, com base em poluentes gasosos oxidativos (O₃ e NO₂), expusemos também ambos os tipos de amostradores, durante diferentes períodos de 7 dias no Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas de São Paulo (IAG), da Universidade de São Paulo, onde há analisadores contínuos desses poluentes em pleno funcionamento, aqui referidos como ativos. Realizaram-se, em seguida, análises de regressão entre as concentrações dos poluentes obtidas a partir dos amostradores passivos em cada intervalo de 7 dias e as concentrações médias para o

mesmo período obtidas a partir dos analisadores ativos do IAG. Conforme mostram os gráficos de regressão incluídos na Figura 6, comprovou-se correlação linear altamente significativa entre os dados oriundos dos dois métodos, tanto para ozônio ($R^2 = 0,97$; $p < 0,001$) (Figura 6A) quanto para NO_2 ($R^2 = 0,94$; $p < 0,001$), (Figura 6B). Esses resultados validaram a aplicação do método de amostrador passivo de ambos os poluentes para a região de estudo e viabilizaram a comparação entre locais de estudo.

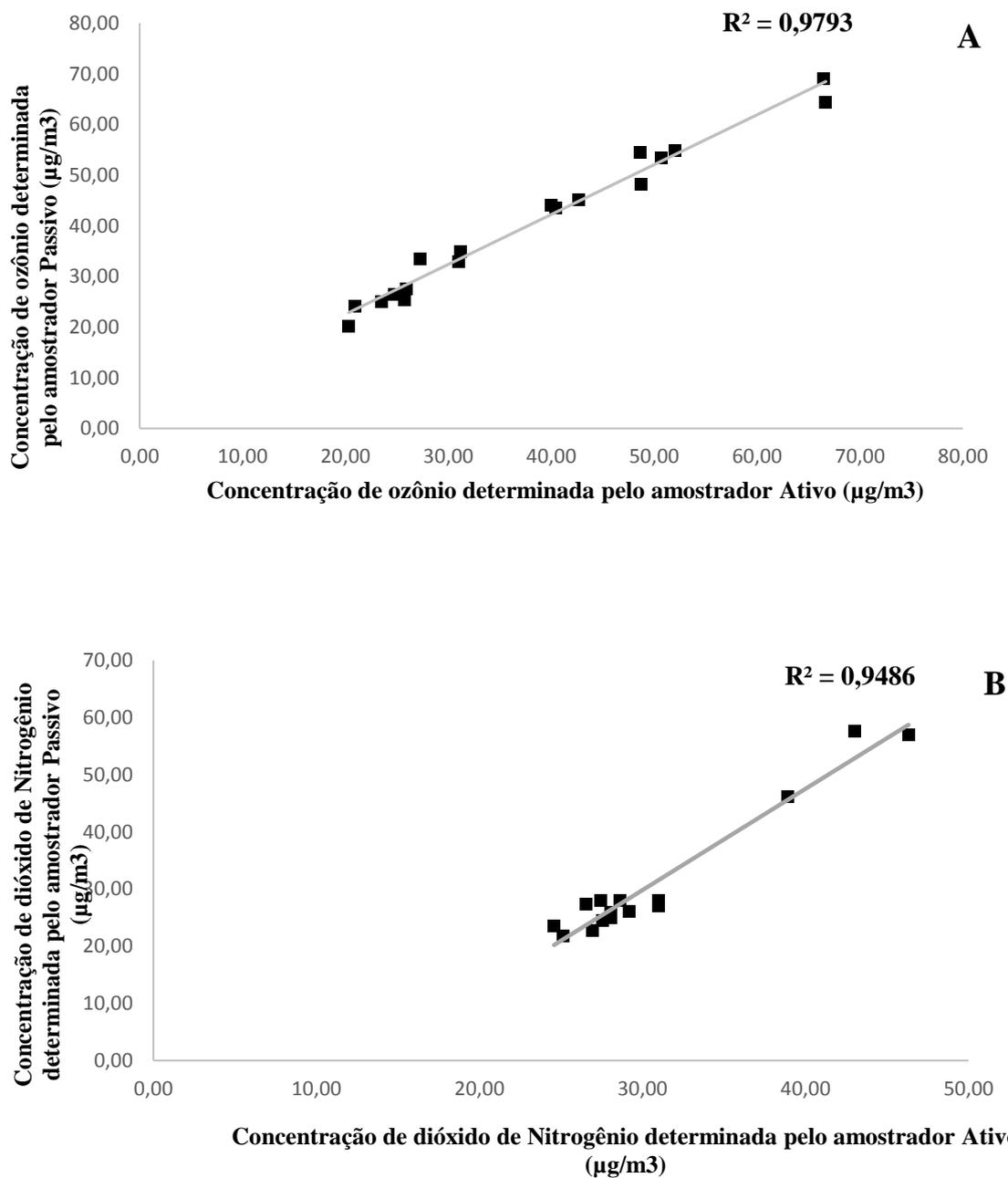


Figura 6. Análise de regressão linear entre as concentrações de ozônio (A) e dióxido de nitrogênio(B) obtidas a partir dos amostradores passivos expostos por 07 dias no IAG/USP e concentrações médias estimadas para os mesmos intervalos de tempo, a partir de dados obtidos com analisadores ativos.

3.6 Análises estatísticas

A análise de função discriminante, adotando o método *forward stepwise* (Statistic versão 7.1), foi aplicada ao conjunto de dados obtidos para espécies pioneiras e não pioneiras em todos os remanescentes de floresta em cada período amostral. Aplicamos essa técnica multivariada exploratória com o objetivo de testar a hipótese de que as características bioquímicas seriam similares dentro de cada categoria sucessional (pioneiras; não pioneiras), porém seriam distintas entre as duas categorias sucessionais. O método *forward stepwise* permitiu eleger as variáveis bioquímicas mais importantes para analisar características similares ou discrepantes entre os grupos funcionais. Os coeficientes de função de classificação foram utilizados para determinar a que grupo cada espécie pertencia sob o ponto de vista bioquímico.

A mesma análise foi utilizada para verificar se houve variação espacial (entre remanescentes florestais) nas características bioquímicas das espécies incluídas em cada categoria sucessional. Nesse caso, os resultados das análises de função discriminante aplicadas aos dados das espécies de cada categoria sucessional, coletadas em cada período, foram plotados em gráficos do tipo *scatterplot*, utilizando os coeficientes padronizados para variáveis que determinaram as duas primeiras raízes canônicas (mais explicativas), para visualizar como as funções discriminantes separam os remanescentes florestais.

Os períodos de estudo (úmido e seco) foram tratados separadamente em todos os casos, visto que foram caracterizados por condições ambientais (em termos climáticos e de contaminação do ar por poluentes oxidativos).

As tendências indicadas nas análises de função discriminante foram cheçadas, também, por meio de comparação estatística de valores médios obtidos para as variáveis

bioquímicas, dentro de cada período amostral, utilizando o programa SIGMA PLOT (versão 11.0). Utilizou-se o teste t para comparar médias entre espécies pioneiras e não pioneiras e o teste F (ANOVA One Way paramétrica), seguido de teste de comparações múltiplas (teste de Dunn), para comprovação das variações entre remanescentes florestais.

Análises de componentes principais (PCA), utilizando o PC ORD (Versão 6.0), determinaram se houve relação significativa entre variáveis bioquímicas e fatores ambientais (clima e poluição). Para isso, foram utilizados os dados climáticos e de poluentes dos dias de coletas em cada fragmento florestal. As categorias sucessionais foram tratadas separadamente em cada período de estudo. Todas as variáveis foram transformadas log₁₀ para normalizar os dados

Finalmente, foram realizadas análises de regressão multivariada com todo o conjunto de dados de cada período amostral para determinar o quanto da variação nos níveis dos antioxidantes e na capacidade de oxi-redução de ácido ascórbico e de glutatona (variáveis dependentes) poderia ser explicado por fatores abióticos (variáveis independentes) e quais destes contribuiriam significativamente para explicar, agora de forma combinada, as oscilações nas respostas antioxidativas. As análises multivariadas foram realizadas pelo método *stepwise Backward* (passo a passo). Quando necessário, os dados das variáveis dependentes foram transformados para alcançar a normalidade e igualdade de variância. Cada análise foi iniciada com todas as variáveis independentes, sendo eliminadas, passo a passo, todas aquelas que não explicaram significativamente as oscilações na resposta bioquímica em questão. Somente os modelos multilíneares com nível de explicabilidade acima de 40% ($R^2 = 0,40$) foram considerados.

Os períodos de estudo (úmido e seco) foram tratados separadamente em todos os casos, visto que foram caracterizados por condições ambientais (em termos climáticos e de contaminação do ar por poluentes oxidativos) muito distintas.

4. Resultados

O perfil meteorológico registrado durante o ano de estudo na região do Parque Municipal Nascentes de Paranapiacaba (PP), do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) da ARIE Mata de Santa Genebra (MSG) é mostrado na (Figura 7). As maiores médias mensais de temperatura tenderam a ocorrer na região da MSG (variando entre 26°C no mês de fevereiro e 24°C no mês de setembro) e as menores médias em PP (23°C no mês de janeiro e 21°C no mês de dezembro). No PEFI, as médias mensais de temperatura (24°C no mês de janeiro e 22°C no mês de novembro) tenderam a ser intermediárias em relação às outras duas regiões estudadas. As temperaturas máximas e mínimas mais baixas também ocorreram na região de PP (36°C e 5°C respectivamente), seguida pela a localidade do PEFI (39°C e 7°C) e da MSG (39°C e 7°C) (Figura 7A).

A precipitação mensal acumulada nas três localidades é apresentada na (Figura 7B). A precipitação para PP, em particular, só foi obtida para os meses de Janeiro e Agosto/2015. Nesses meses, o volume de precipitação acumulada foi mais alto em PP (929 mm e 109 mm, respectivamente) intermediário no PEFI (265mm e 39 mm) e mais baixo na MSG (168 mm e 35 mm). Além disso a precipitação acumulada em 2015 no PEFI (1,657mm) foi maior do que na região da MSG (1,294mm).

Para a umidade relativa (Figura 7C), referente ao ano de estudo, encontramos as maiores médias mensais em PP (entre 96% e 100%), seguidas das médias obtidas na localidade do PEFI (entre 83% e 84%) e em MSG (entre 87% e 78%).

A variação diária nas condições meteorológicas durante as coletas de folhas realizadas nas estações úmida e seca é apresentada na Tabela 3. Na estação úmida as temperaturas médias, máximas e mínimas mais baixas ocorreram novamente na região de PP (21°C, 22°C e 20°C respectivamente), seguida pela a localidade do PEFI (22°C, 24°C e 20°C) e as mais altas em MSG (32°C, 34°C e 30°C).

Os valores médios, máximos e mínimo de umidade relativa encontrados em PP foram os mais altos (94%, 97% e 93%), valores intermediários foram obtidos no PEFI (81%, 88% e 77%) e os menores valores em MSG (60%, 61% e 58%). A radiação foi menor em PP, o PEFI manteve valores intermediários e MSG obteve a maior máxima.

A precipitação acumulada nos dias de coleta foi maior em PP foi (82mm), no PEFI (64 mm) o menor índice de precipitação foi encontrado em MSG (10 mm).

Já na estação seca as temperaturas médias, máximas e mínimas mais baixas ocorreram na região de PP (17°C, 19°C e 16°C respectivamente), já a localidade do PEFI (20°C, 21°C e 18°C) e MSG (19°C, 21°C e 18°C), não houve tanta diferença.

Radiação Global PP novamente mostrou os menores valores e o PEFI a maior média e MSG maior máxima.

A umidade relativa mesmo sendo na estação seca os valores foram altos como médias, máximas e mínimas encontrada em PP foram as mais altas (89%, 93% e 74%), valores intermediários no PEFI (82%, 90% e 39%) e os menores valores em MSG (75%, 83% e 59%). A precipitação acumulada nos dias de coleta foi maior novamente em PP foi (10 mm), o menor índice de precipitação foi encontrado no PEFI (2,1 mm) valor intermediário em MSG (4,5mm).

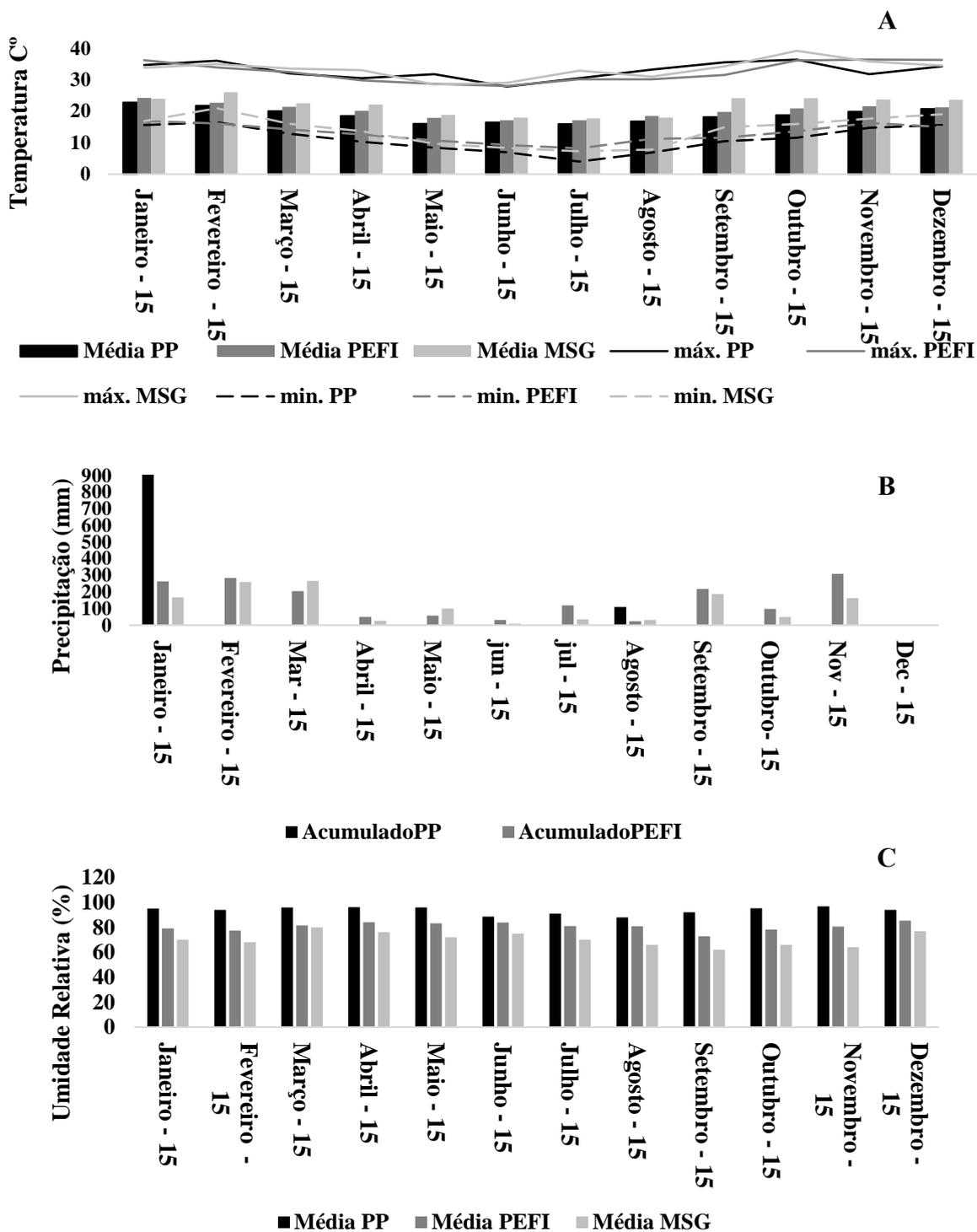


Figura 7. Média e respectivos valores máximos e mínimos de (A) temperatura (C°), (B) volume mensal acumulado de precipitação (mm) e (C) umidade relativa (%) durante o ano de 2015. Dados obtidos da estação meteorológica do CIENTEC-IAG/USP para o PEFI. Temperatura e umidade relativa para PP e MSG foram obtidos de estações meteorológicas portáteis colocadas nos locais de coleta. O volume acumulado mensal de precipitação em PP (somente para os meses de janeiro e agosto) e MSG foi obtido junto ao Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (CEMADEN).

Tabela 3. Médias e respectivos valores máximos e mínimos (entre parênteses) de temperatura (°C), radiação global (W/m²), umidade relativa (%) e volume acumulado de precipitação (mm), durante a estação chuvosa nos dias de coleta (meses de dezembro a março) e estação seca (meses de junho a setembro). Dados obtidos da estação de monitoramento do IAG para PEFI e miniestações para PP e MSG. O volume acumulado de precipitação em PP e MSG foi obtido junto ao Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (CEMADEN) .

ESTAÇÃO	PP				PEFI				MSG			
	Temp. (C°)	Rad (W/m ²)	Precip. (mm)	UR(%)	Temp. (C°)	Rad (W/m ²)	Precip (mm)	UR(%)	Temp. (C°)	Rad (W/m ²)	Precip (mm)	UR(%)
ÚMIDA	21	150		94	22	217		81	32	200		60
	(22 – 20)	(250-32)	82	(97 - 93)	(24 – 20)	(303-45)	64	(88 – 77)	(34 – 30)	(1020-59)	10	(63 – 58)
SECA	17	120		89	20	165		82	19	120		75
	(19 – 16)	(150-29)	10	(93 –74)	(21 – 18)	(198-35)	2,5	(90 – 39)	(21 – 18)	(449-43)	4,5	(83 – 59)

O perfil de concentração de ozônio (O_3) e dióxido de nitrogênio (NO_2) foi determinado semanalmente ao longo de 2015 e diariamente durante as campanhas de amostragem de folhas das espécies arbóreas, utilizando os amostradores passivos previamente validados (Figura 8; Tabela 4).

Para NO_2 (Figura 8A), as maiores médias mensais durante o ano foram encontradas no PEFI ($22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$), valores médios intermediários foram registrados em MSG ($19 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $18 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e as médias menores foram observadas em PP ($15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $13 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Para O_3 (Figura 8B), as maiores concentrações mensais foram encontradas em MSG ($35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $32 \mu\text{g}/\text{m}^3$), concentrações intermediárias em PP ($25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $23 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e as menores, na maioria das vezes, no PEFI ($20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $18 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

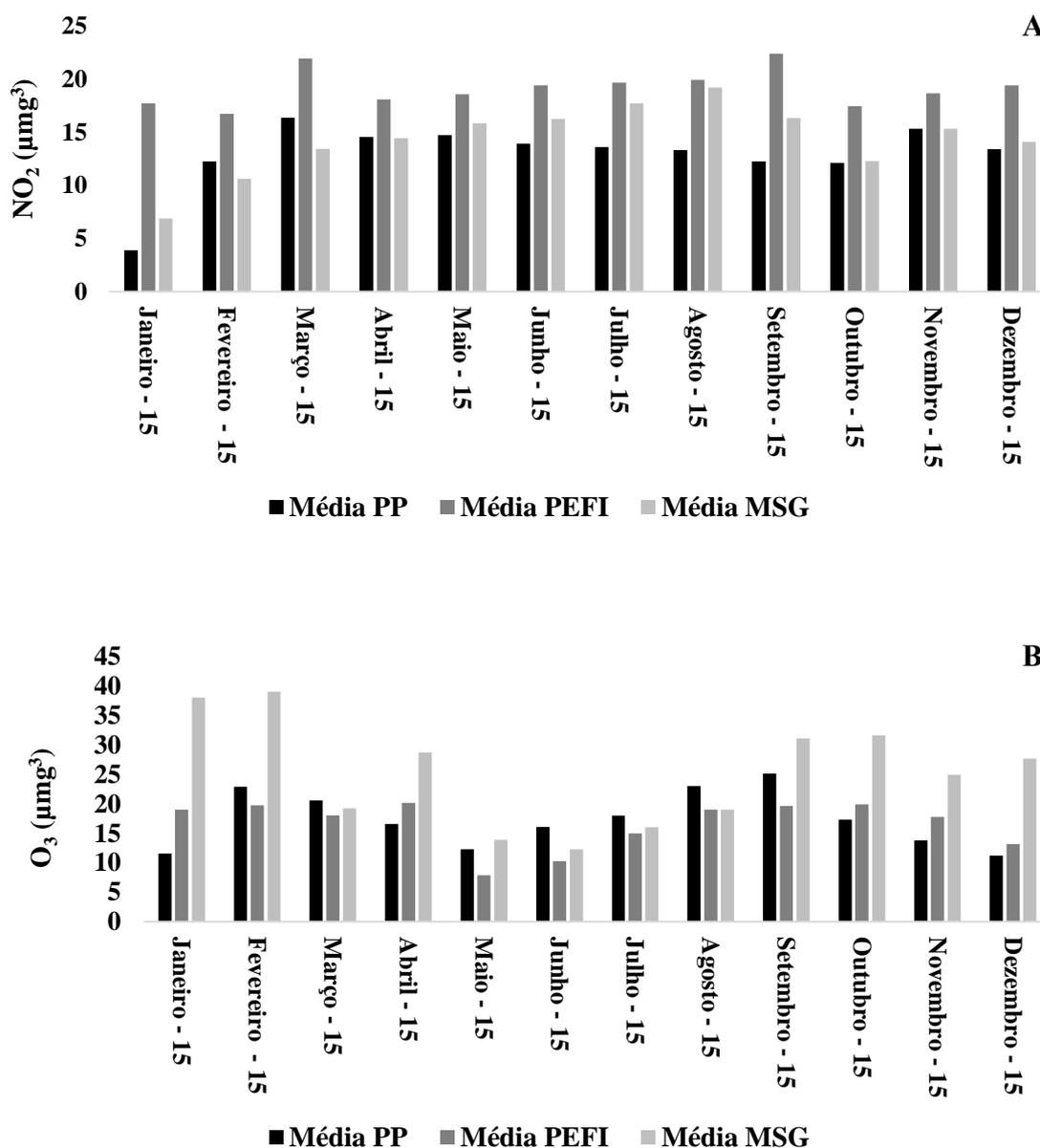


Figura 8. Concentração média mensal de (A) dióxido de nitrogênio (NO₂) e (B) ozônio (O₃) nos três locais de amostragem, durante o ano de 2015. Dados obtidos por amostragem passiva por períodos consecutivos de 7 dias.

As concentrações diárias médias de O₃ e NO₂, assim como valores máximos e mínimos, durante os cinco dias de coletas, nas estações chuvosa e seca constam da tabela 4.

As concentrações diárias de NO₂, durante os dias de amostragem na estação chuvosa, tenderam a ser maiores em MSG (concentração diária máxima de 6,4 µg/m³) e

mais baixos no PEFI (concentração diária máxima de $3,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Já O_3 , na mesma estação, tendeu a estar mais concentrado no PEFI do que no entorno dos demais fragmentos de Mata Atlântica. Nos dias de amostragem na estação seca no PEFI (concentração diária máxima de $8,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e de O_3 em PP e MSG (concentrações diárias máximas $14 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $14\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente).

Tabela 4. Concentração média e respectivos valores máximos e mínimos (entre parênteses) de dióxido de nitrogênio (NO_2) e ozônio (O_3) durante os 5 dias de amostragem nas estações chuvosa e seca. Dados obtidos por amostragem passiva por períodos consecutivos de 24 horas.

ESTAÇÃO	NO_2 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)			O_3 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		
	PP	PEFI	MSG	PP	PEFI	MSG
ÚMIDA	4,3 (5 – 4)	3,0 (4 – 2)	6,4 (7.0 – 5.5)	21 (34 – 8)	30 (44 – 14)	24 (38 – 16)
SECA	13 (19 – 6)	18 (40 – 12)	10 (14 – 8)	14 (18 – 12)	8 (11 – 6)	14 (23 – 7)

A análise de função discriminante foi utilizada inicialmente para verificar se a classificação das espécies nas duas categorias sucessionais (Pioneiras e Não Pioneiras), adotadas no início do estudo com base em características ecológicas, seria mantida em cada estação do ano, utilizando as variáveis bioquímicas incluídas no estudo, independentemente do fragmento florestal em que as amostras foram coletadas.

Essa hipótese original foi confirmada. A análise de função discriminante resumiu adequadamente a distribuição das espécies arbóreas nas duas categorias sucessionais. A separação entre espécies pioneiras e não pioneiras, com base nas variáveis bioquímicas analisadas, foi significativa em ambas as estações do ano, independentemente do local de amostragem, conforme indicaram os baixos valores de lambda de Wilk ($= 0,33$; $p < 0,0000$ e $0,39$; $p < 0,0000$) para dados provenientes das estações úmida e seca, respectivamente). O teste lambda de Wilk propicia a avaliação da existência de diferenças médias entre os grupos para cada variável, sendo que valores elevados desta análise indicam a ausência de diferenças entre os grupos.

Grande parte dos casos provenientes da amostragem realizada na estação úmida foi classificada corretamente nas duas categorias sucessionais (94% de casos das espécies pioneiras e 90% de casos das espécies não pioneiras). Somente as variáveis clorofila *b*, razão GSH/Gtotal e proteína foram excluídas do modelo discriminante resultante do conjunto de dados da estação úmida (Tabela 5). Coeficientes mais altos da função de classificação e a comparação de médias pelo teste *t* indicaram que as espécies pioneiras foram classificadas como tal pela tendência de conter menos carotenoides em suas folhas valor mais alto de razão ácido ascórbico (AA/AAtotal) e menor atividade de glutatona reductase do que as espécies não pioneiras. Estas, por sua vez, tenderam a ser assim classificadas por maior conteúdo de clorofila *a* e hidroperóxido dienos conjugados

(HPDC) e maior atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) do que as espécies pioneiras (Tabelas 5 e 7).

Na estação úmida, a comparação de médias pelo teste t (Tabela 7) ainda mostrou que a atividade de SOD e CAT foi mais baixa, o conteúdo de ácido ascórbico reduzido e total, assim como a razão GSH/Gtotal foram maiores e a concentração de glutatona oxidada foi menor nas folhas das espécies pioneiras do que nas das não pioneiras. As demais variáveis como ácido ascórbico oxidado, glutatona total, proteínas e teores dos pigmentos não variaram significativamente entre espécies pioneiras e não pioneiras amostradas no período úmido.

Tabela 5. Coeficientes de classificação provenientes da análise da função discriminante para categorias sucessionais, para as amostras coletadas durante a estação úmida. SOD: superóxido dismutase; APX: ascorbato peroxidase; HPDC: hidroperóxido dienos conjugados; GSH/Gtotal: razão glutatona; AA/AAtotal: razão ácido ascórbico; GR: glutatona redutase e CAT: catalase.

Variáveis bioquímicas	Estação Úmida	
	Pioneiras	Não Pioneiras
SOD	-0,26975	0,26975
APX	-0,30178	0,30178
CAT	0,18202	-0,18202
GR	0,24487	-0,24487
GSH/Gtotal	Não incluída no modelo	
AA/AAtotal	0,33773	-0,33773
CAROTENOIDE	1,36273	-1,36273
HPDC	-0,72528	0,72528
CLOROFILA b	Não incluída no modelo	
CLOROFILA a	-0,99132	0,99132
PROTEINAS	Não incluída no modelo	
Constante	-1,02898	-1,02898

Os coeficientes mais altos, destacados em **negrito**, apontam as variáveis biológicas mais associadas a cada categoria sucessional.

Grande parte dos casos provenientes da amostragem realizada na estação seca também foi classificada corretamente (90% de casos das espécies pioneiras e 88% de casos das espécies não pioneiras). No entanto, conforme indicação na tabela 6, mais variáveis bioquímicas foram excluídas do modelo discriminante resultante do conjunto de dados da estação seca (APX, carotenoides, clorofilas *a* e *b* e GR), em comparação ao que ocorreu na estação úmida. Os coeficientes mais altos da função de classificação e a comparação de médias pelo teste *t* indicaram que as espécies pioneiras foram classificadas como tal, no período seco, por valores mais altos de razão GSH/Gtotal e de razão AA/AAtotal, e menores atividades de SOD e CAT do que as espécies não pioneiras. Além disso, HPDC foi outra variável indicadora de danos oxidativos que tendeu a distinguir as espécies pioneiras das não pioneiras, embora as concentrações médias obtidas nas espécies de ambas as categorias sucessionais não tenham diferido significativamente. Já as espécies não pioneiras se distinguiram das pioneiras pelos maiores teores de proteínas (Tabelas 6 e 7).

Na estação seca, a comparação de médias (Tabela 7) ainda comprovou, nas espécies pioneiras, uma alta atividade das enzimas glutatona redutase, ascorbato peroxidase, assim como e altas concentrações de ácido ascórbico em suas formas reduzida, oxidada e total, de glutatona reduzida e clorofila total, em comparação com as espécies não pioneiras. Estas, por sua vez, continham mais glutatona oxidada e alto valor de razão de clorofila *a/b*.

Tabela 6. Coeficientes de classificação provenientes da análise da função discriminante para categorias sucessionais, para as amostras coletadas durante a estação seca. SOD: superóxido dismutase; APX: ascorbato peroxidase; HPDC: hidroperóxido dienos conjugados; GSH/Gtotal: razão glutatona; AA/AAtotal: razão ácido ascórbico; GR: glutatona redutase e CAT: catalase.

Variáveis bioquímicas	Estação Seca	
	Pioneiras	Não Pioneiras
SOD	0,46420	-0,72945
APX	Não incluída no modelo	
CAT	0,63814	-1,00279
GR		
GSH/Gtotal	1,15053	-1,80798
AA/AAtotal	0,68808	-1,08127
CAROTENOIDE	Não incluída no modelo	
HPDC	0,72228	Não incluída no modelo
CLOROFILA <i>b</i>	Não incluída no modelo	
CLOROFILA <i>a</i>	Não incluída no modelo	
PROTEINAS	-0,46457	0,73004
Constante	-1,02898	-1,02898

Os coeficientes mais altos, destacados em **negrito**, apontam as variáveis biológicas mais associadas a cada categoria sucessional.

Tabela 7. 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- $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$), da concentração de proteínas (mg/mL), ácido ascórbico reduzido (AA- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido ascórbico oxidado (DHA- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido ascórbico total (AAtotal- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), glutaciona reduzida (GSH- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), glutaciona oxidada (GSSG- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), glutaciona total (Gtotal- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), hidroperóxido dieno conjugado (HPDC- $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), clorofila *a* ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), clorofila *b* ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), clorofila total (CLOtotal $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), assim como razões entre clorofilas *a* e *b* ((CLO*a*/*b* $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido ascórbico reduzido e total (AA/AAtotal- ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e glutaciona reduzida e total (GSH/total- ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) em amostras foliares de espécies pioneiras e não pioneiras coletadas na estação chuvosa nos fragmentos florestais localizados em Paranapiacaba (PP), Parque das Fontes do Ipiranga (PEFI) e Santa Genebra (MSG). Letras indicam diferença estatística entre as categorias sucessionais ($p < 0,005$).

Variáveis bioquímicas	Estação úmida		Estação seca	
	Pioneiras	Não Pioneiras	Pioneiras	Não pioneiras
CAT	209 \pm 192b	262 \pm 184a	648 \pm 566a	295 \pm 255b
APX	10 \pm 6,0b	12 \pm 5,6a	24 \pm 29a	10 \pm 9,0b
GR	2,1 \pm 2,0b	2,4 \pm 1,4a	36 \pm 17a	2,2 \pm 1,7b
SOD	2,4 \pm 1,6b	6,1 \pm 5,0a	11 \pm 6,0a	6,0 \pm 4,0b
AA	1,6 \pm 1,4a	0,9 \pm 0,7b	1,5 \pm 1,0a	0,7 \pm 0,3b
DHA	2,4 \pm 1,6a	2,2 \pm 1,3a	1,7 \pm 1,0a	1,3 \pm 1,0b
AAtot	4,1 \pm 1,7a	2,9 \pm 1,4b	3,1 \pm 1,4a	2,0 \pm 1,3b
AA/AAtot	0,3 \pm 0,2a	0,3 \pm 0,2a	0,5 \pm 0,2a	0,4 \pm 0,1b
GSH	24 \pm 14a	24 \pm 16a	26 \pm 11a	20 \pm 11b
GSSG	17 \pm 10b	26 \pm 16a	18 \pm 11b	30 \pm 13a
Gtot	41 \pm 18a	50 \pm 26a	44 \pm 15a	50 \pm 20a
GSH/Gtot	0,5 \pm 0,1a	0,5 \pm 0,2b	0,6 \pm 0,2a	0,4 \pm 0,1b
PROTEINAS	0,3 \pm 0,2a	0,3 \pm 0,2a	0,2 \pm 0,1b	0,3 \pm 0,1a
CLOROFILA <i>a</i>	1,2 \pm 0,6a	1,2 \pm 0,3a	1,0 \pm 0,5a	1,0 \pm 0,4a
CLOROFILA <i>b</i>	0,4 \pm 0,2a	0,5 \pm 0,1a	0,3 \pm 0,3a	0,4 \pm 0,2a
CLO <i>a/b</i>	2,0 \pm 0,7a	1,9 \pm 0,9a	1,0 \pm 0,5b	2,3 \pm 0,6a
CLOtotal	0,9 \pm 0,5a	1,2 \pm 0,8a	2,3 \pm 0,7a	1,5 \pm 0,5b
CAROTENOIDE	0,2 \pm 0,1a	1,2 \pm 1,1a	0,2 \pm 0,1a	0,1 \pm 0,09a
HPDC	18 \pm 11b	28 \pm 15a	18 \pm 14a	18 \pm 13a

Números indicados em negrito referem-se a variáveis incluídas na função discriminante que distinguiu as categorias sucessionais nas estações úmida e seca.

As espécies não classificadas nas categorias sucessionais adotadas originalmente, de acordo com os resultados das análises de função discriminante baseada em variáveis bioquímicas, foram reclassificadas (Tabela 8). Durante a estação úmida, uma espécie pioneira amostrada em Paranapiacaba (*S. granuloso-leprosum*) apresentou características bioquímicas das espécies não pioneiras. Ainda na estação úmida, *P. suterella* (coletada

em PP) e *G. macrophylla* (coletada em PP e PEFI), classificadas originalmente como não pioneiras, mostraram características bioquímicas das pioneiras, do mesmo modo que *A. graveolens* coletada na MSG na estação seca.

Tabela 8. Reclassificação de espécies não incluídas nas categorias sucessionais originais, de acordo com os resultados das análises de função discriminante realizadas com base nas variáveis bioquímicas. P (Espécies pioneiras) e NP (Espécies não pioneiras).

Espécies	Local coleta	Estação úmida		Estação seca	
		Classif. original	Classif. bioquímica	Classif. original	Classif. bioquímica
<i>Solanum granuloso</i>	PEFI	P	NP		
<i>Psychotria suterella</i>	PP	NP	P		
<i>Guarea macrophylla</i>	PP/PEFI	NP	P		
<i>Astronium graveolens</i>	MSG			NP	P

A análise de função discriminante foi utilizada, também, para verificar se houve variação espacial nas características bioquímicas das espécies incluídas em cada categoria sucessional. Essa hipótese igualmente foi confirmada. O agrupamento de locais de amostragem com base nas variáveis bioquímicas das espécies pioneiras ou das não pioneiras foi significativa em ambas estações do ano, conforme indicaram os baixos valores de lambda de Wilk (0,042, 0,020, 0,077 e 0,044; $p < 0,0000$ em todos os casos) para dados provenientes das espécies pioneiras e não pioneiras amostradas nas estações úmida e seca, respectivamente.

As duas primeiras raízes canônicas extraídas a partir dos coeficientes padronizados de cada variável bioquímica (pelo método *stepwise forward*) foram sempre altamente significativas ($p < 0,001$), evidenciando nítida separação entre os fragmentos florestais (Figuras 9 e 10). A primeira raiz explicou 73% e 91% da variabilidade total dos dados das espécies pioneiras e não pioneiras durante a estação úmida, respectivamente

(Figura 9) e 71% e 68% da variabilidade total dos dados das espécies pioneiras e não pioneiras durante a estação seca (Figura 10).

As seguintes variáveis foram excluídas das funções discriminantes obtidas com dados da estação úmida: razão GSH/Gtotal, GR e catalase, no caso das amostras de árvores pioneiras e APX e clorofila *a*, no caso das amostras das árvores não pioneiras (Tabela 9). Na estação seca, foram excluídas da função discriminante proposta para as espécies pioneiras as variáveis GR, razão GSH/Gtotal e clorofila *a* e da proposta para as espécies não pioneiras as variáveis razão AA/AAtotal e clorofila *b* (Tabela 10).

Os coeficientes mais altos da função de classificação resultantes das análises discriminantes aplicadas aos dados obtidos na estação úmida, corroborados por comprovação de diferenças significativas entre fragmentos florestais por análise de variância seguida por teste de comparações múltiplas (Tabela 11), indicaram que:

- As espécies pioneiras amostradas em Paranapiacaba (PP) foram classificadas com base na variáveis bioquímicas: Proteína, Razão ácido ascórbico, clorofila *a* e hidroperóxido dienos conjugados e se distinguiram das espécies pioneiras dos demais fragmentos florestais pelo menor conteúdo de clorofila *a* e *b*, além dos menores valores de superóxido dismutase, ascorbato peroxidase (Tabela 9, 11).
- As árvores pioneiras coletadas no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) foram classificadas conforme as características bioquímicas como: carotenoides, SOD, APX e clorofila *b* e se distinguiram das demais por níveis intermediários de carotenoides e clorofila *b* e alta atividade de superóxido dismutase e ascorbato peroxidase, especialmente em comparação à observada nas espécies de Paranapiacaba (Tabela 9, 11).
- As árvores pioneiras da Mata de Santa Genebra (MSG) foram classificadas conforme as características bioquímicas como: carotenoides, SOD, APX e clorofila *b* e foram

caracterizadas por maiores concentrações de carotenoides e clorofilas *a* e *b* do que as amostradas nos demais fragmentos florestais e por alta atividade das enzimas, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase, assim como foi mostrado no PEFI (Tabelas 9, 11).

- A análise de variância (Tabela 11) ainda mostrou que as folhas das espécies pioneiras coletadas em Paranapiacaba continham significativamente mais ácido ascórbico e glutaciona totais e glutaciona oxidada do que as espécies localizadas nos outros dois remanescentes de Mata Atlântica. As espécies do PEFI, por sua vez, também foram caracterizadas por concentrações foliares significativamente menores de ácido ascórbico reduzido e oxidado e glutaciona reduzida do que as espécies amostradas nas outras florestas.
- As espécies não pioneiras de Paranapiacaba (PP) foram distintas das amostradas nos outros trechos de floresta por altas concentrações de clorofila *b*, alta atividade de glutaciona redutase e níveis intermediários de proteínas (Tabelas 9, 11).
- No Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), as espécies não pioneiras apresentaram níveis significativamente mais altos de hidroperóxidos conjugados e maior atividade de superóxido dismutase e catalase do que as espécies não pioneiras ocorrentes nos outros fragmentos florestais (Tabelas 9, 11).
- Na Mata de Santa Genebra (MSG), durante o período úmido, as espécies não pioneiras foram distintas das espécies coletadas nos outros fragmentos de Mata Atlântica, especialmente pela alta razão GSH/Gtotal e altos níveis de proteínas (Tabelas 9, 11).
- De acordo com os resultados das análises de variância aplicadas aos dados obtidos na estação úmida, ainda é possível destacar, ainda, que as espécies não pioneiras de Paranapiacaba mostraram a menor atividade de catalase e os níveis mais elevados de

ácido ascórbico, glutathione assim como nas espécies de MSG e níveis baixo de clorofilas totais, clorofila b e níveis mais altos de glutathione oxidada. As folhas das espécies não pioneiras do PEFI continham os menores conteúdos de glutathione reduzida e de ácido ascórbico reduzido (Tabela 11).

Tabela 9. Coeficientes de classificação da análise da função discriminante para os locais de estudo Paranapiacaba (PP), Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) e Santa Genebra (MSG), no período úmido, SOD: superóxido dismutase; APX: ascorbato peroxidase; HPDC: hidroperóxido dienos conjugados; GSH/Gtotal: razão glutatona; AA/AAtotal: razão ácido ascórbico; GR: glutatona redutase e CAT: catalase.

Estação Úmida			
Variáveis bioquímicas	Pioneiras		
	PP	PEFI	SG
CAROTENOIDE	-9,72387	2,72559	6,99828
SOD	-4,62138	4,06829	0,55309
PROTEÍNAS	1,25606	-0,82533	-0,43074
GSH/Gtotal	Não incluída no modelo		
GR	Não incluída no modelo		
APX	-1,95654	1,62004	0,33650
AA/AAtotal	2,02771	-1,08507	-0,94263
CLOROFILA a	8,36273	-6,71671	-1,64602
CAT	Não incluída no modelo		
HPDC	1,49967	-0,34920	-1,15048
CLOROFILA b	-3,05135	2,91059	0,14075
Constante	-6,95306	-3,79104	-4,53355
	Não Pioneiras		
	PP	PEFI	SG
HPDC	-7,7197	10,5960	-2,87626
GSH/Gtotal	0,3539	-2,4978	2,14387
SOD	-6,6191	7,8417	-1,22264
APX	Não incluída no modelo		
CLOROFILA b	9,5092	-8,9652	-0,54400
GR	2,2227	-2,1300	-0,09271
PROTEÍNAS	1,4625	-2,8318	1,36937
CATALASE	-3,4104	3,7498	-0,33940
CLOROFILA a	Não incluída no modelo		
CAROTENOIDES	-3,1077	2,1018	1,00593
AA/AAtotal	-1,6194	1,6509	-0,03145
Constante	-11,5417	-15,0257	-2,95390

Os coeficientes mais altos, destacados em **negrito**, apontam as variáveis biológicas mais associadas a cada fragmento florestal.

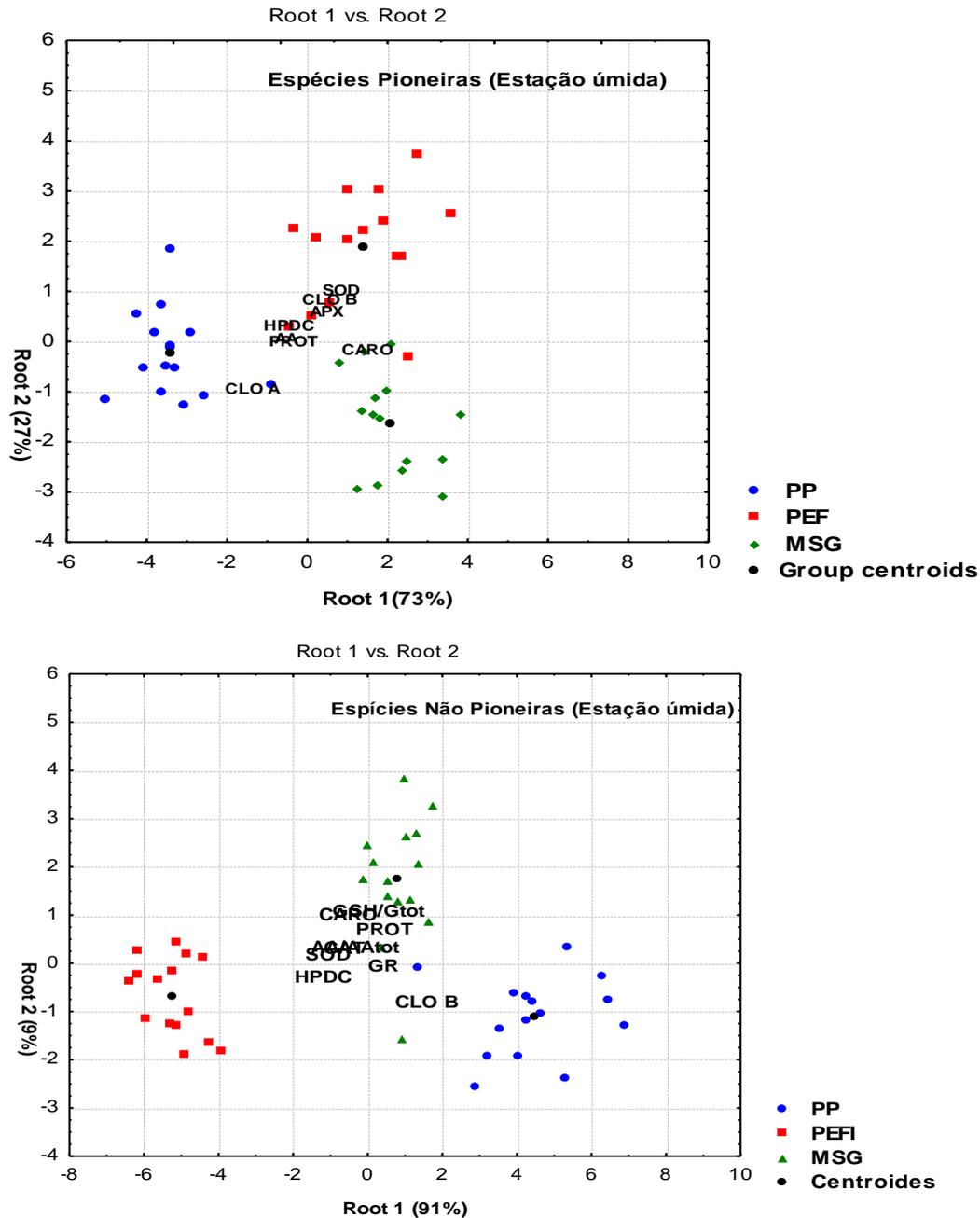


Figura 9. Representação gráfica da distribuição espacial determinada pelos coeficientes padronizados para as raízes canônicas 1 e 2 obtidas pela análise discriminante (método de *stepwise forward*) realizada com as características bioquímicas das espécies pioneiras e não pioneiras coletadas nos três remanescentes florestais (PP, PEFI e MSG) durante a estação úmida (verão). Os centroides dos grupos canônicos de cada fragmento de floresta foram representados por círculos pretos. SOD: superóxido dismutase; APX: ascorbato peroxidase; CAT: catalase; GR: glutiona redutase; GSH/Gtotal: razão glutaciona; AA/AAtotal: razão ácido ascórbico; CLO α : clorofila α ; CLO β : clorofilab; CARO: carotenoide e HPDC: hidroperóxido dienos conjugados;

Os coeficientes mais altos da função de classificação resultantes das análises discriminantes aplicadas aos dados obtidos na estação seca (Tabela 10), igualmente corroborados por comprovação de diferenças significativas entre fragmentos florestais por análise de variância seguida por teste de comparações múltiplas (Tabela 12), indicaram que:

- As espécies pioneiras de Paranapiacaba (PP) foram classificadas pelas variáveis bioquímicas: APX, HPDC, AA/AAtotal CAT e Proteínas e se distinguiram das amostradas nos outros fragmentos florestais por níveis mais altos de atividade da ascorbato peroxidase e de catalase, quando comparados ao PEFI e baixa atividade de SOD, alta concentrações de ácido ascórbico total e níveis baixos de proteínas (Tabelas 10, 12).
- As folhas das árvores pioneiras coletadas no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) foram classificadas pelas variáveis bioquímicas: Clorofila b, SOD e Proteína e apresentaram a maior atividade da SOD e o maior conteúdo de proteínas, assim como conteúdo intermediário de clorofila b e carotenoides (Tabelas 10, 12).
- Na Mata de Santa Genebra (MSG) foram classificadas pelas variáveis bioquímicas: Clorofila b, SOD e carotenoides e as espécies continham em suas folhas nível similar de clorofila b, em comparação ao obtido nas árvores do PEFI, a atividade intermediária de superóxido dismutase e os mais altos níveis de carotenoides (Tabelas 10, 12).
- De acordo com os resultados das análises de variância, ainda é possível destacar que as espécies pioneiras de Paranapiacaba mostraram os níveis mais baixos de clorofilas e da razão clorofila a/b.

- As espécies não pioneiras Paranapiacaba (PP) diferenciaram das coletadas no PEFI e MSG por atividade intermediária de glutatona redutase, baixa atividade da APX razão GSH/Gtot mais elevada e maior conteúdo de clorofila a (Tabelas 10, 12).
- No Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), as espécies não pioneiras foram caracterizadas pela maior atividade da superóxido dismutase e atividade da glutatona redutase e nível intermediário de hidroperóxido dienos conjugados (Tabelas 10, 12).
- As árvores não pioneiras da Mata de Santa Genebra (MSG) foram caracterizadas por atividade intermediária das enzimas ascorbato peroxidase e catalase e por alta concentração de hidroperóxido dienos conjugados (Tabelas 10, 12).
- De acordo com a ANOVA, as árvores não pioneiras do PP continham em suas folhas os níveis mais elevados de glutatona (reduzida, oxidada e total) e de clorofila total. No PEFI, as árvores dessa categoria sucessional apresentaram o menor conteúdo de ácido ascórbico (reduzido, oxidado) e também os maiores conteúdos de ácido ascórbico total e HPDC não diferiu nos locais (Tabela 12).

Tabela 10. Coeficientes de classificação da análise da função discriminante para os locais de estudo Paranapiacaba (PP), Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) e Santa Genebra (MSG), no período seco, SOD: superóxido dismutase; APX: ascorbato peroxidase; HPDC: hidroperóxido dienos conjugados; GSH/Gtotal: razão glutatona; AA/AAtotal: razão ácido ascórbico; GR: glutatona redutase e CAT: catalase.

<i>Estação seca</i>			
Variáveis bioquímicas	Pioneiras		
	PP	PEFI	SG
CLOROFILA <i>b</i>	-2,75805	0,47946	2,27859
GR	Não incluída no modelo		
SOD	-2,33452	1,63199	0,70253
APX	1,91986	-2,07429	0,15444
GSH/Gtotal	Não incluída no modelo		
HPDC	3,58827	-3,12256	-0,46571
AA/AAtotal	2,73730	-1,82955	-0,90775
CLOROFILA <i>a</i>	Não incluída no modelo		
CAT	2,70346	-1,39256	-1,31090
PROTEÍNAS	1,38937	0,78946	-2,17884
CAROTENOIDES	-1,16886	0,29603	0,87282
Constante	-4,52752	-3,97581	-2,60615
Não Pioneiras			
	PP	PEFI	SG
PROTEÍNA	2,14538	-5,48831	3,34293
SOD	-3,75188	3,97159	-0,21971
GR	2,77167	1,19317	-3,96484
APX	-3,62338	0,06854	3,55484
AA/AAtotal	Não incluída no modelo		
HPDC	-1,86799	0,44700	1,42099
GSH/Gtotal	1,31297	-0,28092	-1,03204
CLOROFILA <i>a</i>	1,14548	-1,23435	0,08887
CLOROFILA <i>b</i>	Não incluída no modelo		
CAT	-0,49260	-0,79976	1,29236
CAROTENOIDE	0,09463	0,88177	-0,97640
Constante	-5,14561	-5,69601	-3,45866

Os coeficientes mais altos, destacados em **negrito**, apontam as variáveis biológicas mais associadas a cada fragmento florestal

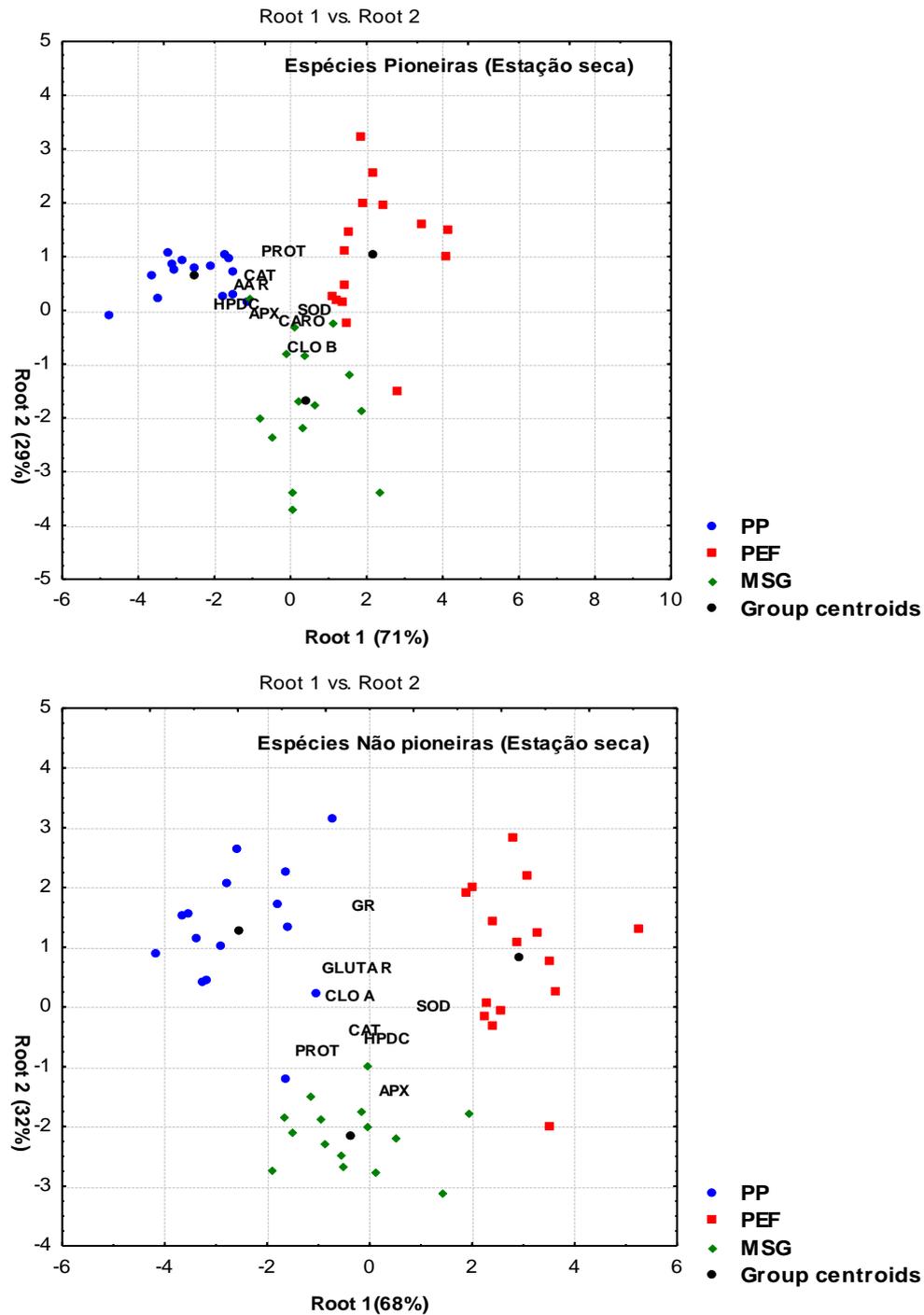


Figura 10. Representação gráfica da distribuição espacial determinada pelos coeficientes padronizados para as raízes canônicas 1 e 2 obtidas pela análise discriminante (método de *stepwise forward*) realizada com as características bioquímicas das espécies pioneiras e não pioneiras coletadas nos três remanescentes florestais (PP, PEFI e MSG). SOD: superóxido dismutase; APX: ascorbato peroxidase; HPDC: hidropéroxido dienos conjugados; GSH/Gtotal: razão glutatona; AA/AAtotal: razão ácido ascórbico; GR: glutatona redutase e CAT: catalase

Tabela 11. 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- $\text{mg}^{-1}\text{proteína}$), glutatona redutase (GR- $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$), da concentração de proteínas (mg/mL), ácido ascórbico reduzido (AA- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido ascórbico oxidado (DHA- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido ascórbico total (AAtotal- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), glutatona reduzida (GSH- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), glutatona oxidada (GSSG- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), glutatona total (Gtotal- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), hidroperóxido dieno conjugado (HPDC- $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), clorofila *a* ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), clorofila *b* ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), clorofila total ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), assim como razões entre clorofilas *a* e *b*, ácido ascórbico reduzido e total (AA/AAtotal- ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e glutatona reduzida e total (GSH/total- ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) em amostras foliares de espécies pioneiras e não pioneiras coletadas na estação chuvosa nos fragmentos florestais localizados em Paranapiacaba (PP), Parque das Fontes do Ipiranga (PEFI) e Santa Genebra (MSG). Letras indicam diferença estatística entre locais para a mesma categoria sucessional ($p < 0,005$).

VARIÁVEL	ESTAÇÃO ÚMIDA					
	Pioneiras			Não Pioneiras		
	PP	PEFI	MSG	PP	PEFI	MSG
CAT	117 \pm 79a	273 \pm 206a	191 \pm 172a	149 \pm 21c	361 \pm 176a	278 \pm 208b
APX	5,9 \pm 2,2b	13,6 \pm 6,0a	10,8 \pm 7,4a	13,1 \pm 3,2a	13,3 \pm 7,2a	10,9 \pm 6,0a
GR	1,9 \pm 2,4a	2,3 \pm 1,7a	1,9 \pm 2,1a	2,0 \pm 2,1a	1,2 \pm 0,5b	0,8 \pm 0,4c
SOD	0,9 \pm 0,7b	4,2 \pm 2,5a	2,5 \pm 0,7a	1,4 \pm 0,5c	11,7 \pm 6,5a	5,1 \pm 3,4b
AA	2,4 \pm 1,6a	0,5 \pm 0,4b	2,0 \pm 1,1a	0,7 \pm 0,5a	0,6 \pm 0,7a	0,8 \pm 0,7a
DHA	1,5 \pm 1,0c	3,3 \pm 2,1a	2,6 \pm 1,0b	2,9 \pm 1,5a	1,5 \pm 0,4b	2,0 \pm 1,3a
AATOTAL	4,0 \pm 1,4a	3,7 \pm 1,8a	4,6 \pm 1,8a	3,5 \pm 1,6a	2,1 \pm 0,6b	3,0 \pm 1,4b
AA/AATOTAL	0,5 \pm 0,2a	0,2 \pm 0,1b	0,4 \pm 0,1a	0,2 \pm 0,1a	0,2 \pm 0,24a	0,2 \pm 0,1a
GSH	34 \pm 17a	14 \pm 5,4b	24 \pm 14a	31 \pm 19a	14 \pm 0,6b	24 \pm 14a
GSSG	23 \pm 9,4a	14 \pm 8,3b	10 \pm 6,0b	43 \pm 13a	20 \pm 8,6b	18 \pm 16b
GTOTAL	58 \pm 16a	20 \pm 8,7b	34 \pm 15b	74 \pm 19a	34 \pm 13b	43 \pm 25b
GSH/GTOTAL	0,5 \pm 0,1a	0,5 \pm 0,1a	0,7 \pm 0,1a	0,4 \pm 0,1b	0,4 \pm 0,1b	0,6 \pm 0,1a
PROTEINAS	0,4 \pm 0,3a	0,3 \pm 0,1a	0,3 \pm 0,07a	0,2 \pm 0,1b	0,2 \pm 0,07b	0,4 \pm 0,2a
CLOROFILA A	0,6 \pm 0,2c	1,1 \pm 0,3a	1,0 \pm 0,5b	1,3 \pm 0,1a	1,0 \pm 0,3b	1,0 \pm 0,2b
CLOROFILA B	0,2 \pm 0,08c	0,4 \pm 0,1b	0,7 \pm 0,2a	0,5 \pm 0,07a	0,4 \pm 0,1b	0,4 \pm 0,1b
CLOROFILA A/B	2,1 \pm 0,2b	2,1 \pm 1,2b	2,7 \pm 0,2a	2,3 \pm 0,1b	2,5 \pm 0,1a	2,4 \pm 0,08a
CLOTOTAL	0,9 \pm 0,2c	1,5 \pm 0,4b	2,6 \pm 8,4a	1,8 \pm 0,2a	1,4 \pm 0,4b	1,5 \pm 3,9b
CAROTENOIDES	0,1 \pm 0,05c	0,2 \pm 0,05b	0,3 \pm 0,08a	0,2 \pm 0,04a	0,2 \pm 0,05a	0,2 \pm 0,06a
HPDC	20 \pm 8,6a	14 \pm 13a	20 \pm 11a	15 \pm 12b	46 \pm 7,0a	22 \pm 6,8b

Números indicados em **negrito** referem-se a variáveis incluídas na função discriminante que distinguiu os locais de estudo, para cada categoria sucessional

Tabela 12. 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- $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$), da concentração de proteínas (mg/mL), ácido ascórbico reduzido (AA- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido ascórbico oxidado (DHA- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), ácido ascórbico total (AAtotal- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), glutaciona reduzida (GSH- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), glutaciona oxidada (GSSG- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), glutaciona total (Gtotal- $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), hidroperóxido dieno conjugado (HPDC- $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), clorofila *a* ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), clorofila *b* ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), clorofila total ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), assim como razões entre clorofilas *a* e *b*, ácido ascórbico reduzido e total (AA/AAtotal- ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e glutaciona reduzida e total (GSH/total- ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) em amostras foliares de espécies pioneiras e não pioneiras coletadas na estação seca nos fragmentos florestais localizados em Paranapiacaba (PP), Parque das Fontes do Ipiranga (PEFI) e Santa Genebra (MSG). Letras indicam diferença estatística entre locais para a mesma categoria sucessional ($p < 0,005$).

VARIÁVEL	ESTAÇÃO SECA					
	Pioneiras			Não Pioneiras		
	PP	PEFI	MSG	PP	PEFI	MSG
CAT	944 \pm 646a	241 \pm 123b	760 \pm 540a	149 \pm 79b	405 \pm 317a	382 \pm 319b
APX	36 \pm 23a	4.2 \pm 3.2b	24 \pm 11a	4.8 \pm 3.0b	16 \pm 13a	11 \pm 6.7a
GR	38 \pm 7.3a	3.0 \pm 1.3c	10 \pm 7.0b	2.2 \pm 1.2a	3.5 \pm 2.0a	1.0 \pm 0.6b
SOD	0,3 \pm 0,2c	17 \pm 14a	0.9 \pm 0.6b	2.1 \pm 0.6b	11 \pm 8.7a	5.0 \pm 3.8b
AA	1,7 \pm 1,4b	0,8 \pm 0,1c	1,6 \pm 0,5a	0,6 \pm 0,2b	0,4 \pm 0,2c	0,9 \pm 0,4a
DHA	1,6 \pm 0,7a	1,3 \pm 0,7a	2,1 \pm 1,3a	1,5 \pm 1,2b	0,7 \pm 0,3c	2,0 \pm 0,1a
AA TOTAL	3,4 \pm 1,2a	2,2 \pm 0,6b	3,7 \pm 1,5 a	2,1 \pm 1,3a	1,0 \pm 0,4b	3,0 \pm 1,3a
AA/AA TOTAL	0,4 \pm 0,2a	0,4 \pm 0,2a	0,5 \pm 0,2a	0,4 \pm 0,1a	0,4 \pm 0,1a	0,3 \pm 0,08a
GSH	28 \pm 8,3a	30 \pm 16a	22 \pm 7,0a	31 \pm 13a	11 \pm 4,0b	18 \pm 6,0b
GSSG	21 \pm 16a	16 \pm 0,1a	17 \pm 7,0a	36 \pm 10a	25 \pm 10b	28 \pm 15b
GTOTAL	49 \pm 18a	46 \pm 17a	40 \pm 8,4a	66 \pm 18a	36 \pm 12b	46 \pm 18b
GSH/GTOTAL	0,6 \pm 0,1a	0,6 \pm 0,1a	0,6 \pm 0,1a	0,5 \pm 0,1a	0,3 \pm 0,1b	0,4 \pm 0,1b
PROTEINAS	0,2 \pm 0,1b	0,4 \pm 0,2a	0,1 \pm 0,06b	0,4 \pm 0,06a	0,1 \pm 0,09b	0,3 \pm 0,1a
CLOROFILA A	0,6 \pm 0,2b	1,0 \pm 0,4a	1,2 \pm 0,5a	1,2 \pm 0,5a	0,8 \pm 0,3b	0,9 \pm 0,3b
CLOROFILA B	0,2 \pm 0,07b	0,8 \pm 0,4a	0,5 \pm 0,2a	0,5 \pm 0,2a	0,4 \pm 0,2a	0,4 \pm 0,2a
CLOROFILA A/B	2,7 \pm 0,2a	1,6 \pm 0,8b	2,6 \pm 0,1a	2,4 \pm 0,7a	2,1 \pm 0,5a	2,2 \pm 0,5a
CLOTOTAL	0,8 \pm 0,2b	2,0 \pm 0,7a	1,7 \pm 0,7a	2,0 \pm 0,6a	1,1 \pm 0,4b	1,4 \pm 0,5b
CAROTENOIDES	0,1 \pm 0,05b	0,1 \pm 0,07b	0,2 \pm 0,1a	0,2 \pm 0,1a	0,1 \pm 0,05a	0,1 \pm 0,09a
HPDC	22 \pm 19a	14 \pm 13a	18 \pm 0,7a	11 \pm 8,6b	18 \pm 12b	23 \pm 15a

Números indicados em **negrito** referem-se a variáveis incluídas na função discriminante que distinguiu os locais de estudo, para cada categoria sucessional.

A caracterização das variações nos níveis de poluentes (NO_2 e O_3) e em variáveis climáticas (temperatura, umidade relativa e precipitação), ao longo dos dias de amostragem nos diferentes fragmentos de Mata Atlântica, em cada estação do ano, em associação às variações nas variáveis biológicas medidas nas espécies pioneiras e não pioneiras, foram sintetizadas utilizando-se a análise de componentes principais (ACP), cujos resultados foram apresentados nas Figuras 11 e 12 e tabelas 13 e 14.

A ACP para as espécies pioneiras (Figura 11 A), no período úmido, resumiu 70% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (eixo 1: 54%; eixo 2: 16%) . Todas as variáveis ambientais (em especial umidade relativa, radiação, temperatura e O_3) e a maioria das variáveis biológicas (notadamente pigmentos e SOD), com exceção de HPDC e proteínas, apresentaram alta correlação com o eixo 1. NO_2 , O_3 e HPDC foram as variáveis mais correlacionadas com o eixo 2 (Tabela 13). No lado negativo do eixo 1, foram alocadas todas as unidades amostrais que representam os locais PEFI (também posicionadas no lado positivo do eixo 2) e MSG (também posicionadas no lado negativo do eixo 2), sendo estas altamente associadas aos altos valores de Superóxido Dismutase (SOD), Temperatura (Temp.) e Ozônio (O_3), entre outras variáveis altamente correlacionadas com o eixo 1. As unidades de Paranapiacaba foram alocadas no lado positivo do eixo 1, sendo caracterizadas por altos valores da razão AA/AAtotal e de umidade relativa.

Para as espécies Não Pioneiras amostradas no período úmido (Figura 11 B), a ACP resumiu 57% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (eixo 1: 41%; eixo 2: 16%). Umidade relativa, radiação, temperatura, O_3 , CAT, SOD e HPDC apresentaram alta correlação com o eixo 1. NO_2 , glutariona redutase (GR), proteínas, clorofila b e carotenoides foram as variáveis mais correlacionadas com o eixo 2 (Tabela 13). Assim como foi observado na ACP das espécies pioneiras, as unidades

amostrais que representam o PEFI e MSG foram alocadas no lado negativo do eixo 1, em oposição às unidades amostrais de Paranapiacaba. As amostras das espécies não pioneiras provenientes do PEFI também foram posicionadas no lado positivo do eixo 2 e as de MSG no lado negativo do eixo 2. Estas foram caracterizadas por altos níveis de SOD, HPDC e CAT e baixa razão AA/AAtotal, em associação com altos valores de radiação, temperatura e O₃ e menores valores de umidade relativa. Situação inversa foi observada em relação às unidades amostrais provenientes de Paranapiacaba.

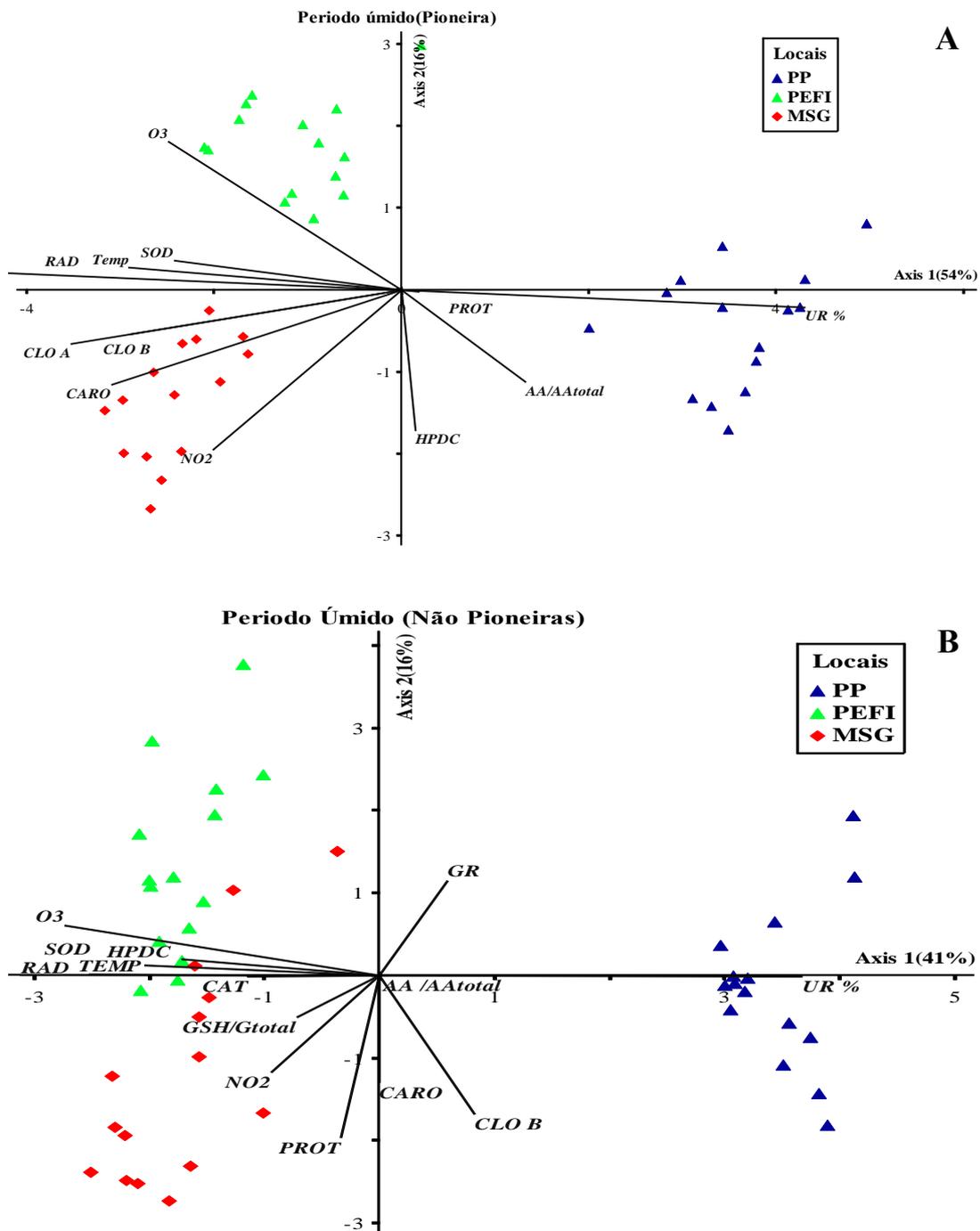


Figura 11. Representação gráfica da análise de componentes principais (ACP) incluindo poluentes gasosos oxidativos (dióxido de nitrogênio/ NO_2 ; ozônio/ O_3), variáveis climáticas (temperatura/ TEMP ; umidade relativa/ UR ; radiação solar global/ RAD) e variáveis biológicas (catalase/ CAT ; glutaciona redutase/ GR ; superóxido dismutase/ SOD ; razão ácido ascórbico reduzido e total/ $\text{AA}/\text{AAtotal}$; razão glutaciona reduzida e total/ GSH/Gtotal ; proteínas; clorofila b/ CLO B ; carotenoides/ CARO ; hidroperóxido dienos conjugados/ HPDC) medidas nas espécies pioneiras (A) e não pioneiras (B) amostradas nos diferentes fragmentos de Mata Atlântica ao longo dos dias de amostragem no período úmido.

Tabela 13. Coeficientes de correlação de cada variável incluída na ACP representada na Figura 11 com os eixos 1 e 2.

VARIÁVEIS	PIONEIRAS		NÃO PIONEIRAS	
	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2
SOD	-0,7175	0,2779	-0,8152	0,0850
CAT	Não incluída no modelo		-0,5512	-0,0820
GR	Não incluída no modelo		0,3963	0,5503
AA/AATOTA	0,5286	-0,4883	0,1063	-0,0151
GSH/GTOTAL	Não incluída no modelo		-0,4387	-0,3676
PROT	0,2015	-0,0827	-0,2999	-0,7207
CLO A	-0,8629	-0,3756	Não incluída no modelo	
CLO B	-0,7839	-0,3394	0,4673	-0,6673
CARO	-0,8084	-0,4937	0,0156	-0,5877
HPDC	0,1805	-0,6033	-0,6739	0,2300
TEMP	-0,7853	0,2440	-0,7346	0,1811
UR	0,9540	-0,2155	0,9846	-0,0691
RADIAÇÃO	-0,9540	0,2155	-0,9846	0,0691
NO2	-0,6510	-0,6421	-0,4965	-0,5556
O3	-0,7257	0,6196	-0,8502	0,4006
VARIAÇÃO EXPLICADA	54%	16%	41%	16%

No período seco, para as espécies pioneiras (Figura 12A) a ACP resumiu 67% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (eixo 1: 42%; eixo 2: 25%). Umidade relativa, radiação, temperatura, CAT, SOD, APX, proteínas e clorofila b apresentaram alta correlação com o eixo 1. NO₂, O₃, CAT, APX e carotenoides foram as variáveis mais correlacionadas com o eixo 2 (Tabela 14). Assim como já demonstrado pelos resultados da ACPs realizadas com dados do período úmido, as unidades amostrais que representam o PEFI e MSG foram alocadas no lado negativo do eixo 1, em oposição às unidades amostrais de Paranapiacaba. As amostras das espécies pioneiras provenientes do PEFI foram ainda posicionadas no lado negativo do eixo 2 e as de MSG no lado positivo eixo 2., As espécies pioneiras coletadas no PEFI estiveram associadas aos altos valores de SOD, clorofila b, proteínas e HPCD, baixas concentrações de carotenoides, baixa atividade de APX e CAT e baixo valor de AA/AAtotal e expostas

a temperaturas e concentrações de NO₂ mais altas, e menores valores de RAD, UR e O₃. As amostras das árvores coletadas em MSG diferiram das do PEFI por conterem maior conteúdo de carotenoides e por estarem expostas a níveis mais altos de O₃ e mais baixos de NO₂. As plantas de Paranapiacaba foram caracterizadas novamente por maiores valores da razão AA/AAtotal e também por maior atividade de APX e CAT e exposição a maiores radiação e umidade relativa. .

Para as espécies não pioneiras amostradas no período seco (Figura 12B), a ACP resumiu 60% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (eixo 1: 37%; eixo 2: 23%). Umidade relativa, radiação, temperatura, CAT, SOD, APX, proteínas e clorofila a apresentaram alta correlação com o eixo 1. NO₂, O₃, GR e proteínas foram as variáveis mais correlacionadas com o eixo 2 (Tabela 14). Assim como já demonstrado pelos resultados de todas as ACPs anteriormente descritas, as unidades amostrais que representam o PEFI e MSG foram alocadas no lado negativo do eixo 1, em oposição às unidades amostrais de Paranapiacaba. A separação dos fragmentos florestais em relação ao eixo 2 foi muito similar à demonstrada para as espécies pioneiras amostradas no mesmo período (as amostras provenientes do PEFI foram posicionadas no lado negativo e as de MSG no lado positivo eixo). As espécies não pioneiras coletadas no PEFI e na MSG estiveram associadas aos altos valores de APX, CAT, SOD e HPDC, baixas concentrações de pigmentos e baixo valor de GSH/Gtotal e expostas a temperaturas mais altas e menores valores de RAD. As amostras das árvores coletadas em MSG diferiram das do PEFI por apresentarem baixa atividade da GR e por estarem expostas a níveis mais altos de O₃ e mais baixos de NO₂. As plantas de Paranapiacaba foram caracterizadas por maiores valores da razão GSH/Gtotal e por maior conteúdo foliar de pigmentos e proteínas e exposição a maiores radiação e umidade relativa.

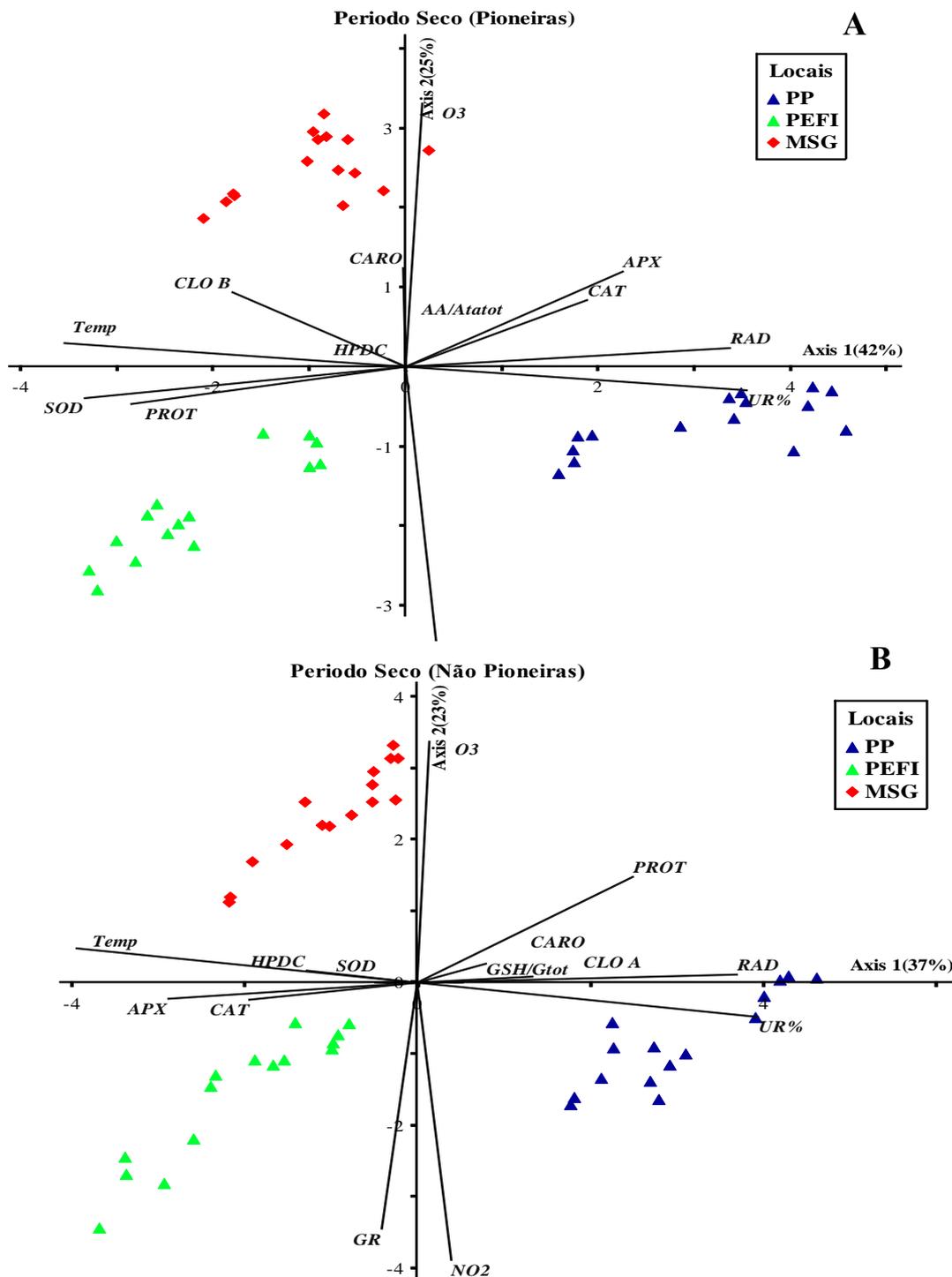


Figura 12. Representação gráfica da análise de componentes principais (ACP) incluindo poluentes gasosos oxidativos (dióxido de nitrogênio/ NO_2 ; ozônio/ O_3), variáveis climáticas (temperatura/TEMP; umidade relativa/UR; radiação solar global/RAD) e variáveis biológicas (catalase/CAT; glutatona redutase/GR; superóxido dismutase/SOD; razão ácido ascórbico reduzido e total/AA/AAtotal; razão glutatona reduzida e total/GSH/Gtotal; proteínas; clorofila b/CLO B; carotenoides/CARO; hidroperóxido dienos conjugados'HPDC) medidas nas espécies pioneiras (A) e não pioneiras (B) amostradas nos diferentes fragmentos de Mata Atlântica ao longo dos dias de amostragem no período seco.

Tabela 14. Coeficientes de correlação de cada variável incluída na ACP representada na Figura 12 com os eixos 1 e 2.

VARIÁVEIS	PIONEIRAS		NÃO PIONEIRAS	
	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2
CAT	0,6361	0,5359	-0,6542	-0,3607
APX	0,6697	0,6199	-0,7872	-0,3730
SOD	-0,8539	-0,4141	-0,1681	-0,8936
AA/AATOTAL	0,0185	0,2125	-0,2339	0,0719
GSH/GTOTAL	Não incluída no modelo		0,2810	0,0802
PROT	-0,8029	-0,4482	0,6431	0,6809
CLO A	Não incluída no modelo		0,5353	0,1422
CLO B	-0,7033	0,3925	Não incluída no modelo	
CARO	-0,1787	0,5035	0,3770	0,3086
HPDC	-0,2908	0,0826	-0,5679	0,0921
TEMP	-0,9108	0,1798	-0,9271	0,1823
UR %	0,9108	-0,1798	0,9271	-0,1823
RAD	0,8901	0,2336	0,8845	0,1552
NO2	0,4005	-0,8962	0,4659	-0,8300
O3	0,0827	0,8869	0,0085	0,8460
VARIAÇÃO EXPLICADA	42%	25%	35%	26%

Tabela 14. Coeficientes de correlação de cada variável incluída na ACP representada na Figura 12 com os eixos 1 e 2.

Nas tabelas 15 e 16, foram sintetizados os resultados das análises de regressão multilinear realizadas com o intuito de identificar quais variáveis ambientais explicariam significativamente as variações nas características bioquímicas das espécies pioneiras e não pioneiras amostradas nos três fragmentos de Mata Atlântica, nos períodos úmidos e secos, respectivamente. Foram considerados apenas os modelos multilineares significativos e com nível de explicabilidade acima de 50% ($R^2 > 0,50$).

Em geral, essas análises multivariadas indicaram que os perfis de variação nas características bioquímicas foram explicados de forma combinada por variações nas condições climáticas e/ou nos níveis de contaminação atmosférica por poluentes oxidativos. Além disso, os modelos mais explicativos, indicados por valores de R^2 mais altos, foram propostos com dados obtidos no período úmido, para ambas as categorias sucessionais (Tabela 15).

Nas espécies pioneiras amostradas no período úmido (Tabela 15), as oscilações nos compostos antioxidantes ocorreram, na maioria das vezes, em resposta ao aumento ou diminuição da umidade relativa do ar (UR) e dióxido de nitrogênio (NO₂). Os indicadores de distúrbios oxidativos (pigmentos, HPDC) as oscilações se deram devido às condições climáticas (temperatura e umidade relativa). Ozônio (O₃) raramente foi identificado como uma variável preditiva significativa do perfil bioquímico das espécies pioneiras nesse período. Nas espécies não pioneiras coletadas no período úmido, as respostas antioxidantes se deram principalmente pelo aumento ou diminuição da temperatura, umidade relativa e dióxido de nitrogênio. Já as respostas indicadoras de distúrbios oxidativos foram estimuladas pelas oscilações na temperatura e umidade do ar e pelo aumento nas concentrações do ozônio.

Tabela 15. Síntese de variáveis ambientais preditivas a variação na atividade de catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutaciona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) as concentrações de ácido ascórbico (AA), ascorbato oxidada (DHA), razão ácido ascórbico (AA/AA_{tot}), glutaciona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e razão glutaciona (GSH/G_{total}), clorofila a (Clo-*a*), clorofila b (Clo-*b*), clorofila total (Clo-total) e razão clorofila (Clo *a/b*), carotenoides (CARO) e hidroperóxido dienos conjugados (HPDC) em folhas de espécies pioneiras e não pioneiras coletadas no período úmido. As variáveis preditivas significativas foram indicadas pelo método regressão multilinear *stepwise backward* ao conjunto de dados obtidos nos três locais de amostragem. R² - coeficiente de regressão. O₃ - de ozônio; NO₂ - dióxido de nitrogênio; T- temperatura; UR - umidade relativa; (+) Indica relação significativa e positiva com a variável dependente. (-) Indica relação significativa e negativa com a variável dependente. N = 15

Espécies Pioneiras		Espécies Não Pioneiras	
Variáveis ambientais	R ²	Variáveis ambientais	R ²
preditivas	(p<0,05)	preditivas	(p<0,05)
APX = (-) UR; (-) NO ₂	0,60	CAT = (-) UR; (-) NO ₂	0,54
SOD = (-) UR; (-) NO ₂	0,80	GR = (-) T; (+) NO ₂	0,60
AA = (+) UR; (+) NO ₂	0,80	SOD = (-) UR; (-) NO ₂	0,90
AA/AA _{tot} = (-) T°; (+) UR; (-)O ₃	0,85	AA/AA _{tot} = (+) T°; (+) UR	0,70
DHA = (-) UR; (-) NO ₂	0,63	DHA = (+) T°; (+) UR	0,70
GSH = (+) UR; (+) NO ₂	0,54	GSH = (+) T°; (+) UR; (-) O ₃	0,90
G _{tot} = (+) UR; (+) NO ₂	0,70	G _{tot} = (+) T°; (+) UR; (-)O ₃ ; (+) NO ₂	0,92
GSSG = (+) UR	0,64	GSSG = (-) T; (+) NO ₂	0,83
GSH/G _{tot} = (+) NO ₂	0,51	GSH/G _{tot} = (+) T°	0,80
CLO a = (-) UR	0,90	PROT = (+) T°	0,62
CLO b = (-) UR	0,80	CLO a = (+) T°; (+) UR	0,85
CLO/total = (-) T°; (-) UR	0,90	CLO b = (+) T°; (+) UR; (+)O ₃ ; (+) NO ₂	0,91
CARO = (+) T°; (-) UR	0,95	CARO = (+) T°; (+) UR; (+)O ₃	0,53
HPDC = (+) T°; (+) UR	0,70	HPDC = (-) T°; (-) UR; (+)O ₃	0,84

Na estação seca (Tabela 16), as respostas antioxidantes e indicadoras de danos oxidativos foram estimuladas predominantemente pela oscilação na temperatura e umidade relativa do ar nas espécies de ambas as categorias sucessionais. No entanto, nas espécies pioneiras os níveis de carotenoides foram reduzidos e os de hidroperóxido dienos conjugados foram aumentados por acréscimos nos níveis de ozônio. Para as espécies não

pioneiras, neste mesmo período, apenas o teor de glutathione foi afetado pela combinação de efeitos do ozônio, temperatura e umidade relativa. O nível de carotenoides nessas espécies foi afetado apenas por ozônio.

Tabela 16 Síntese de variáveis ambientais preditivas a variação na atividade de catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) as concentrações de ácido ascórbico (AA), ascorbato oxidada (DHA), razão ácido ascórbico (AA/AA_{tot}), glutathione reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e razão glutathione (GSH/G_{total}), clorofila a (Clo-*a*), clorofila b (Clo-*b*), clorofila total (Clo-total) e razão clorofila (Clo *a/b*), carotenoides (CARO) e hidroperóxido dienos conjugados (HPDC) em folhas de espécies pioneiras e não pioneiras coletadas no período úmido. As variáveis preditivas significativas foram indicadas pelo método regressão multilinear *stepwise backward* ao conjunto de dados obtidos nos três locais de amostragem. R² - coeficiente de regressão. O₃ - de ozônio; NO₂ - dióxido de nitrogênio; T- temperatura; UR - umidade relativa; (+) Indica relação significativa e positiva com a variável dependente. (-) Indica relação significativa e negativa com a variável dependente. N = 15

Estação Seca/ Pioneiras		Estação Seca/ Não Pioneiras	
Variáveis	R ² (p<0,04)	Variáveis	R ² (p<0,04)
APX = (-) T°; (-) UR	0,61	CAT = (+) T°	0,52
CAT = (-) T°; (-) UR	0,42	SOD = (+) T°	0,50
AA = (-) T°; (-) UR	0,50	DHA = (+) T°; (+) UR	0,50
AA/AA _{tot} = (-) T°	0,60	GSH = (-) T°	0,41
GSSG = (-) T°	0,61	G _{tot} = (-) T°	0,51
PROT = (-) T°; (-) UR	0,43	GSSG = (+) T°; (+) UR; (+)O ₃	0,60
CLO a = (+) T°	0,40	GSH/G _{tot} = (+)O ₃	0,40
CLO/total = (+) T°	0,42	PROT = (-) T°; (-) UR	0,52
CLO a/b = (-) T°; (-) UR	0,51	CLO a = (-) T°	0,40
CARO = (-) UR; (-)O ₃	0,70	CARO = (+)O ₃	0,41
HPDC = (+)O ₃	0,41		

5. Discussão

As condições climáticas no ano experimental diferiram nas três regiões incluídas neste estudo, conforme esperado para o Estado de São Paulo, de acordo com Rolim *et al.* (2007) e Alvares *et al.* (2014). Esses autores comentam que a grande diversidade climática no Estado é devido ao seu relevo acidentado, posição geográfica e diferentes influências de massas de ar. Essas características condicionaram um clima mais chuvoso, úmido e fresco ao longo do ano todo na borda do planalto, onde se localiza o Parque Municipal Nascentes de Paranapiacaba e períodos úmidos e secos bem definidos, além de mais quentes, na região metropolitana de Campinas, onde se encontra a Mata de Santa Genebra. Condições intermediárias foram observadas nas proximidades do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, localizado no sul da cidade de São Paulo, definindo um gradiente climático evidente entre as três regiões,

No entanto, de acordo com a CETESB (2015) no período de maio, julho e setembro de 2015, que abrangeu a campanha de amostragem de folhas das espécies arbóreas na estação seca, houve ocorrências de chuvas superiores às médias climatológicas esperadas. Esses dados explicam o alto valor de umidade encontrada nessa estação seca. Ainda, nesse relatório a CETESB destaca que a distribuição das chuvas foi irregular nos meses do inverno (estação seca), ocorrendo também períodos sem chuva, o que pode explicar os valores médios de umidade relativa abaixo da média climatológica nos meses de junho e agosto.

Dias excessivamente secos também levam a uma condição meteorológica favorável à ocorrência de inversões térmicas, que dificultam a dispersão dos poluentes (CETESB 2015) explicando as concentrações mais altas de NO₂ nos três locais de estudo nos dias de coleta realizada no período seco. Por outro lado, os valores mais elevados de O₃, observados durante a estação úmida, podem ser explicados pelas condições

meteorológicas mais favoráveis, como dias mais longos e quentes e também pela alta incidência de radiação solar, à formação desse poluente ao longo do dia, assim como pela presença de seus precursores na atmosfera (dióxido de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis) (Boian & Andrade 2012). Conforme a intensidade da radiação solar aumenta, ocorre a fotólise do NO_2 com conseqüente aumento da concentração de O_3 na atmosfera (Tabela 3 e 4).

Vale destacar, ainda, que concentrações mais elevadas de O_3 foram observadas em vários meses do período experimental nas proximidades da Mata de Santa Genebra, em Campinas, e não na região urbana incluída no estudo (PEFI). Tal perfil já foi descrito por Boian & Andrade (2012), por meio de simulações fotoquímicas. As autoras mostraram que as concentrações mais altas de O_3 na região de Campinas, no período da simulação, foram associadas às emissões locais e ao transporte de O_3 e seus precursores da Região Metropolitana de São Paulo, demonstrando a importância das condições meteorológicas e topográficas no transporte de poluentes das fontes locais para regiões distantes. O local urbano em nosso estudo, ao contrário, foi caracterizado por concentrações mensais mais elevadas de NO_2 , que são tipicamente associadas a emissões veiculares.

As análises discriminantes mostraram que as espécies arbóreas pioneiras presentes nos remanescentes florestais do domínio Mata Atlântica apresentaram características bioquímicas similares entre si e distintas das características das espécies não pioneiras, tanto nos períodos úmidos como secos. Tais características apontaram para a existência de níveis de tolerância ao estresse oxidativo distintos em ambas as categorias sucessionais. Sendo assim, as características bioquímicas analisadas, como variações em respostas antioxidantes (Tabela 5, 6 e 7) podem ser utilizadas como ferramentas para auxiliar na classificação das categorias sucessionais, além das características ecológicas,

morfológicas e fisiológicas, como número e tamanho de sementes e tolerância e intolerância à sombra, dentre outras citadas por Swane & Whitmore (1982). Em poucos casos, a classificação a priori das espécies arbóreas nas duas categorias sucessionais, obtida nos estudos ecológicos de Guaratini *et al.* (2008), Tanus *et al.* (2012) e Lima *et al.* (2011), foi contrariada pelas características bioquímicas. Algumas espécies não pioneiras amostradas no período úmido, principalmente, foram reclassificadas como pioneiras por suas características bioquímicas. Favaretto *et al.* (2011) igualmente observaram, em algumas espécies arbóreas nativas da Floresta Semidecidual Atlântica, um desvio do padrão fisiológico indicador de tolerância à alta irradiância, esperado para a categoria sucessional a que pertenciam e concluíram que tal desvio estava associado a adaptações espécie-específicas. Em nosso estudo, porém, esse desvio do padrão esperado pareceu ser momentâneo, visto que a reclassificação dessas espécies não pioneiras não foi necessária no período seco, de acordo com a análise de funções discriminantes.

A hipótese de que as espécies pioneiras incluídas neste estudo apresentam maior potencial de tolerância ao estresse oxidativo que as espécies não pioneiras foram igualmente confirmada por análises de função discriminante, em ambos os períodos de amostragem, corroborando resultados obtidos por Favaretto *et al.* (2011). Esses autores demonstraram que as espécies arbóreas pioneiras da floresta semidecidual, na fase de plântulas, são menos sensíveis à alta intensidade de luz solar do que as não pioneiras. Além disso, as espécies pioneiras, além de apresentarem altas taxas fotossintéticas, acumulam mais biomassa e menos pigmentos do que em espécies sucessionais tardias (Nogueira *et al.* 2004).

Entre as características bioquímicas foliares que apontam para o maior potencial de tolerância ao estresse oxidativo (de acordo com vários autores, tais como Lima *et al.* 2010, Bussotti, 2008 e Favaretto, 2011) das espécies pioneiras do que do de espécies não

pioneiras incluídas neste estudo, destacam-se: maior conteúdo de ácido ascórbico reduzido e total, menor conteúdo de glutatona reduzida, maior potencial redox de ácido ascórbico e glutatona (indicado pelas razões AA/AAtotal e GSH/Gtotal respectivamente) e menor atividade das enzimas antioxidantes. Já as espécies não pioneiras se distinguiram das pioneiras pelas concentrações mais altas de hidroperóxido dienos conjugados (um indicador de peroxidação lipídica em membranas celulares).

As espécies não pioneiras, nos dois períodos de amostragem, também apresentaram baixo teor de pigmentos, característica que também indica maior sensibilidade às variações do ambiente, tanto meteorológicas como de qualidade do ar (Robinson & Sicher 2004, Favaretto *et al.* 2011).

O conjunto de resultados obtidos comprovou também que as respostas antioxidantes e indicadoras de danos oxidativos em ambos os grupos funcionais foram distintas nos períodos úmidos e secos em função das condições ambientais intrínsecas a cada período, como também demonstraram Aguiar *et al.* (2016) nas árvores nativas de fragmentos de Floresta Semidecidual Atlântica localizados na região metropolitana de Campinas. As defesas antioxidantes nessas espécies pareceram ser alteradas em resposta ao estresse fotooxidativo durante a estação úmida, estimulado por condições climáticas mais favoráveis à fotossíntese e ao crescimento das árvores. Por outro lado, as condições ambientais durante os períodos secos foram estressantes às árvores, induzindo a quebra do equilíbrio oxidante/antioxidante e aumento de danos oxidativos.

Observou-se, por exemplo, maior atividade de superóxido dismutase em espécies pioneiras no período úmido, caracterizado por altas intensidade de radiação solar, temperatura e níveis atmosférico de O₃. O aumento da atividade da SOD em espécies pioneiras sob condição de alta irradiação também foi visto por Favaretto *et al.* (2011). O aumento na atividade dessa enzima também foi observado por Bernardi *et al.* (2004) e

Esposito *et al.* (2009) em plantas sob altas concentrações de O₃. Ueda *et al.* (2013) verificaram que as isoformas de SOD reagem diferentemente de acordo com sua localização na célula, em plantas expostas a dose aguda de O₃.

Ainda no período úmido (Tabela 11), encontramos altos valores de glutatona redutase nas plantas não pioneiras. Esta enzima não age diretamente na remoção de ERO, porém é responsável pela regeneração da glutatona oxidada a sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), mantendo o ciclo metabólico da glutatona (Junior *et al.* 2001, Gill & Tuteja 2010). Contudo, a razão GSH/GSHtotal nas espécies pioneiras aumentaram no período úmido em todos os locais, devido principalmente ao aumento de GSH nesse período, indicando a maior atividade de defesa das espécies no período úmido, ao contrário das espécies não pioneiras que apresentaram baixa razão. No metabolismo antioxidante do ciclo ascorbato-glutatona, baixos valores de GSH estão associados a altos níveis de AA (Soares & Machado 2007), uma vez que a enzima responsável pela redução do DHA em AA e a mesma que reduz GSH e GSSG. Assim, a manutenção dos níveis de AA nas plantas deste estudo pode ter diminuído a produção de GSH nas espécies não pioneiras do PEFI no período úmido. O mesmo pode ser observado no período seco, para as espécies de MSG. (Tabela 12).

Os resultados das análises de função discriminante, corroborados pelos oriundos das análises de componentes principais apontaram, ainda, que as características bioquímicas das espécies de ambos os grupos funcionais variaram espacialmente em função de efeitos combinados de fatores de estresse ambiental, de origens natural e antrópica. As árvores pioneiras e não pioneiras amostradas no Parque de Paranapiacaba, conforme ilustram as Figuras 11 a 12, pareceram estar sob menor nível de estresse oxidativo do que aquelas coletadas em fragmentos de Mata Atlântica próximos a fontes antrópicas de perturbação, como a intensa urbanização na grande São Paulo.

Finalmente, os modelos de regressão, que foram altamente explicativos para muitas variáveis, indicaram que as respostas bioquímicas das árvores pertencentes a ambos os grupos funcionais seguiram gradientes lineares nas condições climáticas e de concentração de e poluentes gasosos oxidativos estabelecidos entre os locais de estudo. O efeito combinado de fontes naturais e antrópicas indutoras de estresse oxidativo às árvores pioneiras e não pioneiras foi mais evidente no período úmido, em oposição aos resultados obtidos por Aguiar *et al.* (2016), que encontraram tais relações principalmente no período seco, em árvores de três espécies da Floresta Semidecidual Atlântica, na região metropolitana de Campinas.

6. Conclusões

Os resultados, em seu conjunto, permitiram confirmar as hipóteses e cumprir os objetivos propostos para este estudo.

As espécies arbóreas pioneiras presentes nos remanescentes florestais do domínio Mata Atlântica apresentaram, em geral, características bioquímicas similares entre si e distintas das características das espécies não pioneiras, tanto nos períodos úmidos como secos. Tais características apontaram para a existência de níveis de tolerância ao estresse oxidativo distintos em ambas as categorias sucessionais.

As espécies arbóreas pioneiras mostraram um maior potencial redox (indicado pelas razões mais altas de AA/AA_{total} e GSH/G_{total} e menores danos oxidativos em nível celular), que as espécies arbóreas não pioneiras em ambas estações.

As respostas antioxidantes e indicadoras de danos oxidativos em ambos os grupos funcionais foram distintas nos períodos úmidos e secos, em função das condições ambientais intrínsecas a cada período.

As características bioquímicas das espécies de ambos os grupos funcionais variaram espacialmente em função de efeitos combinados de fatores de estresse ambiental, de origens natural e antrópica. Em Paranapiacaba, as espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras mostraram ser menos suscetíveis ao estresse oxidativo quando comparadas às espécies dos demais locais.

Finalmente, as respostas bioquímicas das árvores pertencentes a ambos os grupos funcionais seguiram gradientes lineares nas condições climáticas e de concentração de e poluentes gasosos oxidativos estabelecidos entre os locais de estudo. O efeito combinado de fontes naturais e antrópicas indutoras de estresse oxidativo às árvores pioneiras e não pioneiras foi mais evidente no período úmido.

7. Bibliografia

- Aguiar-Silva, C., Brandão, S.E., Bulbovas, P.** 2016 Antioxidant responses of Atlantic Forest native tree species as indicators of increasing tolerance to oxidative stress when they are exposed to air pollutants and seasonal tropical climate. *Ecological Indicators* 63: 154–164.
- Ahmad, P., Umar, S.** 2011. *Oxidative Stress: Role of Antioxidants in Plants*. Studium Press, New Delhi.
- 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
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G.,** 2014. Koppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* 22, 711e728.
- Apel, K., Hirt, H.,** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant. Biol.* 55, 373_399.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C.** 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82, 1227_1238.
- Asada, K.** 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* 355, 1419_1431.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ.** 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. *Physiol Plant* 104:280-92.
- Baier M, Kandlbider A, Gollack D & Josef-Dietz K.** 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signaling and response. *Plant, Cell and Environment* 28: 1012-1020.
- Bentz, B.; Allen, C.D.; Ayres, M.** 2009. *Beetle outbreaks in western North America: causes and consequences*. Salt Lake City, UT: University of Utah Press. 44 p.
- 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.
- Bhaduri AM, Fulekar MH.** (2012) Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* 11: 55–69.

- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V.,** 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91, 179_194.
- Boian, C., Andrade, M.F.,** 2012. Characterization of ozone transport among metropolitan regions. *Rev. Bras. Meteorol.* 27, 229e242.
- 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.
- 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.
- Burkey KO, Neufeld HS, Souza L, Chappelka AH & Davison AW.** 2006. Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone-sensitive wildflowers. *Environmental Pollution*, 143:427-434.
- Bussotti, F.,** 2008. Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. *Glob. Change Biol.* 14, 2727–2739.
- Calatayud V, García-Breijo FJ, Cervero J, Reig-Armiñana J, Sanz MJ.** 2011. Physiological, anatomical and biomass partitioning responses to ozone in the Mediterranean endemic plant *Lamottea diana*. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:1131–38.
- CETESB.** 2015. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2015. Operação Inverno - Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. P.23.
- Cheng FY, Burkey KO, Robinson JM, Booker, FL.** 2007. Leaf extracellular ascorbate in relation to O₃ tolerance of two soybean cultivars. *Environ Pollut* 150:355-62.
- Culotta, V.C.** 2001. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Current Topics in cellular regulation*, 36: 117- 132.
- Domingos M, Klumpp A & Klumpp G.** 2003. Disturbances to the Atlantic Rain Forest in Southeast Brazil In: *In air pollution impacts on vegetation in developing countries*. 1^a. ed. London: Imperial College Press, pp. 287-308.
- Domingos M, Bourotte C, Klumpp A, Klumpp G & Forti MC.** 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: DC Bicudo, MC Forti & CEM Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Imprensa Oficial, São Paulo, pp. 221-250.

- Domingos, M., Bulbovas, P., Camargo, C.Z.S., Aguiar-Silva, C., Brandão, S.E., Dafré-Martinelli, M., Dias, A.P.L., Engela, M.R., Gagliano, J., Moura, B.B., Alves, E.S., Rinaldi, M.C.S., Gomes, E.P., Furlan, C.M., Figueiredo, A.M.G.,** 2015. Search for native tree species and respective potential biomarkers for future assessment of pollution effects on the highly diverse Atlantic Forests in the SE-Brazil. *Environ. Pollut.* 202, 85–95.
- Domingos, M.; A. Klumpp & G. Klumpp.** 2009. Poluição atmosférica, uma ameaça à Floresta Atlântica da Reserva Biológica de Paranapiacaba, p. 165-184. In: M.I.M.S. LOPES; M. KIRIZAWA & M.M.R.F. MELO (Eds). Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. A antiga Estação Biológica do Alto da Serra. São Paulo, Instituto de Botânica, 720p.
- Emberson L, Ashmore MR, Murray F, Kuylenskierna JCI, Percy KE, Izuta T, Zheng Y, Shimizu H, Sheu BH, Liu CP, Agrawal M, Wahid A, Abdel-Latif NM, Van Tienhoven M, Bauer LI & Domingos M.** 2001. Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. *Water, Air, and Soil Pollution* 130: 107-118
- Emberson L.** 2003. Air pollution impacts on crops and forests: an introduction. In: L. Emberson, M Ashmore & F Murray (eds.). Air pollution impacts on crops and forests. A Global Assessment. *Air Pollution Reviews* v. 4. Imperial College Press, London, pp. 3-29.
- 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.
- Feng Z, Kobayashi K.** 2009. Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis *Atmos Environ* 43:1510–19.
- Fernandes AJ, Reis LAM & Carvalho A.** 2002. Caracterização do meio físico. In: DC Bicudo, MC Forti & CEM Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Imprensa Oficial, São Paulo, pp.49-62.
- Fiscus EL, Booker FL, Burkey KO.** 2005. Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant Cell Environ* 28:997–1011.
- Forzza, R C., Baumgratz, J.F.A., Bicudo, C.E.M., Canhos, D. A. L., Carvalho Jr., A. A., Coelho, M. A.N. Costa, A. F., Costa, D.P. Hopkins, M. G., Leitman, P.M,**

- Lohmann, L.G., Lughadha, E.N., Maia, L.C., Martinelli, G., Menezes, M., Morim, M.P., Peixoto, A.L., Pirani, J.R., Prado J., Queiroz L. P., Souza S., Souza V. C., Stehmann, J.R., Sylvestre, L.S., Walter, B. M.T., Zappi D. C.** 2012. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. *BioScience* 62: 39-45.
- Foyer, C.H., Noctor, G.**, 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2_18.
- Franzle O.** 2003. Bioindicators and environmental stress assessment. In: *Bioindicators and biomonitors* (B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors). Elsevier Science Ltda. pp. 41-84
- Freitas, S.R., Hawbaker, T.J., Metzger, J.P., 2010.** Effects of roads, topography, and land use on forest cover dynamics in the Brazilian Atlantic Forest. *For. Ecol. Manag.* 259, 410e417.
- Fuhrer J, Booker F. Ecological issues related to ozone: agricultural issues.** 2003. *Environ Int* 29:141-54.
- Fuhrer J.** 2009. Ozone risk for crops and pastures in present and future climates. *Naturwissenschaften* 96:173–94
- Giam, X., Bradshaw, C.J.A., Tan, H.T.W., Sodhi, N.S., 2010.** Future habitat loss and the conservation of plant biodiversity. *Biol. Conserv.* 143, 1594 e 1602.
- 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
- Grafão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA.** 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32:481–94.
- Groeneveld, J., Alves, L.F., Bernacci, L.C., Catharino, E.L.M., Knogge, C., Pütz, S., Huth, A., Metzger, J.P., 2009.** The impact of fragmentation and density regulation on forest succession in the Atlantic rain forest. *Ecol. Model* 220, 2450e2459.
- 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 MR & Tavares R.** 2009. Clima. In: *Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. A antiga Estação Biológica do Alto da Serra* (MIMS Lopes, M Kirizawa, MMF Melo eds.) 1ª Ed., São Paulo : Instituto de Botânica, pp. 39-51.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.** 2007. *Free Radicals in biology and medicine.* 4th ed. Oxford University Press. pp. 1 – 851.

- Hernández-Jiménez, M.J., Lucas, M.M., de Felipe, M.R.**, 2002. Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 645–657.
- Hicke, J.A.; Allen, C.D.; Desai, A.R.** 2012. Effects of biotic disturbances on forest carbon cycling in the United States and Canada. *Global Change Biology*. 18: 7–34.
- Horemans, N, Foyer, CH, Potters, G, Asard, H.**, 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 531_540.
- 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.
- Iriti M, Faoro F.** 2008. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollut* 187: 285–301.
- Israr M, Sahi S, Datta R & Sarkar D.** 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sebania drummondii*. *Chemosphere* 65: 591-598.
- 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.
- Karuppanapandian, T., Moon, J-C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W.,** 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *AJCS* 5, 709_725.
- Kraus TE, Evans RC, Fletcher RA, Paul SKP.** 1995. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Canadian J Bot* 73:797-806.
- 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 Ph.vsiol. Biochem.*, 36 (4). 321-329
- Lavorel, S. Garnier, E.**2002.Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits:revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* 16:545–556.
- Levin, A.G. & Pignata, M.L.** 1995. *Ramalina ecklonii* as bioindicator of atmospheric pollution in Argentina. *Canadian Journal of Botany* 73:1196–1202.

- Lira, P.K., Tambosi, L.R., Ewers, R.M., Metzger, J.P., 2012.** Land-use and land-cover change in Atlantic Forest landscapes. *For. Ecol. Manag.* 278, 80 e 89.
- 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.
- Lima, I.L., Zanon, B.R., Longui, E.L., Florsheim, S.M.B., 2010.** Variac, ão radial da densi-dade básica e dimensões celulares de *Croton floribundus*. *Floresta* 40, 663–670.
- Lima, M.E., Cordeiro, I., Moreno, P.R., 2011.** Estrutura do componente arbóreo em Floresta Ombrófila Densa Montana no Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba (PNMNP), Santo André, SP, Brasil. *Hoehnea* 38(1): 73-96.
- Lopes MIMS & Kirizawa M.** 2009. Reserva Biológica de Paranapiacaba, a antiga Estação Biológica do Alto da Serra: história e visitantes ilustres. In: *Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. A antiga Estação Biológica do Alto da Serra (MIMS Lopes, M Kirizawa, MMF Melo eds.) 1ª Ed., São Paulo : Instituto de Botânica, pp. 15-37.*
- López A, Montañó A, Garcia P, Garrido A.** 2005. Note: quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fresh olives in commercial presentations of table olives. *Food Sciencie. Tech. Int.* 11(3):199-204.
- Machado CMD, Cardoso AA, Allen AG.** 2008. Atmospheric Emission of Reactive Nitrogen during Biofuel Ethanol Production. *Environ. Sci. Technol.* 42:381–385.
- Martínez-Ramos, M., 1985,** Claros, ciclos vitales de árboles tropicales y regeneración natural de las selvas altas perennifolias, pp. 191-239. In: A. Gomez-Pompa & S. del Amo (eds.), *Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México*, Editorial Alhambra Mexicana, México
- Matyssek R, Sandermann H (2003)** Impact of ozone on trees: an ecophysiological perspective. *Prog Bot* 64:349–404
- McKenzie, D.; Gedalof, Z.; Peterson, D.L.; Mote, P. 2004.** Climatic change, wildfire, and conservation. *Conservation Biology.* 18: 890–902.
- McKee, J.K., Sciulli, P.W., Foocce, C.D., Waite, T.A., 2004.** Forecasting global biodiversity threats associated with human population growth. *Biol. Conserv.* 115, 161e164.
- Melchert, Wanessa R.; CARDOSO, Arnaldo A.** 2006. Construção de Amostrador Passivo de Baixo Custo para Determinação de Dióxido de Nitrogênio. *Revista Quim. Nova, Vol. 29, No. 2, 365-367.*

- Mello Filho LE.** 1991/1992. A Floresta Atlântica. In: Floresta Atlântica/textos científicos. (Coord. By S Monteiro and L Kaz), 84o. 17-21. Edições Alumbamento, Rio de Janeiro.
- Miller PR, McBride JM.** 1999. Oxidant air pollution impacts in the montane forest of southern California. *Ecological Studies* 134, Springer, pp. 317-336
- Mittler, R.,** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405_410.
- Moller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., 2007.** Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 459_481.
- Morgan PB, Mies TA, Bollero GA, Nelson RL, Long SP.** 2006. Season-long elevation of ozone concentration to projected 2050 levels under fully open-air conditions substantially decreases the growth and production of soybean. *New Phytol* 170:333–43.
- Nali C, Pucciariello C, Mills G, Lorenzini G.** 2005. On the different sensitivity of white clover clones to ozone: physiological and biochemical parameters in a multivariate approach. *Water Air Soil Pollut* 164:137–53
- Nakano Y, Asada A** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-888
- Noctor, G., Foyer, C.H.,** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249_279.
- Foyer, C.H., Noctor, G.,** 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2_18.
- 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.
- Ogawa.** 2001. Protocol for ozone measurement using the ozone passive sampler badge. <http://www.ogawausa.com/pdfs/proozone.pdf>.
- Oksanen E, Pandey V, Pandey AK, Keski-Saari S, Kontunen-Soppela S, Sharma C.** 2013. Impacts of increasing ozone on Indian plants *Environ Pollut* 177:189-200
- 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.
- Oswald WF, Kraus R, Hipelli S, Benz B, Volpert R, Elstner EF.** 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 Physiol* 139:742-748.

- 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.
- Pérez-Vega, A., Mas, G.F., Ligmann-Zielinska, A.,** 2012. Comparing two approaches to land use/cover change modeling and their implications for the assessment of biodiversity loss in a deciduous tropical forest. *Environ. Modell. Softw.* 29,11e23.
- Pignata ML, Gudiño GL, Wannaz ED, Pla RR, González CM, Carreras HA & Orellana L.** 2002. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. *Environ. Pollut.* 120:59-68.
- Pivello VR & Peccinni AA.** 2002. A vegetação do PEFI In: DC Bicudo, MC Forti & CEM Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Imprensa Oficial, São Paulo, p.75-92.
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J., Hirota, M.M.,** 2009. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed Implications for conservation. *Biol. Conserv.* 142, 1141e1153.
- 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.
- Rocha YT.** 2008. Brasil, europeus e pau-brasil. In: RCL Figueiredo-Ribeiro, CJ Barbedo, ES Alves, M Domingos, MR Braga (eds.) Pau-brasil, da Semente à Madeira: Conhecer para Conservar. São Paulo: IMESP, pp. 9-32.
- Rolim GS, Camargo MBP, Lania DG, Moraes JFL** (2007). Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas climáticas para o estado de São Paulo. *Bragantia* 66: 711-720.
- Rossi M, Pfeifer RM & Mattos IFA.** 2009. O recurso do solo da Reserva Biológica de Paranapiacaba. In: Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. A antiga Estação Biológica do Alto da Serra (MIMS Lopes, M Kirizawa, MMF Melo eds.) 1ª Ed., São Paulo : Instituto de Botânica, pp. 15-37.
- Sander mann H, Matyssek R.** 2004. Scaling up from molecular to ecological processes. In: H Sander mann (ed.) *Molecular Ecotoxicology of Plants*. Ecological Studies 170, Springer Verlag, pp. 207-226.

- Santos PM & Funari FL.** 2002. A vegetação do PEFI In: DC Bicudo, MC Forti & CEM Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. Imprensa Oficial, São Paulo, pp.29-48.
- Schupp, E. W.; Howe, H. F.; Augspurger, C .K.; Levey, D. J.**1989. Arrival and survival in tropical treefall gaps. *Ecology*, Washington, DC, v. 70 , n. 3, p. 562-564, 1989.
- Smirnoff, N.,** 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 229_235.
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA.** 1998. Assay of glutathione reductase induced tissue-homogenates, using 5.5' DITHIOBIS (2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 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.
- Sugiyama M, Rebelo CF, Catharino ELM & De Vuono YS.** 2009. Aspectos da estrutura e diversidade da floresta. A antiga Estação Biológica do Alto da Serra (MIMS Lopes, M Kirizawa, MMF Melo eds.) 1ª Ed., São Paulo : Instituto de Botânica, pp. 15-37.
- Swaine MD & Whitmore TC** (1988) On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. *Vegetatio* 75: 81–86.
- Tausz M, Bytnerowicz A, Arbaugh ML, 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 MS, 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 MS.** 2003. Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *Journal of Experimental Botany*, 387 (4): 1505-510.
- Turetsky, M.R.; Kane, E.S.; Harden, J.W.** 2010. Recent acceleration of biomass burning and carbon losses in Alaskan forests and peatlands. *Nature Geoscience.* 4: 27–31

- Tanus, M.R.; Pastore, M.; Bianchini, R.S.; Gomes, E.P.C. 2012.** Florística e estrutura da comunidade arbóreo-arbustiva e o efeito de borda em trecho de mata atlântica no parque estadual das fontes do Ipiranga, São Paulo, sp. *Hoenna* 39(1): 157-168.
- 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 Physiol Biochem* doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.009.
- Wannaz, E.D. & Pignata, M.L. 2006.** Calibration of four species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry* 53: 185-209.
- Whitmore, T.C. 1989.** Canopy gaps and the two major groups of forest trees. *Ecology* 70:536-538.
- Willekens, H., Inze, D., Van Montagu, M., Van Camp, W., 1995.** Catalases in plants. *Mol. Breeding* 1, 207_228.