

MARCELA REGINA GONÇALVES DA SILVA ENGELA

**Variações no conteúdo e na composição de
carboidratos solúveis e de compostos fenólicos em
espécies arbóreas de Floresta Estacional
Semidecidual em resposta a poluentes aéreos**

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

MARCELA REGINA GONÇALVES DA SILVA ENGELA

**Variações no conteúdo e na composição de
carboidratos solúveis e de compostos fenólicos em
espécies arbóreas de Floresta Estacional
Semidecidual em resposta a poluentes aéreos**

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

MARCELA REGINA GONÇALVES DA SILVA ENGELA

**Variações no conteúdo e na composição de
carboidratos solúveis e de compostos fenólicos em
espécies arbóreas de Floresta Estacional
Semidecidual em resposta a poluentes aéreos**

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

Engela, Marcela Regina Gonçalves da Silva

E57v Variações no conteúdo e na composição de carboidratos solúveis e de compostos fenólicos em espécies arbóreas de Floresta Estacional Semidecidual em reposta a poluentes aéreos / Marcela Regina Gonçalves da Silva Engela -- São Paulo, 2016.
63p. il

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

Bibliografia.

1. Poluição atmosférica. 2. Floresta. 3. Carboidratos.

I. Título

*A minha família, aos meus pais Celina
e Waldemir, pelo amor, carinho,
ensinamentos e por sempre acreditarem
em mim, mesmo quando eu deixei de
acreditar...*

Dedico...

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida
dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.

Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para você, se pudesse, o respeito, aquilo que é indispensável:
além do pão, o trabalho e a ação.

E, quando tudo mais faltasse, para você eu deixaria se pudesse um segredo: o de buscar no
interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída. ”

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente por conceder e manter o curso.

Ao Instituto de Botânica (IBT), ao Núcleo de Pesquisa em Ecologia e o Núcleo de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela infraestrutura fornecida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado concedida (Processo: 2014/03098-4).

Ao CNPq no âmbito do Edital SISBIOTA/CNPq pelo auxílio ao projeto e a FAPESP pelo apoio financeiro (processo 2010/52319-2).

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – Departamento de Botânica, por permitir o uso do laboratório de Fitoquímica para a realização de uma parte experimental deste estudo.

À Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) pelo monitoramento e concessão dos dados de qualidade do ar.

À pesquisadora e Dra. Marisa Domingos, minha orientadora, por ter me dado a oportunidade de realizar esse projeto, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e ótima disposição para tirar as dúvidas que me perturbavam, por sempre me mostrar o caminho da estatística, da interpretação dos dados e por me ensinar a distribuição multidimensional do “Panetone” e pelo ótimo convívio, pela amizade e compreensão em todos os momentos difíceis. Por sempre ter uma palavra de carinho e incentivo. Sempre serei grata por tudo! Obrigada!

À pesquisadora e Dra. Carla Zuliani Sandrin Camargo, corientadora desse projeto, que me aceitou como sua aluna de iniciação científica há 6 anos atrás, agradeço imensamente pelos ensinamentos, por estar lado a lado em cada passo que dei para chegar até a pós-graduação, obrigada pela dedicação, amizade, confiança e paciência em todos os momentos, por

sempre me estimular ao melhor, por estar sempre proporcionando o meu crescimento profissional. Obrigada pela amizade que construímos, obrigada pelos conselhos pessoais que algumas vezes acabavam por afetar o desempenho profissional. Não há palavras que descrevam minha gratidão e minha admiração por você!

Às pesquisadoras do Núcleo de Ecologia Dra. Mirian Rinaldi, Dra. Márcia Lopes, Dra. Patricia Bulbovas, pelas trocas de conhecimento em diversos momentos e por toda a ajuda nas dúvidas em relação às análises, pelos momentos de descontração e as risadas divertidas.

A pesquisadora Dra. Claudia Maria Furlan por ter aceitado de braços abertos a colaborar neste projeto, por ter me ensinado passo a passo com disposição e paciência as análises do metabolismo secundário, desde o laboratório, até a tabulação e compreensão dos dados.

Agradeço por se mostrar sempre preocupada e disposta a colaborar ainda mais.

Ao pesquisador Dr. Danilo da Cruz Centeno por ter aceitado a colaborar neste projeto, por ter me auxiliado com as análises do metabolismo primário, pela boa disposição, pela forma bem-humorada de me explicar e tabular os dados, muito obrigada!

A pesquisadora Dra. Regina Maria de Moraes e ao Mestre Pedro Ivo Lembo de Assis pela ajuda nas análises de fotossíntese. Em especial ao Pedro pelo auxílio nas viagens, pelos ensinamentos do aparelho “IRGA” e o tratamento dos dados, pela companhia, pelos momentos de descontração ao longo dos dias durante a coleta e pela amizade que construímos a partir disto! Obrigada, meu querido!

Aos amigos do eterno “Projeto Paulínia” Ana Paula, Andressa Ribeiro, Cristiane Aguiar, Leonardo Fujita, Marcelle Dafré, Mauricio Akio, Patrícia Giampaoli, pela ajuda nas coletas simultâneas, pelos momentos agradáveis, de muitas risadas, essenciais para que as dificuldades fossem esquecidas, vocês se tornaram mais que companheiros ou colegas de

trabalharam, se tornaram amigos que levarei além da pós-graduação. Ao Bruno Aguiar, amigo de faculdade que foi de grande ajuda nas coletas e ajudou a carregar muitos pesos...

A Amiga Solange Eulália Brandão, que me acompanha desde a época da faculdade, passamos por muitos momentos juntas e compartilhamos a conquista de estarmos aqui na pós-graduação, obrigada pela caminhada e companheirismo de todos esses anos, por dividir as alegrias e frustrações, você tem um cantinho guardado no meu coração.

Às “Panteras” Amarelas de Souza, Doralice e Marli, pelas ajudas prestadas e por auxiliarem nas atividades (plantio, saídas de campo, lavagem das vidrarias do laboratório).

Aos colegas, funcionários e amigos do Núcleo de Fisiologia: Vanessa, Ju Iura, Cesinha, Manu, Evandro, Flavio Trevisan, Athos, Marina, Maura, Dai, Kássia, Michele, Cabral, Rodrigo Sanchez, Eunice, Pedro, Ana Alice e a Mary Monteiro, por sempre me receberem bem, me auxiliarem com os equipamentos e análises e pelos momentos de descontração.

Aos amigos da Ecologia e Anatomia: Ricks, Mari, Franzinha, Andrea, Stéfano, Dé, Gi Pedrosa, Gigi NP, Josi, Van, Milton, Douglas, Pry, Diego, Mayara, Samantha, Krysna, Richard, agradeço pelos momentos divertidos, as conversas, os congressos, a troca de informações, os papos na cozinha, no corredor, a hora divertida do café, os momentos no laboratório e a convivência fora do Botânico com aqueles que se tornaram mais que colegas!

Aos meus amigos e amigas de longa data pelos ótimos momentos, aos meus grandes amigos “qual é próxima? ”, pela amizade, pelo carinho, generosidade, pela harmonia, pela alegria, risadas e por estarem ali nos momentos em que mais precisei de um ombro amigo e souberam entender meu afastamento.

Aos amigos do CS 01, pelos momentos de companhia, por terem me acolhido, por aceitarem as diferenças, serem tão prestativos, pela disposição e receptividade quando se trata de saber viver tão sabiamente e alegremente!

E por fim, e de grande importância, a minha família em especial aos meus pais, Celina e Waldemir, meus grandes exemplos, por permitirem que eu vivenciasse essa experiência, pela educação, pelos incentivos, pelo amor, pela confiança, pelo apoio incondicional e acima de tudo, por acreditarem sempre em mim. Aos meus irmãos, Mario e Vitor, meus melhores amigos no mundo todo, agradeço pelo companheirismo, pela amizade, pelas conversas agradáveis e sempre animadas, por entenderem a minha ausência nos momentos em família. A minha avó, grande e sábia Dona Neusa, pelos conselhos, pelas risadas e por ser a avó mais incrível desse planeta, que sempre entendeu a minha distância nos momentos em que ela precisou de mim!

ÍNDICE

	LISTA DE SIGLAS.....	I
	RESUMO.....	II
	ABSTRACT.....	III
1	INTRODUÇÃO.....	1
	1.1 Mata Atlântica e as perturbações antrópicas.....	1
	1.2 Poluição atmosférica e seus efeitos adversos em Plantas.....	4
	1.3 Poluição atmosférica e seus efeitos adversos sobre os metabolismos primário e secundário de plantas.....	6
2	OBJETIVOS GERAIS E HIPÓTESES.....	10
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
	3.1 Área de Estudo e Planejamento Amostral	12
	3.2 Espécies Arbóreas Seleccionadas.....	15
	3.3 Etapas Experimentais.....	17
	3.4 Campanhas de Amostragem.....	17
	3.4.1 Caracterização Sazonal.....	17
	3.4.2 Caracterização do Andamento Diário.....	19
	3.5 Extração e Análise de Carboidratos.....	20
	3.6 Extração e Análise de Compostos Fenólicos.....	22
	3.7 Caracterização do Andamento Diário das Trocas Gasosas.....	23
	3.8 Caracterização das Condições Ambientais.....	23
	3.9 Apresentação de Resultados e Análises Estatísticas.....	24
4	RESULTADOS.....	26
	4.1 Variação Sazonal em Carboidratos e Compostos Fenólicos.....	26
	4.1.1 Caracterização das Condições Ambientais.....	26
	4.1.2 Caracterização da Variação Sazonal em Carboidratos e Compostos Fenólicos.....	27
	4.1.3 Relações entre Variações no Conteúdo de Compostos e nas Condições Ambientais.....	36
	4.2 Variação Diária na Fotossíntese e em Carboidratos.....	40
	4.2.1 Caracterização das Condições Ambientais.....	40
	4.2.2 Caracterização da Variação Diária na Fotossíntese e nos Níveis de Carboidratos.....	42
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÕES.....	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE SIGLAS

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CO – Monóxido de carbono
CO₂ – Dióxido de carbono
COVs – Compostos orgânicos voláteis
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FCO – Fragmento Florestal de Cosmópolis
FPA – Fragmento Florestal de Paulínia
FSG - Fragmento Florestal de Santa Genebra
FES – Floresta Estacional Semidecidual
HC – Hidrocarbonetos
MP – Material Particulado
MS – Massa Seca
CG/EM – Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massa
IRGA – Analisador de Gases no Infravermelho
NO – Monóxido de nitrogênio
NO₂ – Dióxido de nitrogênio
NO_x – Óxidos de nitrogênio
O• – Oxigênio atômico
O₂ – Gás oxigênio
O₃ – Ozônio troposférico
O₂•- – Radical Superóxido
OH- – Hidroxila
PA- Poliaminas;
RO₂ – Peroxi-radicais
SO_x – Óxidos de enxofre
SO₂ – Dióxido de enxofre
RMC – Região Metropolitana de Campinas
RUBISCO - Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

RESUMO

Nas últimas décadas, óxidos de nitrogênio, óxidos de enxofre, ozônio e materiais particulados contendo elementos e compostos tóxicos têm contaminado a atmosfera da Região Metropolitana de Campinas (RMC), como resultado do crescente uso e ocupação da terra pelo homem na região. Uma vez absorvidos pelas plantas, tais poluentes podem formar espécies reativas de oxigênio com alto poder oxidativo, que danificam estruturas celulares e causam distúrbios fisiológicos e bioquímicos em plantas. Em resposta, estas podem elevar a concentração de compostos antioxidantes, incluindo carboidratos e compostos fenólicos. Assim, o objetivo geral do presente estudo foi contribuir para ampliar o conhecimento do potencial de tolerância de espécies arbóreas nativas da Floresta Estacional Semidecidual na RMC à poluição atmosférica, ao verificar se ocorrem mudanças sazonais nos conteúdos de carboidratos e de compostos fenólicos e se variações horárias nos níveis de carboidratos e em parâmetros da fotossíntese nessas espécies, ao longo do dia, estão estreitamente relacionadas, de modo a refletir apenas as oscilações em variáveis microclimáticas. Duas etapas experimentais foram conduzidas. Na primeira, foi feita a caracterização sazonal, nas estações secas e úmidas de 2012 e 2013, da composição e níveis de carboidratos e compostos fenólicos em árvores de *Croton floribundus* Spreng., *Astronium graveolens* Jacq. e *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr em três fragmentos florestais na RMC. Na segunda etapa, realizada nos períodos seco e úmido de 2014, foi caracterizado o andamento diário nos níveis de carboidratos, em paralelo a medidas de parâmetros da fotossíntese, em árvores de *C. floribundus* e *A. graveolens*. Os resultados da primeira etapa experimental, em seu conjunto, permitiram concluir que a análise da ocorrência e das concentrações de metabólitos primários e secundários contribuiu para o estabelecimento do nível de tolerância das espécies arbóreas, frente a variações sazonais nas condições climáticas e nos níveis de poluentes. Carboidratos (principalmente amido) e compostos fenólicos (principalmente flavonoides) foram marcadores adequados do aumento de tolerância aos estresses ambientais em folhas de *C. floribundus* e *A. graveolens* respectivamente. *P. gonoacantha* pareceu ser a espécie arbórea mais vulnerável aos estresses ambientais. Os níveis de compostos analisados variaram sazonalmente; as árvores amostradas nos períodos úmidos tenderam a apresentar altos níveis de compostos secundários e carboidratos solúveis totais e as amostradas no período seco altas concentrações de flavonoides. O aumento nos níveis de radiação solar, umidade relativa, temperatura do ar e na concentração dos poluentes mencionados anteriormente afetaram

somente as concentrações de carboidratos solúveis totais, amido e flavonoides, em ambos os períodos de amostragem. Os resultados da segunda etapa experimental demonstraram que houve queda na condutância e assimilação líquida de carbono ao longo do dia em árvores de *A. graveolens* e *C. floribundus*. Ainda, a associação ao longo do dia entre produção de carboidratos solúveis e as trocas gasosas foi modulada por oscilações horárias em variáveis microclimáticas e nos níveis de poluentes atmosféricos somente em árvores de *A. graveolens*.

Palavras-chave: Estresses ambientais, poluição atmosférica, clima sazonal, Floresta Semidecidual Atlântica, carboidratos, compostos fenólicos.

ABSTRACT

In recent decades, nitrogen oxides, sulfur oxides, ozone and particulate material containing toxic compounds have contaminated the atmosphere at the Metropolitan Region of Campinas (MRC), as a result of the increasing land use and occupation by man in the region. Once absorbed by plants, such pollutants can increase the cellular levels of reactive oxygen species, which are highly toxic and may induce oxidative damage in cell structures and cause physiological and biochemical disorders in plants. In response, the plants may increase the concentration of antioxidant compounds, including carbohydrates and phenolic compounds. Thus, the general objective of this study was to contribute to enlarge the knowledge on the potential tolerance of native tree species from the Semideciduous Atlantic Forest in MRC to air pollution, by determining whether seasonal changes are detectable in the contents of carbohydrates and phenolic compounds and whether hourly variations in the levels of carbohydrates and photosynthesis in these species, throughout the day, are closely related, thus reflecting only fluctuations in climatic variables. Two experimental steps were conducted. In the first, the seasonal composition and levels of carbohydrates and phenolic compounds in leaves of *Croton floribundus* Spreng, *Astronium graveolens* Jacq and *Piptadenia gonoacantha* (Mart) Macbr sampled in three forest fragments were characterized during dry and wet seasons in 2012 and 2013. The daily profile in the levels of carbohydrates and in photosynthetic parameters in trees of *C. floribundus* and *A. graveolens* were measured during the second experimental step conducted during dry and wet periods in 2014. The results of the first experimental step, as a whole, permitted to conclude that the analysis of primary and secondary metabolites contributed to establish the tolerance level of tree species to seasonal variations in climatic conditions and pollutant levels. Carbohydrates (mainly starch) and phenolic compounds (mainly flavonoids) were appropriate markers of increased tolerance against environmental stresses in leaves of *C. floribundus* and *A. graveolens*, respectively. *P. gonoacantha* seemed to be the most vulnerable tree species to environmental stresses. The levels of the metabolites analyzed varied seasonally; the trees sampled in wet periods tended to present high levels of secondary metabolites and total soluble carbohydrates and those sampled in the dry period tended to accumulate only flavonoids.

The increase in levels of solar radiation, relative humidity, air temperature and pollutant concentrations affected only the concentrations of total soluble carbohydrates, starch and flavonoids, in both sampling periods. The results of the second experimental step showed that there is a drop in conductance and liquid carbon assimilation during the day trees in *A. graveolens* and *C. floribundus*. Still, that the association between production of soluble carbohydrates and gas exchange throughout the day was modulated by hourly fluctuations in climatic variables and air pollutant levels only in trees of *A. graveolens*.

Keywords: Environmental stresses, air pollution, seasonal climate, Semideciduous Atlantic Forest, carbohydrates, phenolic compounds.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mata Atlântica e as perturbações antrópicas

As florestas estão entre os ecossistemas tropicais mais importantes, devido ao seu papel no ciclo global do carbono e na preservação de *pools* genéticos (Favaretto *et al.*, 2011). Os ecossistemas florestais do Brasil, como é o caso da Mata Atlântica, são diversos e complexos, por ocuparem extensa área física e, conseqüentemente, estarem expostos a uma diversidade de climas e de solos (Leitão-Filho, 1987).

O Domínio da Mata Atlântica é composto por um mosaico complexo de vegetação com diferentes fisionomias, que abriga uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil e do mundo. Os altos níveis de riqueza e endemismo, associados à destruição sofrida no passado, incluíram a Floresta Atlântica no cenário mundial como um dos 34 *hotspots* de biodiversidade (Mittermeier *et al.*, 2004). Este está distribuído ao longo da costa atlântica do país além de atingir áreas da Argentina e do Paraguai nas regiões sudeste e sul. De acordo com o Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428, de 2006 e Decreto nº 6.660, de 21 de novembro de 2008, publicado no Diário Oficial da União de 24 de novembro de 2008 (IBGE, 2008), a Mata Atlântica abrangia originalmente 1.315.460 km² do território brasileiro. Seus limites originais contemplavam áreas em 17 Estados (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Sergipe, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), o que correspondia a aproximadamente 15% do território brasileiro (Fundação SOS Mata Atlântica, 2008).

No entanto, a expansão da ocupação humana ao longo da costa brasileira, de forma intensa e desordenada, resultou em redução significativa da área coberta pela Mata Atlântica e de sua biodiversidade (Domingos *et al.*, 2003; Emberson *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2010; Groeneveld *et al.*, 2009; Lira *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2009). Tal ocupação é justificada pelos inúmeros benefícios diretos e indiretos proporcionados pela Mata Atlântica à população humana, tais como a proteção dos mananciais hídricos, que abastecem as principais metrópoles e cidades brasileiras, controle do clima e garantia de qualidade de vida e bem-estar (RMA, 2006). Acrescenta-se que o alto grau de interferência na Mata Atlântica é conhecido desde a época da colonização europeia, com a intensa exploração do pau-brasil (Santos, 2008).

Os números do que resta atualmente da área coberta pelo Domínio da Mata Atlântica variam de acordo com a fonte e a metodologia utilizada para estimá-los (Galindo-Lecina e Câmara, 2005; Fundação SOS Mata Atlântica, 2008; INPE, 2008). Dados mais atuais indicam que restam aproximadamente 11% da vegetação original, distribuída em fragmentos florestais de tamanho reduzido (Ribeiro *et al.*, 2009).

Estima-se que o Estado de São Paulo originalmente possuía cerca de 80% (20.450.000 ha) de seu território coberto pelas distintas formações florestais associadas ao Domínio da Mata Atlântica (RMBA, 1997), entre as quais a Floresta Estacional Semidecidual.

A Floresta Estacional Semidecidual, que ocorre no interior do estado de São Paulo, é caracterizada pela sazonalidade climática (períodos secos e úmidos bem definidos), que determina a perda foliar (20 a 50% de decíduidade) em indivíduos arbóreos dominantes, em resposta à deficiência hídrica ou queda de temperatura nos meses mais frios e secos (Velloso *et al.*, 1991). Hoje em dia, tais florestas representam menos de 5% de sua cobertura original no Estado e ocorrem de forma descontínua em fragmentos de vários tamanhos, devido à forte pressão antrópica. Alguns fragmentos estão protegidos em unidades de conservação ou dentro de propriedades privadas (Vianna *et al.*, 1994 *apud* Toniato e Oliveira-Filho, 2004; Nalon, 2008).

Além da intensa fragmentação, a Floresta Estacional Semidecidual no interior de São Paulo está exposta a poluentes emitidos para a atmosfera por uma diversidade de fontes antrópicas, como veículos e indústrias petroquímicas, químicas e agrícolas. Ainda, esses fragmentos florestais estão circundados por áreas extensas voltadas à agricultura, que é também uma possível fonte de poluição atmosférica (Moura, 2013).

Segundo a resolução do CONAMA (1990), define-se poluente atmosférico como “qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança”.

Os poluentes atmosféricos são classificados, de acordo com sua origem, como primários e secundários. Os poluentes primários são aqueles emitidos diretamente das fontes de poluição. Na atmosfera, os poluentes primários podem reagir entre si ou com os constituintes naturais da atmosfera e dar origem a poluentes secundários (Domingos *et al.*, 2002, Cetesb, 2014).

A composição específica da poluição atmosférica é variável nos diferentes locais devido a variações na geografia, clima e fontes de emissão (Brook *et al.*, 2003). Entre os principais poluentes primários presentes na atmosfera de centros urbanos e industriais, estão o monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO_x), hidrocarbonetos (HC), óxidos de enxofre (SO_x) e materiais particulados com composição variada, incluindo nitrato, sulfato e metais pesados (Cetesb, 2014).

Entre os poluentes secundários, destaca-se o ozônio troposférico (O₃). Esse poluente é formado a partir de reações fotoquímicas entre o oxigênio e os óxidos de nitrogênio (NO e NO₂) e compostos orgânicos voláteis (Krupa e Manning, 1998). O O₃ também está presente na estratosfera, onde é benéfico aos seres vivos, por atuar como um filtro absorvendo a radiação ultravioleta que chega à Terra (Krupa *et al.*, 2001). Porém, o O₃ troposférico está entre os poluentes mais tóxicos aos seres vivos, devido ao seu alto poder oxidante.

Em grandes centros urbanos, como a Região Metropolitana de São Paulo e a Região Metropolitana de Campinas, o O₃ ultrapassa com frequência o padrão de qualidade do ar, colocando em risco não somente a população como também a flora e a fauna locais (Cetesb, 2014).

As concentrações dos poluentes na atmosfera não são determinadas apenas pela quantidade emitida ou formada. Os poluentes primários, depois de emitidos para a atmosfera, passam por um complexo processo de transporte, mistura e transformação química, que irão determinar suas concentrações na atmosfera. Basicamente, o nível de concentração de poluentes na atmosfera depende das condições de emissão e das condições meteorológicas, podendo alguns poluentes ser transportados a grandes distâncias antes de atingirem o nível do solo (Elsom, 1989). Desta forma, os poluentes atmosféricos podem afetar não somente a qualidade do ar nos locais de emissão, mas também produzir efeitos que se manifestam a grandes distâncias e em longo prazo (Klumpp *et al.*, 1996). Wang e colaboradores (2007), por exemplo, encontraram maiores concentrações de O₃ em áreas rurais do que em áreas urbanas e suburbanas da China, devido ao seu transporte em longa distância ou de seus precursores.

Durante os meses de inverno em São Paulo, quando as condições meteorológicas são mais desfavoráveis à dispersão dos poluentes, as concentrações de monóxido de carbono, material particulado e dióxido de enxofre são mais altas, já na primavera e verão, a maior intensidade de luz solar favorece a produção de ozônio (Cetesb, 2014).

1.2 Poluição atmosférica e seus efeitos adversos em Plantas

O primeiro contato entre o poluente e as plantas ocorre nas folhas. Os poluentes gasosos entram nas plantas principalmente via estômatos durante as trocas gasosas. Os constituintes tóxicos do material particulado, como os íons metálicos, podem reagir com a cutícula ou ser absorvidos pelas raízes após sua deposição no solo (Streit e Stumm, 1993; Wagner, 1993).

Uma vez absorvidos pelas plantas e ao atingirem os espaços intercelulares, os poluentes atmosféricos reagem com a água, constituintes celulares, componentes da parede celular, membranas e fluidos presentes no apoplasto, e formam as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Klumpp *et al.*, 2001; Baier *et al.*, 2005, Agrawal, 2008).

Entretanto, vale ressaltar que as EROs são naturalmente produzidas como subprodutos de várias vias metabólicas, como a respiração e a fotossíntese, através de reações redox e durante a redução incompleta do oxigênio ou oxidação da água pela cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto ou na mitocôndria, podendo se apresentarem como radicais livres ou na forma molecular de um não radical (Noctor e Foyer, 1998; Apel e Hirt, 2004; Kovalchuk, 2010). Além disso, em plantas vasculares, estas EROs podem ser mensageiras secundárias em muitos processos associados com o crescimento e desenvolvimento da planta (Hong-Bo *et al.*, 2008).

Entre as EROs, encontram-se o oxigênio singlete ($\cdot\text{O}_2$), que após sua formação acaba estimulando a produção das outras espécies como o radical peridroxil ($\text{O}_2\text{H}\cdot$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Estas moléculas, especialmente o $\text{OH}\cdot$, são muito reativas, afetando lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (Bray *et al.*, 2000).

As membranas celulares são os alvos primários das EROs, resultando na peroxidação lipídica, que além de prejudicar a permeabilidade da membrana, inicia uma série de reações intermediárias que produzem novas espécies reativas de oxigênio, as quais também reagem com as biomoléculas (Muggli, 1993; Sharma e Davis, 1997; Iriti e Faoro, 2008). Em consequência, processos bioquímicos como a fotossíntese e a respiração são afetados.

Todos os organismos fotossintetizantes contêm um ou mais pigmentos capazes de absorver a radiação visível, que iniciará as reações fotoquímicas da fotossíntese. Em plantas superiores, os principais pigmentos são as clorofilas a, b e os carotenoides (Taiz e

Zeiger, 2006). A clorofila é uma molécula com a propriedade de fluorescência porque possui elétrons que podem receber energia da luz (fótons). Quando recebem fótons, os elétrons passam a ocupar um orbital mais externo (de maior energia). No momento seguinte, o elétron será novamente atraído pelo núcleo do átomo. Mas para voltar ao seu orbital original, precisará liberar a energia recebida. É nesse momento que ocorre a fluorescência; o elétron libera a energia recebida, emitindo luz e calor. Porém, este processo poderá ser interrompido pelo aumento dos níveis de EROs induzido por estressores ambientais (radiação, umidade relativa e temperatura do ar, poluição atmosférica) (Costa, *et al.*, 2003; Baker e Rosenqvist, 2004; Neufeld, 2012), causando a inibição da transferência da energia emitida pela clorofila (Atkins e Paula, 2006). Essa fase da fotossíntese, assim, é bastante suscetível à ação do estresse oxidativo induzido por poluentes atmosféricos sobre as plantas.

O processo da fotossíntese pode ser afetado, também, pelo estresse oxidativo em consequência de alterações no estado funcional das membranas dos tilacóides dos cloroplastos, provocando mudanças nas características dos sinais de fluorescência, que podem ser quantificadas nas folhas (Ribeiro *et al.*, 2003; Baker e Rosenqvist, 2004).

Outro efeito que a poluição poderá causar na fotossíntese é sobre a assimilação líquida de carbono, podendo esta ser reduzida, em resposta a alterações no transporte de elétrons, redução da atividade da enzima Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), redução da condutância estomática, que diminui a taxa de difusão de CO₂ e mesmo degradação de clorofilas. A redução da condutância estomática poderá resultar também em diminuição na quantidade e na translocação de fotossintatos nas folhas através do floema. Depois de sintetizados nas folhas, os carboidratos simples são geralmente transportados para os drenos, ou seja, para outros órgãos como raízes, tubérculos e frutos (Fiscus *et al.*, 2005; Grulke *et al.*, 2007; Seyyednejad *et al.*, 2011). Tais alterações no processo fotossintético poderão resultar em mudanças na partição de carbono e na produção de metabólitos primários e secundários (ver detalhes no item a seguir) que, finalmente, influenciarão nas características de crescimento e desenvolvimento da planta (Iqbal *et al.*, 1996; Grantz e Yang, 2000). Os efeitos dos poluentes podem se projetar para o nível de populações e da comunidade vegetal, afetando o ecossistema como um todo (Percy e Ferreti, 2004).

Tal fato tem bastante relevância para ecossistemas naturais muito fragmentados, como no caso da Floresta Estacional Semidecidual da Região Metropolitana de Campinas. No entanto, vale destacar que os efeitos deletérios das EROs sobre processos vitais nas

plantas somente ocorrerão a partir do momento em que o equilíbrio pró-oxidante-antioxidante for rompido nas células vegetais (Halliwell e Gutteridge, 2007). Contra esse efeito das EROs, as plantas possuem um sistema de defesa antioxidativo constituído por compostos enzimáticos (ex: superóxido dismutase, catalase, guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase) e não enzimáticos (ex: ácido ascórbico, glutatona e carotenóides) (Long e Naidu, 2003). Neste último caso, também se destaca o papel protetor de compostos fenólicos e dos carboidratos (Ma *et al.*, 2011), como será detalhado no item a seguir, que podem atuar como sequestradores diretos de EROs, ou como sinalizadores dos mesmos para outras vias antioxidativas (Bors *et al.*, 1989; Peshev e Van Den Ende, 2012).

1.3 Poluição atmosférica e seus efeitos adversos sobre os metabolismos primário e secundário de plantas

Resumidamente para que haja a fotossíntese, os pigmentos fotossintetizantes presentes nos cloroplastos, distribuídos no complexo antena, deverão absorver os fótons, transferindo a energia de excitação para os centros de reação dos fotossistemas I e II. No fotossistema II, ocorrerá a oxidação de moléculas de água, com a produção de oxigênio e a doação de um elétron para a cadeia transportadora de elétrons. Os prótons produzidos pela oxidação da água no lúmen dos tilacóides geram um gradiente eletroquímico através da membrana do tilacóide, tornando-se uma força motora para a fosforilação de ADP em ATP. No fotossistema I, ocorrerá a redução de NADP^+ em NADPH. O processo de fixação de carbono na fotossíntese se dá através da carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) pela enzima Rubisco, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato, que será reduzido a triose-fosfato (Taiz e Zeiger, 2006).

O armazenamento do carbono que foi assimilado na fotossíntese se dá através da síntese de carboidratos, ou seja, enquanto a maior parte da triose-fosfato produzida no ciclo de Calvin será utilizada para regenerar a RuBP, a outra parte será direcionada para a produção de sacarose e amido (Lambers, 2006).

Desta forma, as triose-fosfatos serão exportadas ao citosol para a síntese de sacarose que é composta por uma molécula de frutose e de glicose e exerce um papel central nas plantas superiores, como transporte, armazenamento e sinalizador molecular, para posteriormente ser alocada para outros órgãos das plantas, como raízes e frutos. Outra parte das triose-fosfatos ficará retida nos cloroplastos para a síntese de amido via frutose-1,6-bifosfato, que atua como carboidrato de reserva, visto que poderá ser hidrolisado

durante a noite para gerar substratos a serem utilizados para a síntese de sacarose e garantir assim o fluxo de fotossintatos (Huber e Huber, 1996; Smith e Stitt, 2007).

Entretanto, sabe-se que as plantas possuem outras rotas metabólicas importantes para a síntese de outros compostos. Neste contexto podemos citar a via das pentoses fosfatos e via glicolítica, que atuam na oxidação de carboidratos, produzindo outras moléculas que serão utilizadas em outras vias metabólicas, para a produção de compostos do metabolismo secundário, por exemplo (Lehninger *et al.*, 2004).

Em síntese, o metabolismo vegetal pode ser dividido em primário e secundário. Entende-se por metabolismo primário o processo de produção de compostos essenciais para a sobrevivência e bem-estar do organismo, tais como os ácidos carboxílicos do ciclo de Krebs, aminoácidos, lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, com ampla distribuição no reino vegetal (Simões *et al.*, 2004). Já o metabolismo secundário compreende uma grande diversidade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento, e que também são conhecidos como produtos secundários ou produtos naturais. Ainda, estes metabólitos secundários diferem dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal (Taiz e Zeiger, 2006).

Dentre os compostos do metabolismo secundário, encontram-se os compostos fenólicos que são caracterizados por um anel aromático ligado a hidroxila, e constituem um grupo heterogêneo de compostos químicos, tais como os flavonóides, antocianidinas e os taninos. A síntese dessas substâncias é realizada por duas rotas metabólicas, a via do ácido chiquímico e a do ácido malônico. O ácido chiquímico transforma os carboidratos simples derivados da glicólise e da via das pentoses em aminoácidos aromáticos (Hermanne Weaver, 1999).

A maior classe de fenólicos é a dos flavonoides, englobando mais de 10.000 compostos. Os flavonoides apresentam uma estrutura básica de 15 átomos de carbono organizados em dois anéis aromáticos, cada um contendo 6 carbonos, interligados por anel heterocíclico composto por três átomos de carbono (Vermerris e Nicholson, 2006; Furlan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Os diferentes grupos de flavonoides variam conforme o grau de oxidação do anel heterocíclico (Wang *et al.*, 2011). Os principais grupos de flavonoides são representados pelas chalconas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, di-hidroflavonóis, antocianidinas, flavonóis e flavanas (Treutter, 2006; Dewick, 2009).

Assim, visto que a síntese dos compostos secundários está relacionada com a síntese de metabólitos primários, alguns trabalhos científicos têm demonstrado que a ação da

poluição aérea nos teores de açúcares e aminoácidos afetam, por consequência, a produção de alguns compostos fenólicos, podendo alterar a capacidade de defesa das plantas (Pasqualini *et al.*, 2003; Tripathi e Gautam, 2006; Furlan, 1998).

De forma a se adaptarem contra os diversos estresses ambientais, as plantas podem acumular aminoácidos livres, polióis e carboidratos. Tais compostos compartilham como característica comum, a propriedade de permanecerem estáveis em pH neutro e serem altamente solúveis em água (Chaves *et al.*, 2009). Dentre as funções atribuídas ao acúmulo de carboidratos como o amido e os frutanos, destacam-se o ajustamento osmótico para manutenção da turgescência, a estabilização das estruturas das membranas contra efeitos nocivos causados por EROs, a formação do estado vítreo celular e o fornecimento de esqueletos carbônicos proporcionando fonte de energia e ainda agirem como sinalizadores para o sistema antioxidante das plantas (Farrant *et al.*, 2007; Farrant *et al.*, 2009; Pasqualetti *et al.*, 2015).

Baixas concentrações de açúcares solúveis em água e elevado conteúdo de amido são alterações metabólicas já verificadas em plantas expostas a poluentes oxidativos, como o ozônio, que podem ser atribuídas ao aumento da respiração ou inibição da fotossíntese (Seyyednejad *et al.*, 2011; Huttunen e Manninen, 2013; Kurto *et al.*, 2014). Também podem resultar da inibição da alocação de carbono para as raízes (Skärby *et al.*, 1998; Thomas *et al.*; 2002).

Os metabólitos secundários também possuem ação protetora natural em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a UV e deficiência de nutrientes minerais (Bieski *et al.*, 2004; Gobbo-Neto *et al.*, 2007; Kliebenstein, 2012). Além da ação dos sistemas antioxidantes mencionados no item anterior, as plantas contam com atuação de substâncias antioxidantes provenientes do metabolismo secundário, tais como compostos fenólicos e terpênicos, para minimizar os danos causados pelo aumento da formação de EROs em plantas expostas a poluentes oxidativos. Os flavonoides também auxiliam na proteção contra os raios ultravioleta que incidem principalmente sobre as folhas (Taiz e Zeiger, 2006; Simões *et al.*, 2010; Agati *et al.*, 2012; Agati *et al.*, 2013).

É preciso destacar, ainda, que as mencionadas alterações nos metabolismos primário e secundário de plantas em seu ambiente natural, quer indicadoras de danos fisiológicos ou de aumento de tolerância ao estresse oxidativo, podem ocorrer também em resposta ao estresse imposto por oscilações climáticas locais, como extremos de

temperatura, déficit hídrico e excesso de radiação solar (Tausz *et al.*, 1998, Tausz *et al.*, 2007).

Desse modo, o planejamento de um estudo a ser conduzido no ambiente natural, que vise a inferir sobre efeitos de poluentes aéreos nas plantas, com base na análise dos mencionados marcadores metabólicos, deve ser cercado de cuidados, como a inclusão de monitoramento dos poluentes atmosféricos e de variáveis climáticas durante a amostragem. A proposição de experimentos complementares que permitam caracterizar a associação entre as respostas vegetais e as oscilações microclimáticas na região de estudo também é necessária.

O presente estudo foi elaborado com base na contextualização teórica apresentada anteriormente, partindo do princípio de que a análise de metabólitos primários e secundários em folhas de espécies arbóreas nativas de fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual, na região metropolitana de Campinas, pode contribuir para o estabelecimento de seu potencial de tolerância ao estresse oxidativo teoricamente imposto pela marcada sazonalidade climática e por poluentes atmosféricos emitidos por uma diversidade de fontes antrópicas existentes na região, como veículos e indústrias petroquímicas, químicas e agrícolas.

2. OBJETIVOS GERAIS E HIPÓTESES

O presente estudo teve como objetivos gerais:

1. Avaliar se ocorrem mudanças espaciais e sazonais na composição e nos níveis de compostos dos metabolismos primário e secundário (carboidratos e compostos fenólicos respectivamente) em três espécies arbóreas presentes em fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual, na Região Metropolitana de Campinas.
2. Avaliar se as variações horárias nos níveis de carboidratos solúveis e em parâmetros da fotossíntese nessas espécies, ao longo de um dia, estão estreitamente relacionadas, de modo a refletir apenas as oscilações em variáveis microclimáticas na região de estudo.
3. Identificar quais fatores de estresse ambiental, entre os naturais (variáveis climáticas) e antrópicos (poluentes atmosféricos), poderiam induzir as mudanças sazonais e ao longo de um único dia nos níveis de compostos dos metabolismos primário e secundário analisados nas espécies arbóreas presentes em fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual.

Tendo em vista a base conceitual apresentada, assumimos a hipótese de que a composição e níveis de compostos dos metabolismos primário e secundário analisados:

- 1) Variam entre as espécies escolhidas para o estudo, uma vez que as mesmas apresentam características morfoanatômicas e fisiológicas distintas e pertencem a estágios sucessionais diferentes;
- 2) Variam entre as estações do ano, uma vez que maiores concentrações de poluentes primários (NO₂, SO₂ e MP) são encontradas na estação seca ao mesmo tempo em que valores mais altos de temperatura e de intensidade de radiação solar e/ou mais baixos de umidade relativa do ar podem propiciar o fechamento estomático e reduzir a fotossíntese nessa estação, enquanto que maiores valores de ozônio e condições climáticas mais amenas são encontrados na estação úmida;
- 3) Indicam efeitos de estressores ambientais, como poluentes aéreos e/ou condições meteorológicas adversas;
- 4) Podem incrementar a tolerância das espécies nativas frente aos fatores de estresse por poluição atmosférica.

Assumimos também a hipótese de que a associação entre produção de carboidratos solúveis e as trocas gasosas ao longo de um único dia é modulada por oscilações horárias tanto em variáveis microclimáticas quanto nos níveis de poluentes atmosféricos na região de estudo.

Visando ao alcance dos objetivos e confirmação ou rejeição das hipóteses, duas etapas experimentais foram propostas:

- 1) caracterização sazonal das mudanças qualitativas e quantitativas nos carboidratos e nos compostos fenólicos, de árvores de três espécies arbóreas ocorrentes nos três fragmentos florestais selecionados;
- 2) caracterização do andamento diário nos níveis qualitativos e quantitativos de carboidratos, em paralelo a medidas de parâmetros da fotossíntese, em árvores de duas das espécies estudadas na etapa anterior, ao longo de uma semana, nos períodos seco e úmido, objetivando inferir até que ponto tais respostas vegetais estão associadas com as oscilações horárias em variáveis microclimáticas e nas concentrações atmosféricas de poluentes.

O planejamento amostral para ambas as etapas será descrito em detalhes a seguir.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo e Planejamento Amostral

Os fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual incluídos no presente estudo estão localizados na Região Metropolitana de Campinas (RMC), no Planalto Paulista. Trata-se da segunda maior região metropolitana do Estado de São Paulo, ficando atrás apenas da Região Metropolitana de São Paulo. Os municípios que integram a RMC estão incluídos na faixa de vegetação abrangida pelo Domínio da Mata Atlântica, um complexo conjunto de fisionomias e formações florestais de diferentes extensões, condições ecológicas, estágio de conservação e pressão antrópica (Lino e Albuquerque, 2007). Esse conjunto de ecossistemas possuem estruturas e composições florísticas diferenciadas, em função de peculiaridades de solo, relevo e clima.

A RMC é composta por 20 municípios, incluindo Paulínia, com um expressivo parque industrial, e Campinas, considerada a sede da região, com uma frota de veículos que é responsável por uma parte significativa da poluição atmosférica. A Região conta com um grande sistema viário, tendo como eixos principais as rodovias Anhanguera e Bandeirantes. Esse sistema permitiu a ocupação urbana ao redor de cidades de médio e grande porte, ocasionando intensa atividade industrial e de serviços ao lado de grande atividade agroindustrial (Cetesb, 2014).

A RMC está distante cerca de 130 km da Capital, possui cerca de 2,3 milhões de habitantes e ocupa uma área de 3348 km², concentrando algumas das maiores empresas instaladas no país, formando um polo industrial. Incluem-se, entre as indústrias de maior porte, a Refinaria do Planalto Paulista (Replan), que demarca o ponto central da área de estudo (Figura 1), a Rhodia e a Syngenta. Essa região responde por cerca de 3% do PIB brasileiro. Em um raio de 200 km, concentram-se mais de 30 milhões de habitantes, população equivalente à do Canadá ou duas vezes a do Chile (Campinas, 2014).

Seu clima predominante é caracterizado de acordo com a classificação de Koppen como Cwa (subtropical úmido com inverno seco e verão quente), com estação chuvosa entre outubro e março e inverno seco entre abril e setembro, com ventos predominantes sentido noroeste. O município de Campinas, sede da região, apresenta temperatura média anual de 21,4 °C, com a média das temperaturas mínimas no mês mais frio de 11°C e a média das temperaturas máximas nos meses mais quentes de 29°C. A precipitação média

anual é de 1470 mm, sendo que aproximadamente 80% ocorrem no período de outubro a março (Andrade *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2014).

A Floresta Estacional Semidecidual, na RMC, está fragmentada em pequenas áreas residuais, na maioria das vezes isoladas umas das outras. Parte dos remanescentes de vegetação nativa está inserida em unidades de conservação como a Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra, situada em Campinas, e a Área de Relevante Interesse Ecológico Matão de Cosmópolis (Moura, 2013).

As amostragens propostas no presente projeto foram realizadas nessas duas unidades de conservação e em um terceiro fragmento inserido em uma propriedade agrícola localizada no município de Paulínia, conforme ilustra a Figura 1. Detalhes sobre a localização geográfica, área e siglas adotadas para referência dos fragmentos no texto são apresentadas na tabela 1:

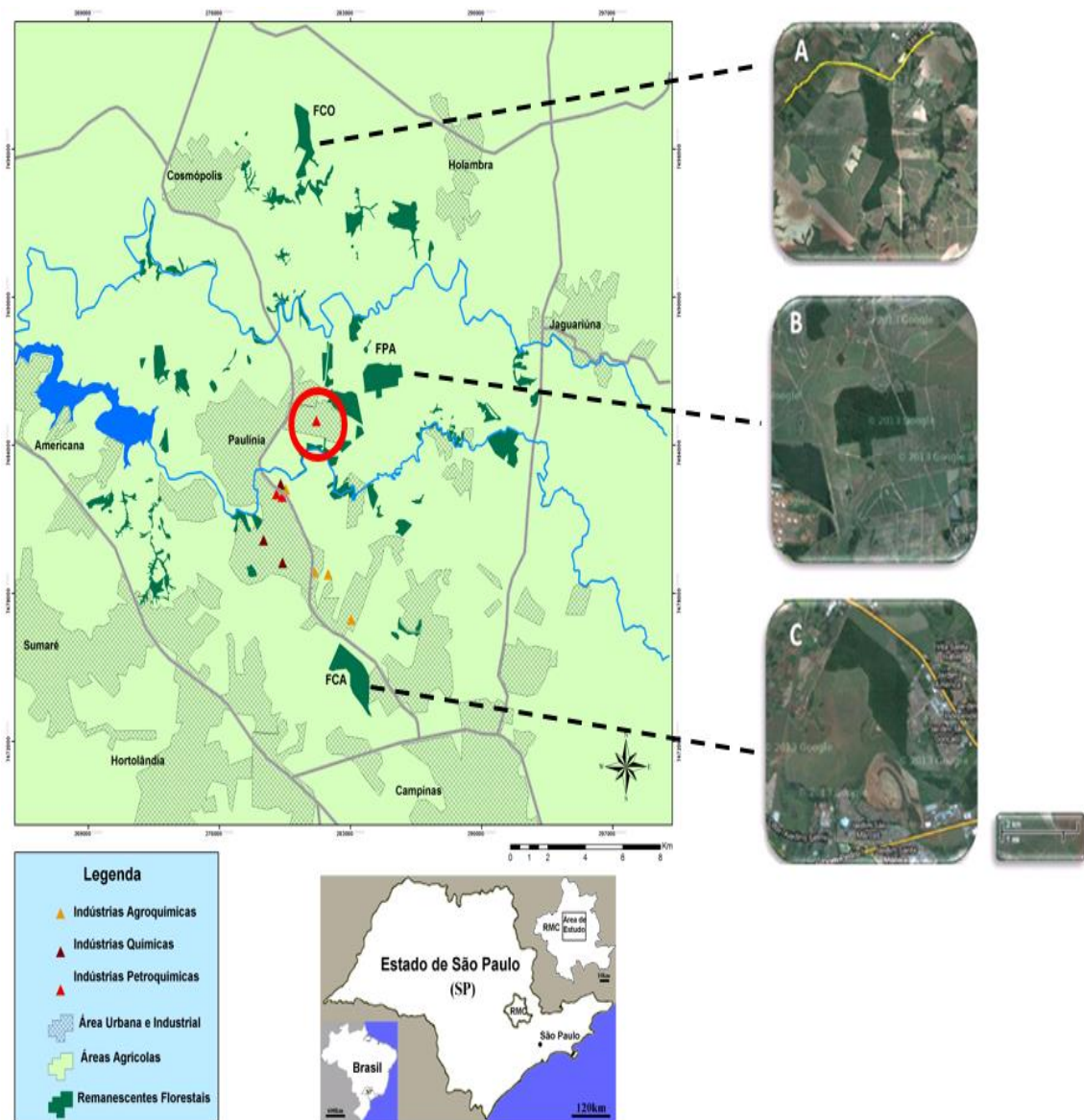


Figura 1. Mapa de parte da Região Metropolitana de Campinas, onde estão localizados os fragmentos florestais estudados. Em detalhe, imagens de satélite dos fragmentos florestais e de seu entorno e a Refinaria do Planalto Paulista – REPLAN (circundado de vermelho). FCO - Cosmópolis (A), FPA – Paulínia (B), FCA - Campinas (C) (Figura adaptada de: Domingos *et al.*, 2015).

Tabela 1. Sigla dos fragmentos florestais estudados, sua área de ocupação e localização geográfica.

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

3.2. Espécies arbóreas selecionadas

O estudo de campo iniciou-se em 2011 com um levantamento fitossociológico para identificar as espécies mais abundantes nos remanescentes florestais, utilizando o método modificado de Gentry, com adaptações de acordo com os protocolos propostos pelo ICP-Floresta (Ferretti *et al.*, 2010; Rautio *et al.*, 2010). Dezesesseis transectos paralelos (50 m x 4 m, comprimento x largura, cada um), a 100 m da borda da floresta e distante 20 m um do outro, foram instalados em cada fragmento de floresta (3200 m² inventariados por remanescente florestal). Todas as árvores dentro de cada transecto e com uma circunferência à altura do peito DAP>30cm foram recolhidas e identificadas. Com base nos resultados desta etapa experimental, sintetizados em Domingos *et al.*, (2015), as espécies escolhidas para o presente estudo foram *Croton floribundus* Spreng., *Astronium graveolens* Jacq. e *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr, por apresentarem grande representatividade, por ocorrerem nos três fragmentos e por pertencerem estágios sucessionais diferentes.

Astronium graveolens Jacq. (Figura 2A), conhecido popularmente como Guaritá, pertence à família Anacardiaceae e é considerada uma espécie secundária tardia na sucessão ecológica, ocorrendo em Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Densa e Mista e também em matas ciliares. Sua distribuição geográfica no Brasil é ampla, ocorrendo desde a região sudeste até a nordeste, nos estados Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo. Sua dispersão é anemocórica e a floração ocorre do início do inverno ao início da primavera e a frutificação na primavera. É uma espécie decídua, perdendo suas folhas antes da floração. As folhas novas aparecem juntamente com as flores no final da estação seca (Engel *et al.*, 1984; Carvalho, 1994; Lorenzi, 2002; Guaratini *et al.*, 2008).

Croton floribundus Spreng. (Figura 2B), conhecido popularmente como Capixingui, pertence à família Euphorbiaceae e ocorre principalmente na Floresta Estacional Semidecidual. É classificado como espécie pioneira na sucessão ecológica. Ocorre nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro. Apresenta crescimento muito rápido e ciclo de vida curto, muito abundante em formações secundárias, repovoando clareiras e proliferando em bordas de mata. A floração ocorre de meados do inverno ao início da primavera e a frutificação ocorre em meados do verão a meados do outono e a queda de folhas ocorre continuamente durante o ano todo (Engel *et al.*,1984, Carvalho, 1994, Ferraz *et al.*, 1999; Lorenzi, 2002; Durigan *et al.*,2002; Guaratini *et al.*,2008).

Piptadenia gonoacantha (Mart.) Macbr (Figura 2C), espécie conhecida popularmente como Pau Jacaré ou Angico, pertence à família Fabaceae. É considerada uma espécie secundária inicial na sucessão ecológica, de rápido crescimento e por isso tem sido indispensável nos reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente. Ocorre em Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Densa e Mista, com distribuição nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo. A floração ocorre da primavera ao outono e a frutificação vai do inverno ao verão. No caule há presença de acúleos, característicos da espécie, com até 2cm de comprimento em maior ou menor quantidade (Engel *et al.*,1984, Carvalho; 1994, Lorenzi, 2002, Carvalho, 2004; Guaratini *et al.*,2008).



Figura 2. Espécies selecionadas para este estudo. *Astronium graveolens* Jacq. (A), *Croton floribundus* Spreng. (B) e *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr (C). Fotos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

3.3. Etapas Experimentais

Realizaram-se duas etapas experimentais em campo:

- 1) A primeira consistiu na realização de amostragens de folhas em períodos úmidos e secos, visando a identificar variações sazonais qualitativas e quantitativas em carboidratos e compostos fenólicos em árvores de três espécies arbóreas ocorrentes nos três fragmentos florestais selecionados.
- 2) Na segunda etapa, caracterizou-se o andamento diário nos níveis quantitativos de açúcares solúveis, em paralelo a medidas de parâmetros da fotossíntese, em árvores de *Croton floribundus* e *Astronium graveolens* encontradas na ARIE Mata de Santa Genebra, nos períodos seco e úmido. A ARIE Mata de Santa Genebra foi escolhida para realização dessa etapa, uma vez que é o maior fragmento, com uma borda mais extensa (mais representativa), além de oferecer maior infraestrutura em relação aos demais locais. *P. gonoacantha* não foi incluída nessa etapa, pois os folíolos se desprendem das folhas antes do término das medidas fotossintéticas.

O planejamento de amostragens proposto para cada etapa, denominadas como caracterização sazonal e caracterização do andamento diário, respectivamente, encontra-se descrito a seguir no item 3.4.

3.4. Campanhas de amostragem

3.4.1 Caracterização Sazonal

Para caracterização sazonal, realizaram-se campanhas de amostragem de folhas das três espécies em dois períodos com clima predominantemente úmidos (janeiro/2012 e janeiro/2013) e em dois períodos predominantemente secos (julho/2012; agosto/2013). Cada campanha de amostragem sazonal foi realizada durante 08 dias, distribuídos em 02 semanas consecutivas (Tabela 2). As coletas diárias foram realizadas às 10h e às 13h, para avaliação de possíveis diferenças nos teores dos carboidratos e de compostos fenólicos entre estes horários, tendo em vista a ocorrência de variações bem estabelecidas ao longo do dia na concentração de poluentes e em variáveis microclimáticas. As coletas foram

simultâneas nos fragmentos florestais, visto que a equipe envolvida nessa atividade de campo se dividia em 03 subgrupos.

As amostras foliares das espécies foram coletadas em indivíduos arbóreos com circunferência a altura do peito ≥ 30 cm, em estado vegetativo e presentes na borda norte ou nordeste dos fragmentos florestais, por meio do uso de tesoura de alta poda. Em cada amostragem, coletaram-se folhas totalmente expandidas, maduras, sem herbívoros e expostas ao sol de 4 a 6 indivíduos por espécie (Figura 3A). A escolha dos indivíduos presentes nessas bordas possibilitou coletar folhas que estão sob maior exposição ao sol, de modo que, teoricamente, interagiriam mais com poluentes atmosféricos devido a taxas fotossintéticas mais altas. Esta escolha foi baseada em estudos de efeitos de poluentes atmosféricos em florestas na Europa (Icp, 2005). Após cada coleta horária em cada dia, as amostras foliares dos indivíduos de mesma espécie foram agrupadas, compondo uma amostra mista (Figura 3B), que foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido (Figura 3C). As amostras mistas, ao final de cada campanha de amostragem, foram transportadas para o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Ecologia do Instituto de Botânica, em São Paulo, onde foram transferidas para um *deep freezer* para armazenamento sob -80°C , até o momento das extrações e análises de carboidratos e compostos fenólicos, por meio de métodos previamente testados para as espécies estudadas.

Deste modo, em cada período do ano (seco ou úmido), obteve-se um total de 144 amostras foliares (1 amostra mista por espécie x 3 espécies x 2 horários x 8 dias x 3 fragmentos florestais).



Figura 3. Coleta das plantas na área de estudo (A), composição da amostragem mista (B) e armazenamento das amostras em nitrogênio líquido (C). Fotos cedidas por Carla Zuliani.

Tabela 2. Datas das campanhas de amostragem realizadas visando à caracterização sazonal.

Campanhas de amostragem	Período de amostragem	Clima predominante
1 ^a	06 a 09 de fevereiro 13 a 16 de fevereiro	Úmido 2012
2 ^a	23 a 26 de julho 30 de julho a 02 de agosto	Seco 2012
3 ^a	28 a 31 de janeiro 04 a 07 de fevereiro	Úmido 2013
4 ^a	08 a 08 de agosto 12 a 15 de agosto	Seco 2013

3.4.2 Caracterização do andamento diário

Para esta segunda etapa, as amostragens de folhas das duas espécies selecionadas foram realizadas durante 05 dias consecutivos e em 05 horários distintos (8h, 10h, 12h, 14h e 16h), nos períodos úmido (janeiro de 2014) e seco (julho de 2014) (Tabela 3). Em cada horário, mediram-se os parâmetros usuais associados às trocas gasosas (assimilação líquida de carbono, condutância estomática e transpiração) em folhas de ramos recém-destacados das árvores. Logo em seguida à medida da fotossíntese, coletaram-se e armazenaram-se as amostras de folhas para a análise de carboidratos, conforme descrito no item 3.4.1. As amostragens foram realizadas na mesma borda da Mata de Santa Genebra, de três indivíduos arbóreos de cada espécie, já coletados na primeira etapa. Nessa etapa, as amostras de cada árvore foram analisadas individualmente, totalizando 150 amostras em cada estação climática do ano (3 amostras individuais x 2 espécies x 5 horários x 5 dias).

Tabela 3. Datas das campanhas de amostragem realizadas visando à caracterização do andamento diário.

Campanha de amostragem	Período	Clima predominante
1 ^a	27 a 31 de janeiro	Úmido 2014
2 ^a	14 a 18 de julho	Seco 2014



Figura 3. Coleta das plantas na área de estudo FCA (A) e análise dos parâmetros fisiológicos realizados pelo MsC. Pedro Ivo Lembo Silveira de Assis (B). Fotos cedidas por Mauricio Akio.

3.5 Extração e Análise de Carboidratos

Preparo dos extratos para análise de carboidratos: As concentrações de carboidratos solúveis totais foram determinadas em extratos das amostras congeladas, provenientes das duas etapas experimentais (100mg), pulverizadas em nitrogênio líquido com etanol 80%. Os extratos foram mantidos em banho-maria sob 80°C por 30 minutos. Esse procedimento foi repetido 3 vezes (Dubois *et al.*, 1956).

Em sequência, parte de cada resíduo final resultante foi lavada com água destilada e liofilizada para as análises do teor de amido. A extração do amido nesses extratos liofilizados foi realizada pelo método enzimático. A uma alíquota de 10 mg desse extrato, foram adicionados 0,5 mL [120 U mL^{-1}] de alfa-amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (código E-ANAAM, MegazymeR) em tampão MOPS [ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico] 10 mM pH 6,5. A solução resultante foi incubada sob 75°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido novamente. Na sequência, as amostras, após resfriamento em 50°C, receberam 0,5 mL de uma solução contendo 30 U mL⁻¹ de amiloglucosidase (AMG) de *Aspergillus niger* (código E-AMGPV, MegazymeR) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. Essas soluções foram incubadas em 50°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Para interromper a reação enzimática e precipitar as proteínas, foram acrescentados 100 µL de ácido perclórico 0,8M. Esses extratos finais foram passados por rápida centrifugação (2 minutos a 10.000 g), para separação da fração sobrenadante.

O perfil de metabólitos primários das folhas das espécies coletadas, com ênfase em carboidratos foi determinado por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM). Para tanto, cerca de 20 mg de material foliar congelado foi liofilizado. A esse material adicionaram-se 500 µL de uma solução de clorofórmio:metanol:água, na proporção 12:5:1, acrescida de 50 µL de adonitol 0,2 mg mL⁻¹, (definido como padrão interno para auxiliar as normalizações durante a quantificação). Essa mistura foi incubada sob 60°C por 30 minutos sob agitação e centrifugada a 800 x *g* por 5 minutos, para separação da fração sobrenadante.

Procedimentos analíticos: Os carboidratos solúveis totais foram quantificados nos extratos de folhas a partir do método colorimétrico. Em uma alíquota de 10 µL do extrato não liofilizado foram adicionados 490 µL de água destilada, 500 µL de Fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. A absorbância dessa solução foi determinada em espectrofotômetro SP-22 Biospectro a (490 nm) (Dubois *et al.*, 1956). A dosagem do amido nos extratos finais foi efetuada pela quantificação da glicose liberada no processo de hidrólise enzimática. Para tanto, foram retiradas alíquotas de 20 µL de extrato enzimático, as quais foram adicionados 300 µL de reagente Glicose PAP Liquiform (Centerlab), contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase (GOD-POD), além de 4-aminoantipirina e fenol a pH 7,5. Após incubação por 15 minutos em 37°C, o teor de glicose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA em 490 nm. A curva padrão foi efetuada utilizando-se concentrações crescentes de glicose (Sigma Aldrich) (Amaral *et al.*, 2007).

O perfil de metabólitos primários, com ênfase em carboidratos, foi determinado por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas. Uma alíquota de 350 µL do sobrenadante dos extratos finais foi juntada a 350 µL de água destilada, seguindo-se nova agitação. Após centrifugação (800 x *g* por 5 minutos), 300 µL da fase polar foram coletados e evaporados a vácuo sob rotação. O material residual foi submetido à derivatização, acrescentando-se 150 µL de piridina, 50 µL de *N,O*-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL de hidrocloreto de metoxialmina e, em seguida, incubados sob agitação durante 1 hora em 75°C. As amostras foram injetadas em um sistema CG-EM composto por um cromatógrafo a gás Agilent GC 6890 series, acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo Agilent MSD 5973N (Agilent Technologies, USA). A separação cromatográfica foi realizada em coluna de 30 metros HP5 com espessura de 0,25 mm e filme de 0,25 µm (Supelco, Bellfonte, USA). A temperatura de injeção foi de 230°C, a interface a 250°C, e a fonte de íons ajustada para 200°C. Hélio foi

usado como gás de arraste a uma taxa de 1 mL min⁻¹. Os picos detectados foram comparados com padrões autênticos e com a Biblioteca do Espectro de Massas NIST 08 e confirmados através do cálculo do índice de Kovats (adaptado de Roessner *et al.*, 2001).

3.6 Extração e Análise de Compostos Fenólicos

Preparo de extratos para análise de compostos fenólicos: As amostras foliares congeladas (150 mg), provenientes apenas da primeira etapa experimental, foram trituradas em nitrogênio líquido, dissolvidas em metanol 80%, transferidas para tubos com tampa e colocadas em banho seco sob 70°C por 1h, com agitação regular. Uma alíquota de 10 ml de cada extrato foi filtrada e transferida para balão volumétrico de 25 ml para ajuste do volume final com metanol 80%, que foi utilizada para as análises descritas a seguir (adaptado de Watanabi e Furlan, 2011).

Procedimentos analíticos: A determinação das concentrações de flavonóides totais foi realizada em 500 µl do extrato, acrescidos de 500 µl de cloreto de alumínio 5%. A quantificação ocorreu em espectrofotômetro ($\lambda = 420$ nm) após 15 minutos de reação.

As concentrações de fenóis totais foram determinadas em 100 µl de extrato, acrescidos de 3,9 ml de água destilada, 250 µL do reagente Folin de Cicauteau (100%) e 750 µl de solução carbonato de sódio 30%. A quantificação ocorreu em espectrofotômetro ($\lambda = 760$ nm) após 2h de reação.

As concentrações de taninos condensados foram determinadas em solução preparada com 100 µL do extrato e 1,5 ml de butanol (0,7g/1L). A mistura foi homogeneizada, aquecida em 95°C por 1h, resfriada e a quantificação ocorreu em espectrofotômetro ($\lambda = 550$ nm).

As concentrações de taninos totais foram determinadas em 500 µl do extrato acrescidos de 1 ml da solução BSA (pH 5,0). Após 10 minutos, a mistura foi centrifugada (5.000 rpm, 10 minutos), o sobrenadante descartado e ao precipitado foram adicionados 2 ml da solução detergente SDS (5g/500ml). Após homogeneização, foi adicionado 500 µL de cloreto férrico (805g/500ml) que reagiu por 15 minutos e quantificado em espectrofotômetro ($\lambda = 520$ nm);

A composição dos compostos fenólicos foi determinada a partir dos extratos filtrados em membrana durapore 0,45U Millex e submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (LC1260 – Agilent Technologies) com detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

Foram injetados 3 μ L de cada amostra (4 mg/ml). Foi utilizada a coluna Zorbax Eclipse Plus C-18 (4,6 x 150 mm, 3,5 μ m - Agilent) e fase móvel composta por ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B). O gradiente de solventes utilizado durante as análises começou com 15% de B em A (0-20 minutos), aumentou de 15 para 100% de B em A (20-25 minutos), manteve-se isocrático durante 5 minutos, reduziu de 100 para 15% de B em A (30-32 minutos) e permaneceu isocrático por 3 minutos. O fluxo iniciou em 1,5 ml/min (0-25,1 minutos), diminuiu para 1,0 ml/min (25,2-26,9 minutos) e, por fim, retornou para 1,5 mL/min (27-35 minutos). Os fenilpropanoides foram monitorados em 280 nm, enquanto que os flavonoides em 352 nm. A quantificação de flavonoides e fenilpropanoides foi realizada utilizando curvas padrões de quercetina (3,0 μ g/ml a 120 μ g/ml) e luteolina (1,5 μ g/mL a 120 μ g/ml), respectivamente, analisados por HPLC nas mesmas condições descritas acima e os resultados foram expressos em porcentagem. A identificação dos constituintes foi determinada mediante comparação dos tempos de retenção (Tr) e dos espectros de UV dos constituintes presentes nas amostras com os padrões analisados sob as mesmas condições de análise descritas acima.

3.7 Caracterização do andamento diário das trocas gasosas

A assimilação líquida de carbono e condutância estomática foram mensuradas apenas na segunda etapa do estudo, a cada 2 horas (8, 10, 12, 14 e 16h), utilizando-se um analisador portátil de gases por infravermelho (LI-6400XT, LI-COR, UK), operado em condições ambientais de radiação fotossinteticamente ativa, umidade relativa do ar e temperatura, enquanto a concentração de CO₂ foi controlada em 390 ppm. Para a determinação dos dois parâmetros, o limbo foliar permaneceu na câmara foliar por dois minutos, para a aclimação às condições microclimáticas existentes dentro da mesma, sendo então registradas seis medidas com intervalo de 10 a 18 segundos por planta (n = 3 por espécie).

3.8. Caracterização das Condições Ambientais

Durante todos os dias e em todas as campanhas de amostragem de ambas as etapas de amostragem, foram tomados dados de temperatura e de umidade relativa do ar com termo-higrômetros dispostos em cada local de estudo. Ainda, dados de radiação solar global e de poluição atmosférica (ozônio, óxidos de nitrogênio e enxofre e material

particulado) foram obtidos nas estações de monitoramento da CETESB presentes na cidade de Paulínia e Americana. Além disso, também foram usados dados de precipitação cedidos pela refinaria de petróleo que demarca o centro da área de estudo. Para a caracterização das condições ambientais durante os períodos úmidos, foram considerados os dados dos meses de dezembro a março e para os períodos secos, os de junho a setembro.

3.9 Apresentação de Resultados e Análises Estatísticas

Os resultados de todas as coletas realizadas na primeira etapa experimental foram analisados estatisticamente utilizando-se software SIGMA PLOT 12. O teste de Shapiro-Wilks indicou não haver distribuição normal dos dados de medidas fisiológicas. Portanto, estes foram submetidos a análises de variância não-paramétrica (teste de Kruskal Wallis), seguidas de teste de comparações múltiplas (método de Dunn) para comparação entre as três espécies e entre os períodos seco e úmido da primeira etapa experimental.

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

Análises de Componentes Principais (ACP) foram realizadas, inicialmente, para comparar as características fisiológicas predominantes das três espécies arbóreas coletadas nos fragmentos florestais (incluindo carboidratos solúveis totais, amido, flavonoide, tanino condensado, tanino total e fenol total), durante os períodos úmidos e secos da primeira etapa experimental.

A ACP foi, também, aplicada para sintetizar as associações entre as variações sazonais nas concentrações de carboidratos e compostos fenólicos e nas condições ambientais (incluindo variáveis meteorológicas e poluentes aéreos; dados fornecidos pela CETESB). Essas análises foram realizadas com dados transformados em $\log_{10}$, com auxílio do software PCORD (versão 6). Ainda, análises de regressão múltipla foram aplicadas aos conjuntos de dados obtidos nos períodos úmidos e secos, a fim de verificar quanto da variabilidade nos teores foliares de metabólitos primários e secundários, em cada período

amostral, poderia ser prevista por variações em fatores ambientais (temperatura, umidade relativa, radiação global, precipitação e concentrações atmosféricas O₃, SO₂, NO₂ e MP₁₀). O método de análise multivariada adotado foi o *stepwise backward*, tomando cada metabólito como variável dependente e as variáveis ambientais como independentes. Cada análise foi iniciada com todas as variáveis independentes, sendo eliminadas, passo a passo, todas aquelas que não explicaram significativamente as oscilações nas concentrações do metabólito em questão.

Análises de regressão foram feitas entre os parâmetros fisiológicos (Asat e gs) e o conteúdo de carboidratos solúveis totais e amido medidos nas duas espécies de estudo no fragmento florestal de Campinas, com a finalidade de estabelecer curvas do tipo dose x resposta entre essas variáveis no decorrer dos dias de amostragem na segunda etapa experimental. Análises de correlação de Pearson foram, finalmente, realizadas para verificar se há relação significativa entre variações no conteúdo de carboidratos solúveis totais e amido foliares e oscilações horárias em fatores meteorológicos e concentrações de poluentes.

4. RESULTADOS

4.1. Variação Sazonal em Carboidratos e Compostos Fenólicos

4.1.1. Caracterização das condições ambientais

Na tabela 4, observa-se que as concentrações médias e máximas dos poluentes atmosféricos primários (SO_2 , NO_2 , MP_{10}), obtidas na estação de monitoramento da CETESB, instalada em Paulínia, foram maiores durante o período seco em relação ao úmido, em ambos os anos de estudo, com exceção do dióxido de enxofre, cujas concentrações variaram pouco entre os períodos do ano de 2013. Ao contrário, o O_3 tendeu a ocorrer em concentrações mais altas nos períodos úmidos, independentemente da forma como foi apresentado. Comparando-se os períodos de estudo, observou-se que, no período úmido de 2012 e seco de 2013, foram registrados valores mais elevados dos poluentes aéreos.

Tabela 4. Médias das concentrações diárias de dióxido de enxofre (SO_2 , $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e material particulado (MP_{10} , $\mu\text{g}/\text{m}^3$), das concentrações horárias de dióxido de nitrogênio (NO_2 , $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e ozônio (O_3 , $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e valor da exposição acumulada de ozônio (AOT_{40} , $\mu\text{g}/\text{m}^3$), nos períodos de amostragem, realizadas nas estações seca e úmida dos anos de 2012 e 2013 em Paulínia. Valores entre parênteses indicam, para dióxido de enxofre e material particulado, máxima média diária no período, para dióxido de nitrogênio e ozônio, máxima e mínima média horária de 1h e 24h.

Período	SO_2 (24h)	MP_{10} (24h)	NO_2 (1h)	O_3 (24h)	O_3 (10h)	AOT_{40}
Úmido 2012	3,8 (6,5)	19,7 (53,7)	21,7 (86,1)	57,3 (183)	83,7 (183)	4635,2
Seco 2012	7,1 (12,1)	43,3 (132)	35,6 (52,8)	42,1 (138)	52,1 (138)	923
Úmido 2013	5,4 (7,2)	17,9 (20,8)	14,1 (23,8)	44,2 (221)	77,8 (179)	3752,2
Seco 2013	6,8 (13,3)	47,3 (165)	40,4 (105)	50,2 (165)	70,2 (165)	1093,2

Os dados médios de temperatura e umidade relativa (tabela 5) mostraram pouca variação entre os anos de estudo e entre os períodos (seco e úmido) de um mesmo ano, ao contrário da precipitação e radiação solar. Como esperado, nas épocas úmidas, foram registrados maiores valores acumulados de precipitação e de médias diárias de radiação global, calculadas com base nos dados obtidos entre 07:00h e 17:00h em cada dia.

Tabela 5. Médias diárias de temperatura (° C), umidade relativa do ar (%) e radiação global (W/m²; calculadas a partir de valores entre 7:00 e 17:00h em cada dia) e volume acumulado de precipitação (mm) e seus respectivos valores horários máximos e mínimos (entre parêntesis), nos períodos de amostragem, realizadas nas estações seca e úmida dos anos de 2012 e 2013 em Paulínia.

Período	Temperatura	UR	Radiação Global	Precipitação
Úmido	24	69	220	
2012	(35-15)	(100-23)	(324-62)	562
Seco	21	62	172	
2012	(33-8)	(100-13)	(224-30)	111
Úmido	26	76	188	
2013	(35-18)	(100-33)	(293-65)	582
Seco	25	89	151	
2013	(34-20)	(99-37)	(240-15)	96

4.1.2. Caracterização da Variação Sazonal em Carboidratos e Compostos Fenólicos

Os dados referentes a cada fragmento florestal estudado na primeira etapa experimental foram comparados a fim de verificar diferenças espaciais, porém verificou-se não haver diferenças significativas entre eles, de modo que eles foram tomados como réplicas nas comparações mencionadas no parágrafo anterior. As concentrações dos carboidratos e dos compostos fenólicos nos dois horários de coleta diária em cada campanha de amostragem dessa primeira etapa experimental também não diferiram significativamente entre si. Desse modo, os valores horários, foram considerados para cálculo de médias diárias. Sendo assim, o efeito desses 2 fatores de variação (fragmentos florestais e horários de coleta diária) não será destacado neste item.

A concentração de carboidratos solúveis totais (Figura 4A) em *Piptadenia gonoacantha* foi mais reduzida do que nas demais espécies em ambos os períodos de amostragem de 2012 e 2013. Para *Astronium graveolens* e *Croton floribundus*, os níveis de carboidratos foram maiores nos períodos úmidos (verões de 2012 e 2013) do que nos períodos secos (invernos de 2012 e 2013). O conteúdo de carboidratos em folhas de *Piptadenia gonoacantha* foi apenas significativamente reduzido durante o período úmido de 2013, em relação às demais amostragens.

A concentração de amido (Figura 4B) em *Astronium graveolens* foi menor do que nas demais espécies em todas as amostragens, exceto no período seco de 2012. Em todos

os períodos, a concentração de amido foi significativamente maior em *Croton floribundus* do que nas duas outras espécies arbóreas, no caso das amostragens realizadas em 2013 e do que *P. gonoacantha*, no período úmido de 2012. Diferenças entre as épocas do ano não foram observadas para *A. graveolens*. Já para *C. floribundus* e *P. gonoacantha*, as plantas coletadas em 2013 mostraram maiores conteúdos de amido do que as coletadas em 2012.

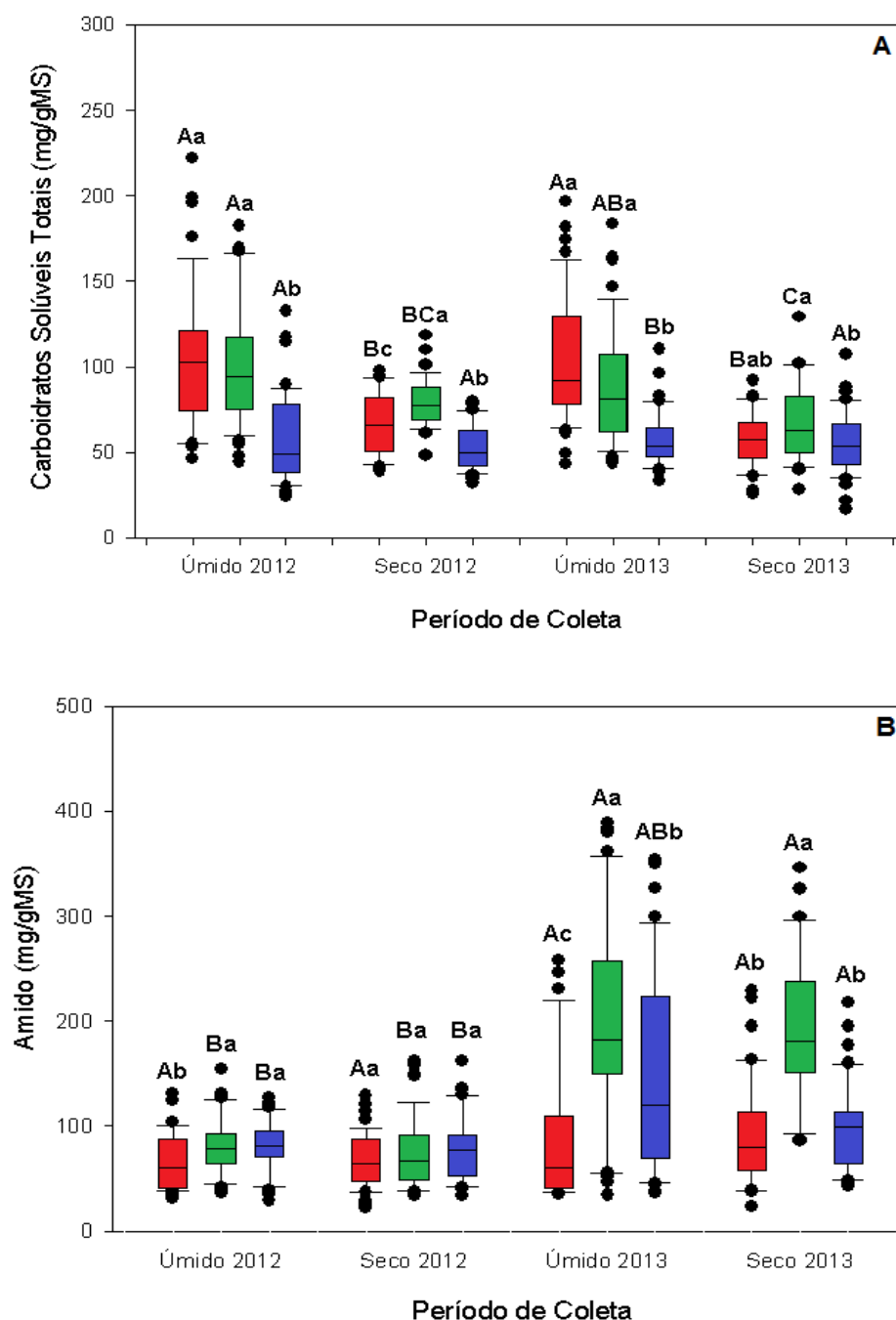


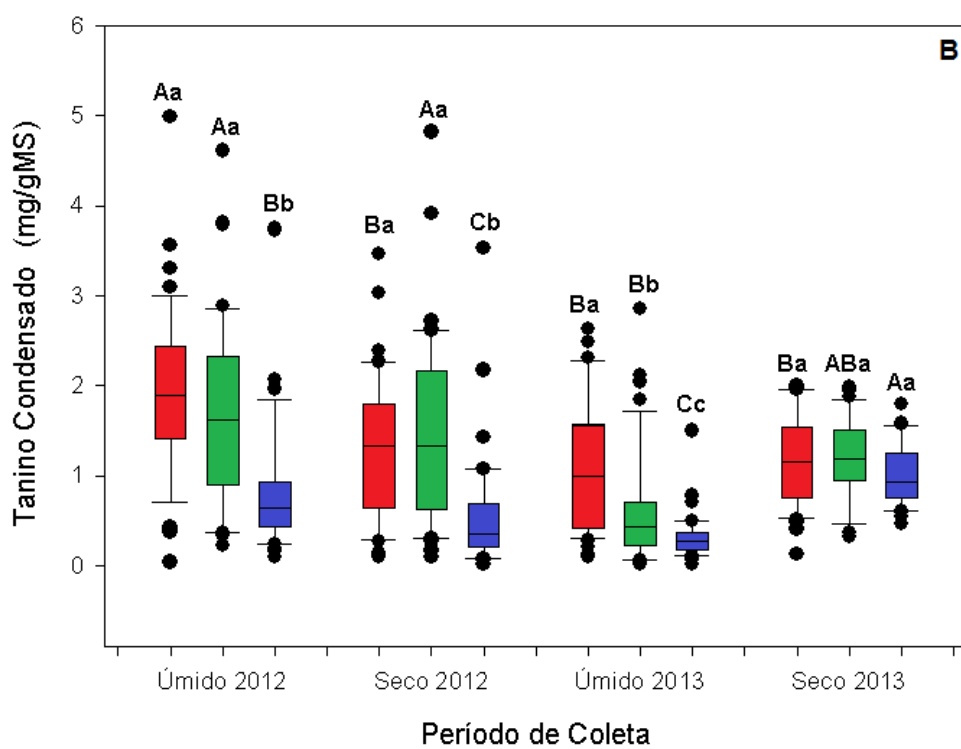
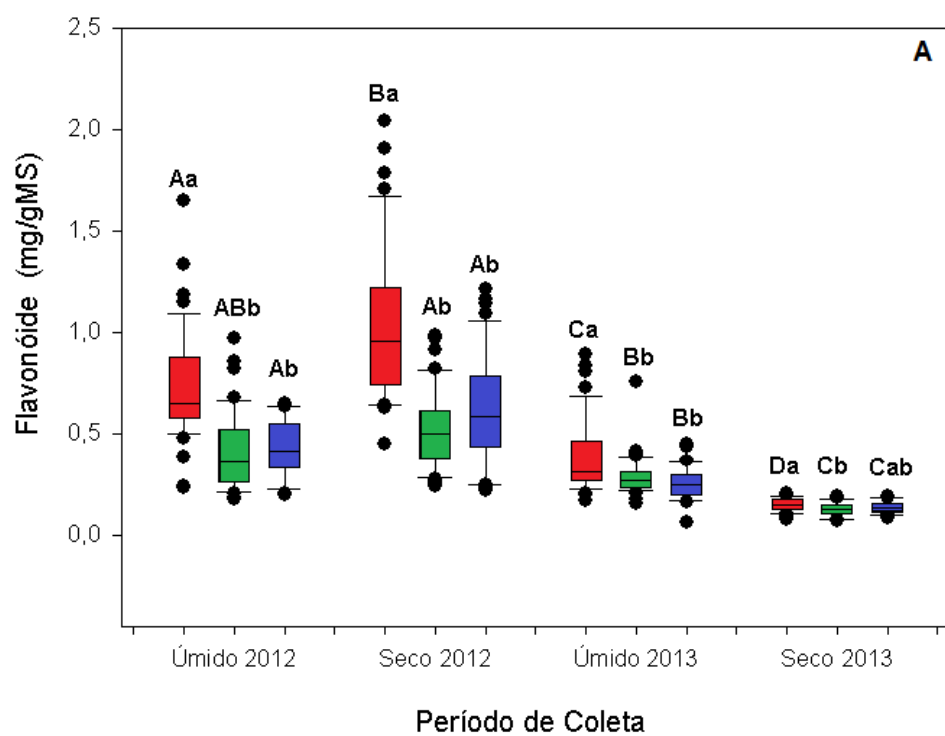
Figura 4. Variação sazonal no conteúdo de carboidratos solúveis totais (mg/gMS) - A e Amido (mg/gMS) - B, em plantas de *Astronium graveolens* (■), *Croton floribundus* (■), *Piptadenia gonoacantha* (■), amostradas nos diferentes fragmentos florestais durante os períodos úmido e seco de 2012 e 2013. Letras maiúsculas comparam dados obtidos em todas estações do ano para a mesma espécie; letras minúsculas comparam as espécies dentro da mesma estação. Letras iguais ausência de diferença estatística ao nível de significância de 5%.

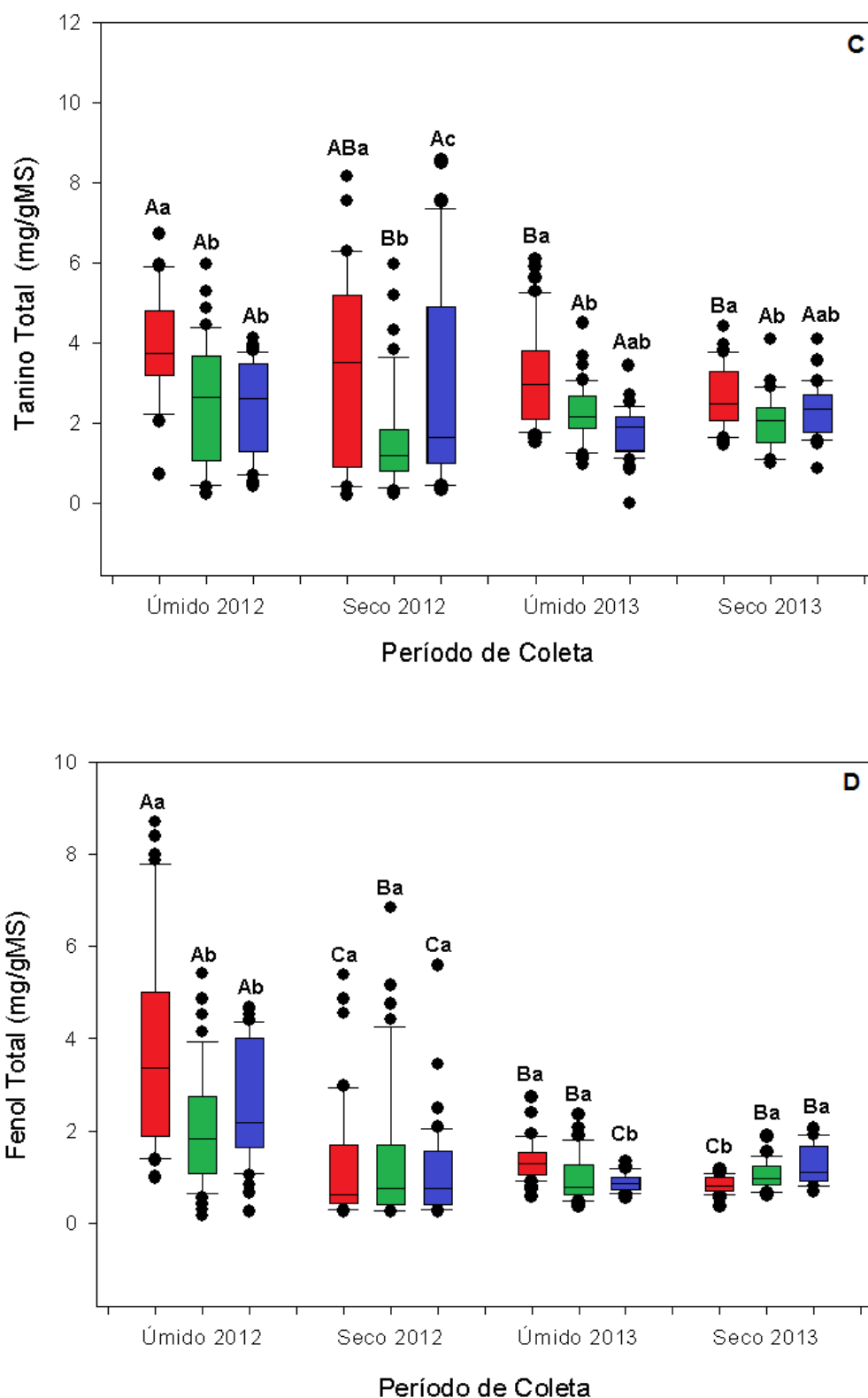
A concentração de flavonoides totais (Figura 5A) em *Astronium graveolens* foi mais elevada que nas demais espécies em todas as coletas, exceto no período seco de 2013, quando se assemelhou à de *P. gonoacantha*. Plantas de todas as espécies coletadas no período seco de 2013 mostraram conteúdos mais reduzidos de flavonoides. Além disso, as variações sazonais foram marcantes em *A. graveolens*. Para essa espécie, o conteúdo de flavonoides seguiu a seguinte ordem de grandeza: período seco/2012 > período úmido/2012 > período úmido/2013 > período seco/2013.

A concentração de taninos condensados (Figura 5B) em *Piptadenia gonoacantha* foi menor do que nas demais espécies, exceto durante o período seco de 2013, quando não houve diferenças significativas entre espécies. Nas folhas de *Astronium graveolens*, a concentração desses compostos foi mais elevada durante o período úmido de 2012, nas de *Croton floribundus*, em ambas as coletas de 2012 e nas de *Piptadenia gonoacantha*, no período seco de 2013.

Os níveis de taninos totais (figura 5C) foram mais elevados em *Astronium graveolens* na maioria das coletas do presente estudo. Nesta espécie, os teores de taninos totais foram mais elevados no período úmido de 2012 em comparação a ambos os períodos de 2013. Em *Croton floribundus*, menores teores de taninos foram verificados no período seco de 2012, enquanto em *Piptadenia gonoacantha* não foi observada variação sazonal.

Astronium graveolens também apresentou as maiores concentrações de fenóis totais (Figura 5D) em ambos os períodos de 2012 e as menores no período seco de 2013. Já durante o período seco de 2012, não houve diferenças significativas entre as espécies estudadas. Teores mais elevados de fenóis totais foram observados nos períodos úmidos (2012 e 2013), em comparação aos períodos secos (2012 e 2013). Para *C. floribundus* e *P. gonoacantha*, plantas coletadas no período úmido de 2012 mostraram maiores conteúdos daquele metabólito secundário do que nos demais períodos.





A figura 6 mostra o resultado da Análise de Componentes Principais (ACP) incluindo as variáveis fisiológicas (carboidratos solúveis totais, amido, flavonoides, taninos condensados, taninos totais e fenóis totais), comparando as 3 espécies coletadas nos três fragmentos florestais, durante os períodos secos. Esta análise resumiu 60% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação, sendo o primeiro eixo o que mais contribuiu para a análise (38%). Flavonoides e taninos totais foram as variáveis mais correlacionadas com o eixo 1 e carboidratos totais, amido e taninos condensados com o eixo 2. A ACP tendeu a mostrar uma separação entre as espécies: as unidades amostrais de *C. floribundus* tenderam a se posicionar no lado positivo dos eixos 1 e 2, em oposição às unidades amostrais de *A. graveolens* (localizadas no lado negativo do eixo 1. A maior parte das unidades amostrais de *P. gonoacantha* foi posicionada no lado negativo do eixo 2. Em relação às correlações com as variáveis fisiológicas, foi possível verificar que grande parte das unidades amostrais de *A. graveolens* ficou mais associada aos metabólitos secundários (taninos condensados, taninos totais e flavonoides), enquanto as unidades amostrais de *C. floribundus* foram caracterizadas principalmente por metabólitos primários (carboidratos totais e amido). Porém, não houve tendência clara quanto às características predominantes de *P. gonoacantha*.

A figura 7 mostra o resultado da Análise de Componentes Principais (ACP) incluindo as variáveis fisiológicas (carboidratos solúveis totais, amido, flavonoide, tanino condensado, tanino total e fenol total), comparando as 3 espécies arbóreas coletadas nos três fragmentos florestais, durante os períodos úmidos. Esta análise resumiu 52% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação, sendo o primeiro eixo o que mais contribuiu para a análise (33%). Flavonoides foi a variável mais correlacionada com o eixo 1 e carboidratos totais e taninos totais com o eixo 2. As unidades amostrais de *A. graveolens* foram alocadas no lado negativo do eixo 1 e foram caracterizadas por altos teores de todos os metabólitos, exceto amido. O inverso foi observado para as outras duas espécies, que foram caracterizadas principalmente por amido.

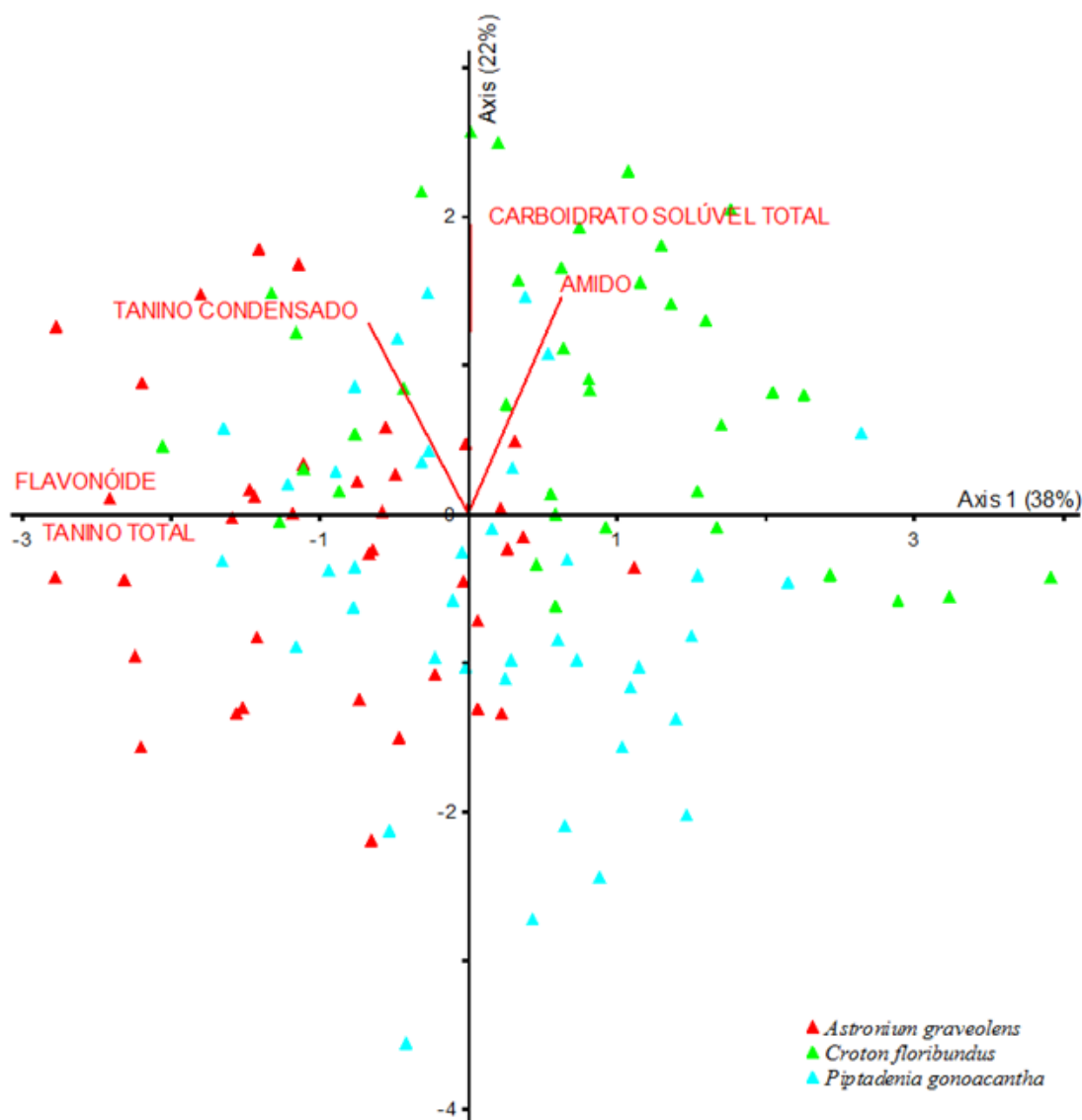


Figura 6. Representação gráfica da análise de componentes principais (ACP) realizada com as concentrações de carboidratos e compostos fenólicos determinados nas 3 espécies de estudo durante o período de amostragem nos períodos secos de 2012 e 2013.

Tabela 6. Scores das variáveis e a relação com os eixos 1 e 2.

	Carboidrato Solúvel Total	Amido	Fenol Total	Flavonoide	Tanino Condensado	Tanino Total
Eixo 1	0.0451	0.3251	0.3273	-0.6003	-0.3361	-0.5584
Eixo 2	0.6434	0.5559	-0.0739	0.0195	0.5208	-0.0022

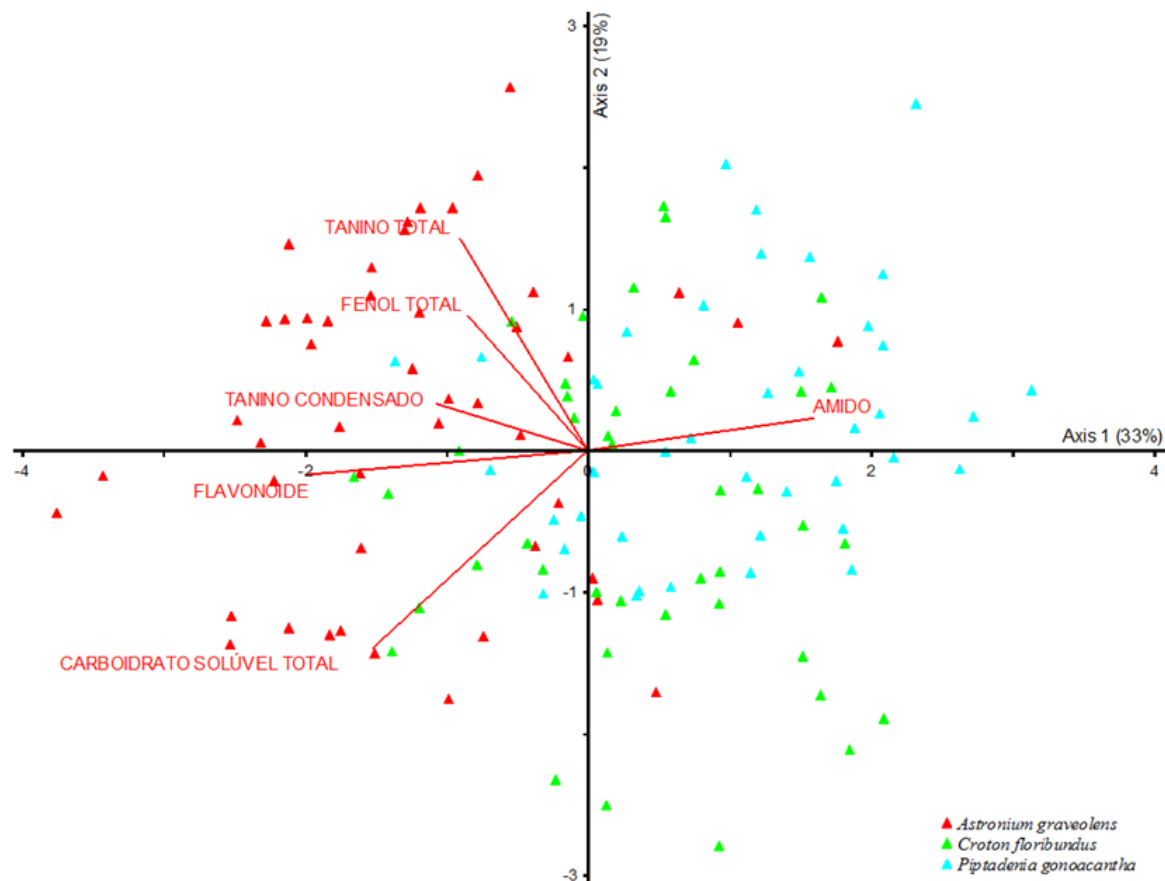


Figura 7. Representação gráfica da análise de componentes principais (ACP) realizada com as concentrações de carboidratos e compostos fenólicos determinados nas 3 espécies de estudo durante o período de amostragem nos períodos úmidos de 2012 e 2013.

Tabela 7. Scores das variáveis e a relação com os eixos 1 e 2.

	Carboidrato Solúvel Total	Amido	Fenol Total	Flavonoide	Tanino Condensado	Tanino Total
Eixo 1	-0.4374	0.4486	-0.3266	-0.5015	-0.3684	-0.3369
Eixo 2	-0.5523	0.2239	0.4559	-0.1958	0.2681	0.5717

A análise do perfil metabólico para compostos primários nas espécies incluídas neste estudo durante as estações úmida e seca dos anos de 2012 e 2013 permitiu a identificação de 10 compostos, sendo 9 carboidratos solúveis e 3 açúcares álcoois (polióis) (Tabela 8). *Astronium graveolens*, *Croton floribundus* e *Piptadenia gonoacantha* apresentaram em comum frutose, glicose, sacarose, galactose e glicopirranose. *A. graveolens* não apresentou nenhum poliol como composto majoritário, enquanto que *C. floribundus* apresentou sorbitol, manitol e treitol e *Piptadenia gonoacantha* apresentou o inositol.

Em relação à identificação qualitativa dos compostos fenólicos por CLAE, verificou-se que *Astronium graveolens* e *Croton floribundus* apresentaram em comum compostos derivados de quercetina, enquanto que *Piptadenia gonoacantha* apresentou fenilpropanóide em comum com *Croton floribundus* (Tabela 9).

Tabela 8. Compostos primários identificados por CG/EM nas espécies de estudo.

Espécie	Metabólitos	Classe
<i>Astronium graveolens</i>	Frutose Glicose Sacarose Galactose Fructofuranose Glicopirranose Sorbose Talose	Carboidratos
<i>Croton floribundus</i>	Frutose Glicose Sacarose Galactose Fructofuranose Glicopirranose Rafinose Manose Sorbose Talose	Carboidratos
	Sorbitol Manitol Treitol	Açúcares álcoois (polióis)
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	Frutose Glicose Sacarose Galactose Glicopirranose	Carboidratos
	Inositol	Açúcares álcoois (polióis)

Tabela 9. Compostos secundários identificados por CLAE nas espécies de estudo.

Espécie	Composto derivado
<i>Astronium graveolens</i>	Quercetina
<i>Croton floribundus</i>	Quercetina Campferol Fenilpropanóide
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	Apigenina Luteolina Fenilpropanóide

4.1.3. Relações entre variações no conteúdo de carboidratos e compostos fenólicos e nas condições ambientais

A figura 8 mostra o resultado da Análise de Componentes Principais (ACP) incluindo as variáveis fisiológicas analisadas nas três espécies arbóreas (carboidratos solúveis totais, amido, flavonoides, taninos condensados, taninos totais e fenóis totais) e as variáveis ambientais (umidade relativa, temperatura, radiação global, O₃, SO₂, MP₁₀, NO₂), durante os períodos úmidos e secos. Esta análise resumiu 61% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação, sendo o primeiro eixo o que mais contribuiu para resumir a variabilidade (49%). Os poluentes atmosféricos (O₃, MP₁₀), temperatura e fenol total foram as variáveis mais correlacionadas com o eixo 1 e flavonoides, carboidratos totais, taninos totais e taninos condensados com o eixo 2. A ACP revelou uma separação evidente das unidades amostrais em relação aos períodos úmido e seco. Foi possível verificar que as unidades amostrais dos períodos úmidos ficaram relacionadas com altos teores de taninos totais e condensados, fenóis totais, carboidratos solúveis totais, temperatura e com a concentração de ozônio, enquanto que as unidades amostrais do período seco ficaram relacionadas com as concentrações dos poluentes atmosféricos NO₂, MP₁₀ e com o teor de flavonóides.



Figura 8. Representação gráfica da análise de componentes principais (ACP) realizada com variáveis fisiológicas e ambientais durante o período de amostragem nos períodos úmidos de 2012 e 2013.

Tabela 10. Scores das variáveis e a relação com os eixos 1 e 2.

Composto	Eixo 1	Eixo 2
Carboidrato Solúvel Total	0.3451	0.4757
Amido	-0.2292	-0.2397
Fenol Total	0.4520	0.3728
Flavonóide	-0.4247	0.5416
Tanino Condensado	0.1143	0.7053
Tanino Total	0.0422	0.5090
Temperatura (°C)	0.7434	-0.0681
Umidade (UR%)	0.0842	-0.2049
Radiação	0.3891	-0.1298
O₃	0.7108	-0.2165
NO₂	-0.7415	0.0393
MP₁₀	-0.7029	-0.0594

Nas tabelas 11 e 12, foram sintetizados os resultados das análises multivariadas para os períodos úmidos e secos, respectivamente, realizadas com o intuito de identificar quais variáveis abióticas explicariam significativamente o perfil temporal dos parâmetros fisiológicos nas 3 espécies de estudo. Modelos multilineares foram significativos apenas para os metabólitos primários (carboidratos solúveis totais e amido) e para flavonoides em ambos os períodos. Em geral, as análises multivariadas indicaram que os perfis desses indicadores fisiológicos foram explicados de forma combinada por variações nas condições climáticas e/ou nos níveis de contaminação atmosférica por poluentes gasosos e particulados. Todos os modelos propostos foram altamente explicativos ($p < 0,001$), apesar dos valores de R^2 terem sido baixos, o que era esperado em função do grande número de resultados incluídos nas análises. Os modelos propostos tenderam a ser mais explicativos para os metabólitos primários ($R^2 > 0,40$).

Nos períodos úmidos (tabela 11), os modelos multilineares mostraram que os dados fisiológicos tenderam a relacionar-se positivamente com os dados meteorológicos (especialmente radiação) e negativamente com os dados de poluição aérea (principalmente ozônio e material particulado). Exceção foi encontrada para o amido em *C. floribundus*, que mostrou correlação positiva com o material particulado e negativa com a temperatura. Em relação aos períodos secos (tabela 12), foi possível verificar que as correlações entre os dados foram mais variáveis. Os teores de carboidratos estiveram positivamente relacionados com a umidade relativa e o ozônio em *A. graveolens* e com a radiação em *P. gonoacantha* e negativamente relacionados com o dióxido de nitrogênio em *C. floribundus* e com a umidade relativa em *P. gonoacantha*. A relação entre os teores de amido e o ozônio foi negativa em *A. graveolens* e *P. gonoacantha*, assim como a encontrada para o

NO₂ em *C. floribundus*. Já relações positivas foram observadas entre o amido, a radiação e a umidade em *C. floribundus* e *P. gonoacantha*, e com o material particulado em *C. floribundus*. Para os flavonoides, a única relação encontrada foi aquela com o ozônio em *A. graveolens*.

Tabela 11: Resultado das análises lineares multivariadas entre as variações nos parâmetros fisiológicos em plantas de *A. graveolens*, *C. floribundus* e *P. gonoacantha* e em variáveis ambientais monitoradas na RMC durante o período úmido.

Espécie	Variáveis Independentes	R ²
<i>Astronium graveolens</i>	Carboidratos = Rad (+); UR (+); O ₃ (-)	0,50
	Amido = O ₃ (-); NO ₂ (-)	0,27
	Flavonóides = Rad (+); O ₃ (-)	0,11
<i>Croton floribundus</i>	Carboidratos = UR (+); Rad (+); O ₃ (-)	0,43
	Amido (log ¹⁰) = T (-); Rad (+); NO ₂ (-); MP ₁₀ (+)	0,26
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	Carboidratos (log ¹⁰) = Rad (+); NO ₂ (-); O ₃ (-)	0,19
	Flavonóides (log ¹⁰) = Rad (+); NO ₂ (-); MP ₁₀ (-)	0,37

*(Rad: radiação solar global; UR: umidade relativa; O₃: ozônio; NO₂: dióxido de nitrogênio; MP₁₀: material particulado).

Tabela 12: Resultado das análises lineares multivariadas entre as variações nos parâmetros fisiológicos em plantas de *A. graveolens*, *C. floribundus* e *P. gonoacantha* e em variáveis ambientais monitoradas na RMC durante o período seco.

Espécie	Variáveis Independentes	R ²
<i>Astronium graveolens</i>	Carboidratos = UR (+); O ₃ (+)	0,41
	Amido = O ₃ (-)	0,32
	Flavonóides = O ₃ (-)	0,13
<i>Croton floribundus</i>	Carboidratos = NO ₂ (-)	0,25
	Amido = UR (+); Rad (+); NO ₂ (-); MP ₁₀ (+)	0,55
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	Carboidratos = Rad (+); UR (-)	0,15
	Amido = Rad (+); UR(+); O ₃ (-)	0,36

*(Rad: radiação solar global; UR: umidade relativa; O₃: ozônio; NO₂: dióxido de nitrogênio; MP₁₀: material particulado).

4.2. Variação Diária na Fotossíntese e em Carboidratos

4.2.1. Caracterização das Condições Ambientais

Na tabela 13, observa-se que as concentrações médias e máximas dos poluentes atmosféricos primários (SO_2 , NO_2 , MP_{10}), monitorados pela estação da CETESB em Paulínia, foram maiores durante a estação seca em relação à estação úmida.

O_3 , ao contrário, no período de 24 horas e para o período de 10h (período de luz) tendeu a ocorrer em concentrações mais altas na estação úmida do que na estação seca, o mesmo ocorreu com a exposição acumulada de ozônio (AOT) que foi mais alta durante estação úmida.

Os fatores climáticos (tabela 14), que mais variaram entre as estações do ano foram a radiação global, a precipitação e a umidade relativa, destacando-se a época úmida, quando os valores de radiação e umidade foram mais elevados e maior volume de chuva foi registrado. As médias de temperatura foram semelhantes, com poucas variações entre as estações climáticas do ano.

Tabela 13. Médias das concentrações diárias de dióxido de enxofre (SO_2 , $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e material particulado (MP_{10} , $\mu\text{g}/\text{m}^3$), das concentrações horárias de dióxido de nitrogênio (NO_2 , $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e ozônio (O_3 , $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e valor da exposição acumulada de ozônio (AOT40, $\mu\text{g}/\text{m}^3$), no período de amostragem, realizadas nas estações seca e úmida do ano de 2014 na região Metropolitana de Campinas. Valores entre parênteses indicam, para dióxido de enxofre e material particulado, máxima média diária no período, para dióxido de nitrogênio e ozônio, máxima e mínima média horária de 1h e 24h.

Estação	SO_2 (24h)	MP_{10} (24h)	NO_2 (1h)	O_3 (1h)	O_3 (10h)	AOT ₄₀
Úmida	6,10	27,9	17,5	61,6	70,1	5034,6
2014	(122)	(301)	(88)	(181-5)	(163-5)	
Seca	-	38,4	29,5	33,4	48,8	
2014		(348)	(117)	(165)	(165-0)	2472,6

(-): Dados não disponíveis.

Tabela 14. Médias diárias de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%), volume acumulado de precipitação (mm) e médias de 10 h (7:00 às 17 h) de radiação global (W/m²), e seus respectivos valores horários máximos e mínimos (entre parêntesis), no período de amostragem, realizadas nas estações seca e úmida do ano de 2014 na região Metropolitana de Campinas.

Estação	Temperatura	UR	Precipitação	Radiação Global
Úmida	24	91		234
2014	(29-19)	(99-59)	232	(284-145)
Seca	21	60		132
2014	(31-11)	(99-21)	102	(174-15)

O perfil diário das condições climáticas e de poluição atmosférica monitorado durante a tomada de dados fisiológicos horários nas árvores do Fragmento de Campinas (FCA), no período úmido de 2014, é apresentado na Figura 9A. É possível verificar que a temperatura foi o fator climático de menor variação ao longo do dia, que o ozônio esteve mais concentrado entre 10h e 14h, enquanto que a concentração de MP₁₀ variou mais entre 12h e 14h. Observou-se maior variação da umidade relativa no período da manhã.

Na figura 10B, podem-se notar menores variações horárias na temperatura, ao longo dos dias de amostragem no período seco. Verifica-se, também, que os poluentes atmosféricos variaram ao longo do dia. Ozônio apresentou valores mais elevados às 10h e 14h, e o MP₁₀ às 12h e 14h, é possível notar ainda a aumento da umidade relativa e redução da radiação global às 12h.

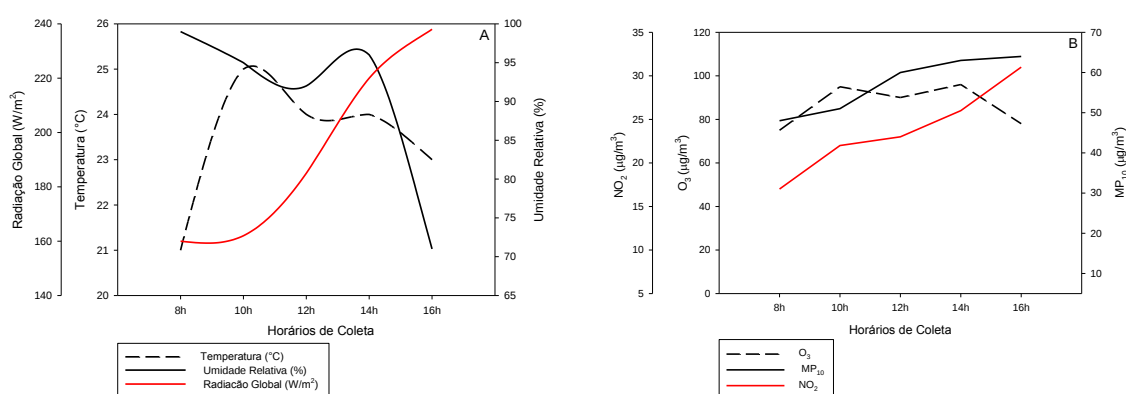


Figura 9. Perfil diário de temperatura (° C), umidade relativa do ar (%), radiação solar global (W/m²) (A), e das concentrações horárias de material particulado (MP₁₀, µg/m³), dióxido de nitrogênio (NO₂, µg/m³) e ozônio (O₃, µg/m³) (B) na região Metropolitana de Campinas no período de amostragem durante o período úmido de 2014.

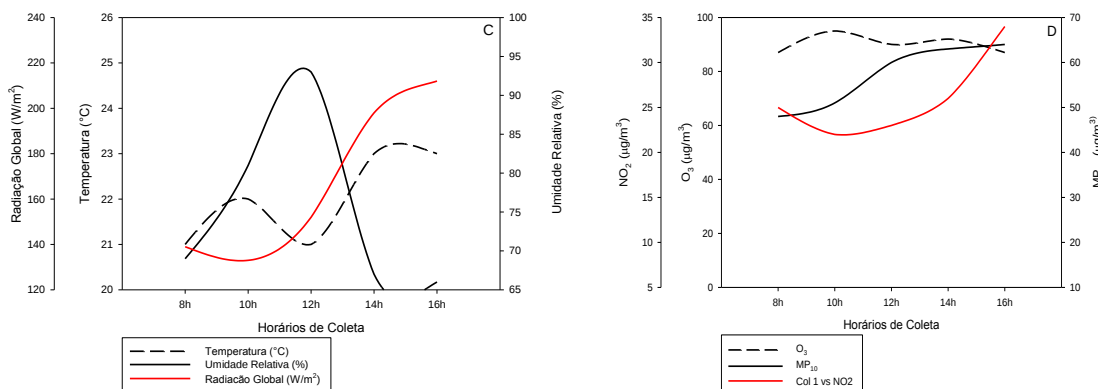


Figura 10. Perfil diário de temperatura ($^{\circ}$ C), umidade relativa do ar (%), radiação solar global (W/m^2) (C), e das concentrações horárias de material particulado (MP_{10} , $\mu\text{g}/\text{m}^3$), dióxido de nitrogênio (NO_2 , $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e ozônio (O_3 , $\mu\text{g}/\text{m}^3$) (D) na região Metropolitana de Campinas no período de amostragem durante o seco de 2014.

4.2.2. Caracterização da variação diária na fotossíntese e nos níveis de carboidratos

Nas duas espécies incluídas nessa segunda etapa do estudo, houve queda na condutância estomática e na assimilação líquida de carbono ao longo do dia, tendendo a coincidir com a queda nos teores de açúcar total exceto em *C. floribundus* na estação úmida, quando os níveis de açúcar total tenderam a aumentar após as 8h. Em *A. graveolens* (Figura 11), uma queda brusca na taxa fotossintética e na condutância estomática ocorreu após as 15h no período úmido, e após as 12h no seco. O mesmo perfil foi observado para *C. floribundus* (Figura 12) em relação à Asat, enquanto que a condutância estomática tendeu a ser decrescente ao longo do dia. É interessante notar que em ambas as espécies, a concentração de açúcar inicial (8h) foi maior na estação úmida do que na seca, enquanto que a concentração final não ultrapassou 20 mg/gMS em *A. graveolens* e de 35 mg/gMS em *C. floribundus* em ambos os períodos. Esta espécie apresentou maiores taxas fotossintéticas e de condutância estomática em ambas as estações do ano quando comparadas às medidas em árvores de *A. graveolens*.

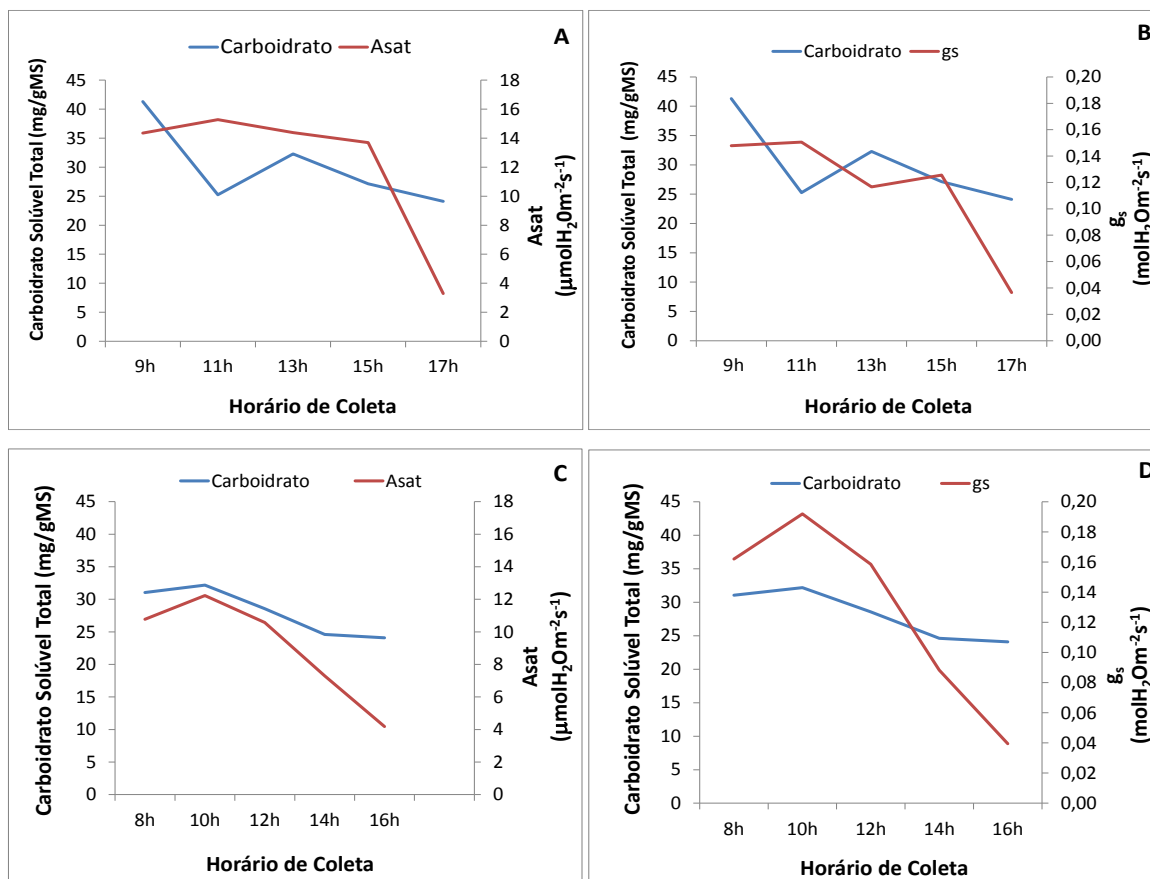


Figura 11. Relação entre teor de Açúcares Solúveis Totais (mg/gMS) e assimilação líquida de carbono (Asat - $\mu\text{molH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e condutância estomática (gs - $\text{molH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em *Astronium graveolens* no ano de 2014. A, B = período úmido; C, D = período seco.

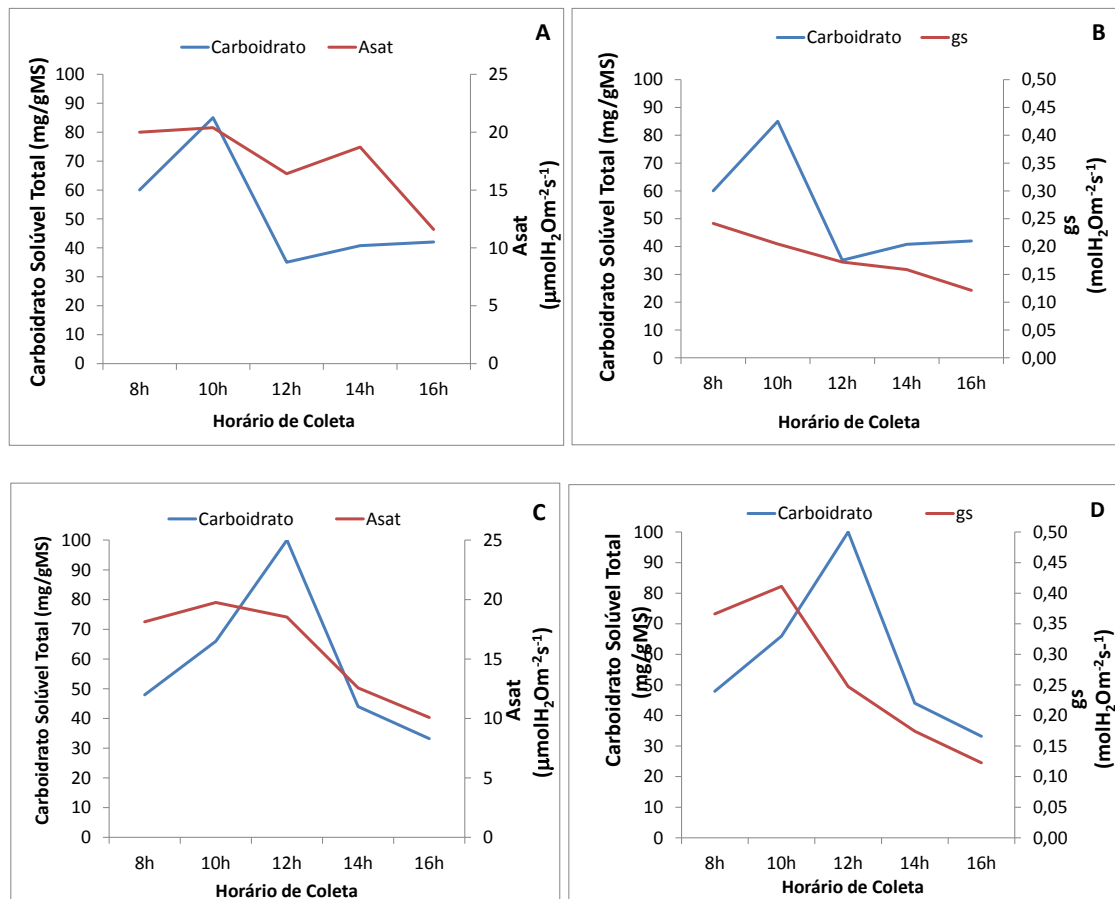


Figura 12. Relação entre teor de Açúcares Solúveis Totais (mg/gMS) e assimilação líquida de carbono (Asat - $\mu\text{molH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e condutância estomática (gs - $\text{molH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em *Croton floribundus* no ano de 2014. A, B = período úmido; C, D = período seco.

Nas figuras 13 e 14, são apresentados gráficos de regressão entre as concentrações de carboidratos ou amido e taxas de assimilação líquida de carbono, medidas em árvores de *A. graveolens* e *C. floribundus* localizadas no fragmento florestal da ARIE Mata de Santa Genebra, ao longo dos dias de amostragem nos períodos seco e úmido. As linhas de tendência incluídas nos gráficos foram mais bem ajustadas pelo modelo polinomial de segunda ordem, sendo todas altamente significativas ($p \leq 0,005$). Os coeficientes de determinação (R^2) variaram entre 0,80 (carboidratos solúveis x Asat no período úmido) a 0,28 (amido x Asat no período seco), para *A. graveolens* (Figura 13) e entre 0,79 (carboidratos solúveis x Asat no período seco) a 0,43 (amido x Asat no período úmido), para *C. floribundus* (Figura 14)

Para as árvores de *A. graveolens* monitoradas nos períodos úmidos e secos, o conteúdo de açúcares solúveis totais aumentou na medida em que houve aumento nas taxas fotossintéticas. No entanto, o aumento dos teores de açúcares tendeu a ser menor a partir

de $10 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de Asat, durante ambos os períodos de tomada de dados (Figura 13 A, C). Tendências opostas foram observadas em relação ao teor de amido (Figura 13 B, D).

Para *C. floribundus*, o conteúdo de açúcares solúveis totais no período úmido também tendeu a aumentar na medida em que a taxa de assimilação líquida de carbono foi mais alta durante o período úmido, verificando apenas uma leve inflexão da curva a partir de $\text{Asat} = 20 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 14A). Já no período seco, o aumento da concentração de açúcares solúveis tendeu a ser mais acentuado a partir de $\text{Asat} = 15 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 14 C). O teor de amido, em ambos os períodos, tendeu a aumentar na medida em que a taxa de assimilação líquida de carbono foi mais alta durante o período úmido, verificando inflexão da curva a partir de $\text{Asat} = 15 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 13B, D).

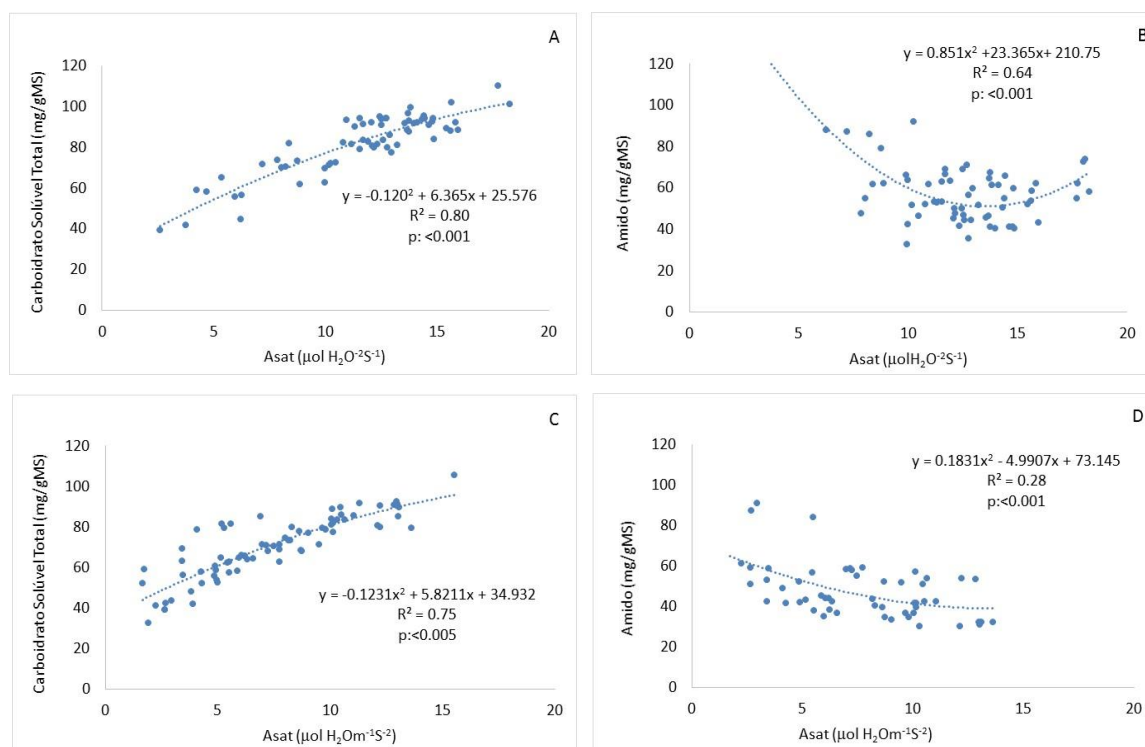


Figura 13. Regressão polinomial entre os teores de carboidratos solúveis totais (A-período úmido; C – período seco) ou amido (B – período úmido; D - período seco) – e taxa de assimilação líquida de carbono (Asat) em árvores de *Astronium graveolens* localizadas no fragmento florestal da ARIE na Mata de Santa Genebra.

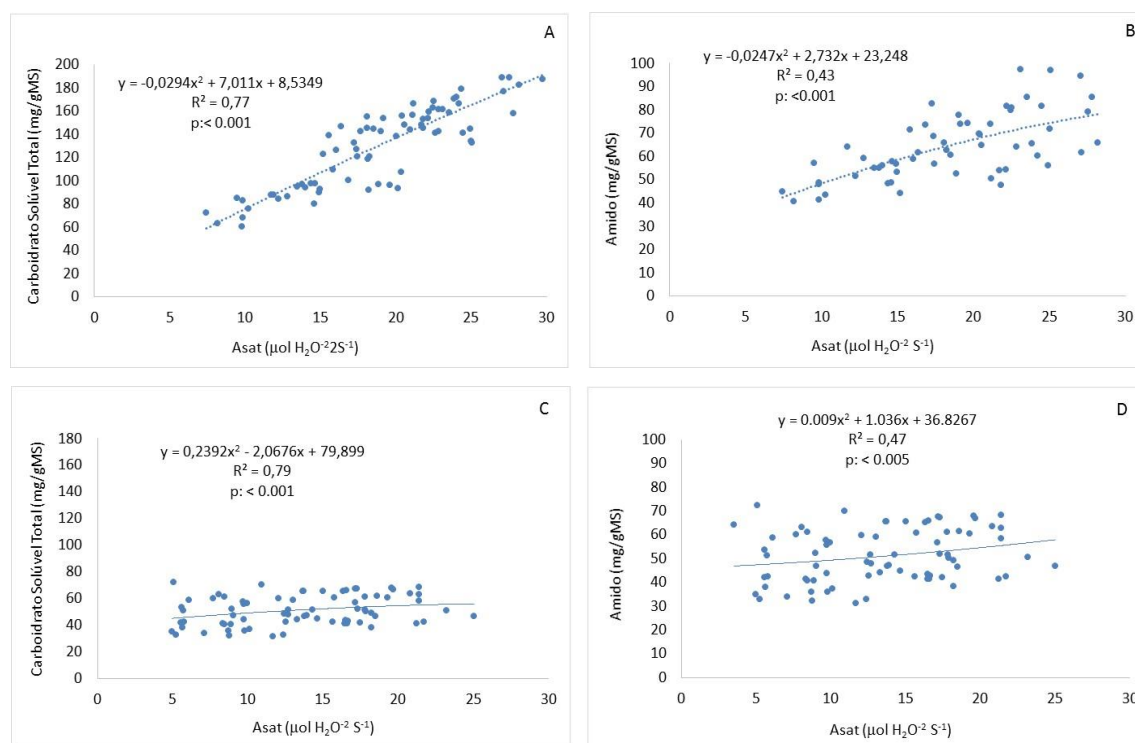


Figura 14. Regressão polinomial entre os teores de carboidratos solúveis totais (A-período úmido; C – período seco) ou amido (B – período úmido; D - período seco) – e taxa de assimilação líquida de carbono (Asat) em árvores de *Croton floribundus* localizadas no fragmento florestal da ARIE na Mata de Santa Genebra.

Foram também realizadas correlações de Pearson entre o teor de carboidratos e amido em folhas de *Astronium graveolens* e *Croton floribundus* e os parâmetros climáticos durante os períodos úmido e seco (Tabela 15). Correlações positivas foram comprovadas entre os teores de metabólitos primários e parâmetros da fotossíntese (Asat e g_s), para ambas as espécies amostradas nos dois períodos experimentais. Além disso, houve correlação positiva significativa entre umidade relativa e concentrações de carboidratos e de amido nas folhas de *A. graveolens* coletadas nos períodos úmido e seco respectivamente. Correlação negativa foi também comprovada na mesma espécie entre o conteúdo foliar de carboidratos e O_3 e entre amido e temperatura do ar, no período úmido e entre níveis foliares de carboidratos e amido e as concentrações de NO_2 no período seco. Para *C. floribundus*, não foi encontrada correlação significativa entre variações em carboidratos e nas condições ambientais ao longo dos dias de amostragem.

Tabela 15. Coeficientes de correlação (r) entre os teores de carboidratos solúveis totais (referidos como carboidratos) ou amido determinados em árvores de *Astronium graveolens* e *Croton floribundus*, e respectivas taxas de assimilação líquida de carbono (Asat) e condutância estomática (gs), temperatura do ar (T), radiação global (Rad) e umidade relativa (UR), ozônio (O₃) e dióxido de nitrogênio (NO₂) durante os dias de amostragem realizada nos períodos úmido e seco de 2014. Valores de r em negrito indicam correlações significativas (p < 0,05).

Espécie	Período	Metabólito	Asat	g_s	T	Rad	UR	O₃	NO₂
<i>A. graveolens</i>	Úmido	Carboidrato	0,79	0,64	0,19	-0,19	0,11	-0,10	-0,06
		Amido	0,041	0,13	-0,16	0,046	0,29	-0,08	-0,06
	Seco	Carboidrato	0,717	0,49	0,17	0,49	-0,54	-0,01	-0,38
		Amido	0,38	0,17	0,33	0,13	0,55	-0,11	-0,37
<i>C. floribundus</i>	Úmido	Carboidrato	0,68	0,52	0,33	-0,33	0,18	0,12	0,13
		Amido	-0,47	0,06	0,24	-0,24	0,05	0,08	0,06
	Seco	Carboidrato	0,84	0,88	0,19	0,14	0,21	-0,10	-0,07
		Amido	-0,41	0,53	0,11	0,16	0,29	-0,08	-0,07

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que o estresse oxidativo se dá pela formação de EROS, que ocorrem naturalmente nas plantas, à medida que a cadeia transportadora de elétrons opera em um ambiente aeróbico (Rezende, 2013).

Entretanto, a formação das EROs pode ser intensificada através do contato da planta com poluentes como o ozônio, que iniciam uma cadeia de eventos oxidativos em cascata, alterando organelas e células (Pellinen *et al.*, 1999). Essa intensificação da formação de EROs, assim, pode ocorrer em plantas que vivem em regiões poluídas, como a abrangida neste estudo, onde são encontradas áreas urbanas, regiões industriais de diversos segmentos e uma diversificada atividade agrícola. Essa região, além de ser afetada por poluentes emitidos por essas fontes locais, também está exposta a poluentes oriundos da região metropolitana de São Paulo, devido ao transporte aéreo, como relatam em relação ao ozônio Boian e Andrade (2012).

Porém, essa cadeia de eventos decorrentes do estresse oxidativo poderá ser minimizada nos organismos vegetais, por substâncias antioxidantes (Monaghan *et al.*, 2009). Substâncias fenólicas, por exemplo, podem atuar contra as EROS e auxiliar na defesa antioxidativa em plantas. Seus efeitos protetores se devem à capacidade de transferir elétrons para radicais livres, ativar enzimas antioxidantes (Takahama e Oniki, 1992; Ferrali *et al.*, 1997 *apud* Rezende, 2013) e absorver a radiação solar nas camadas epidérmicas dos tecidos vegetais (Gobbo-Neto, 2007).

Sousa e colaboradores (2007) ressaltam, ainda, que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos são devidas à estrutura química e propriedade redutora dos mesmos, sendo estas características importantes no sequestro ou neutralização dos radicais livres, bem como na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na de propagação do processo oxidativo.

Durante todo o período experimental foi observada na RMC a presença de ozônio, em maiores concentrações durante a estação úmida (verão), assim como foram constatados os maiores valores de temperatura, radiação e precipitação. Coincidentemente, as concentrações de compostos fenólicos, como flavonoides totais, taninos condensados, taninos totais e fenóis totais foram alteradas durante o período úmido, principalmente em *Astronium graveolens* e *Croton floribundus*, em relação às concentrações obtidas no período seco.

Além disso, análises de regressão multilinear aplicadas ao conjunto de dados obtidos nos períodos úmidos indicaram interferências opostas da radiação solar e de poluentes atmosféricos nos níveis de flavonoides em folhas de *A. graveolens* e *P. gonoacantha*. Enquanto aumentos na intensidade de radiação solar levaram a aumento dos níveis de flavonoides, concentrações mais altas de poluentes (O_3 , no caso de *A. graveolens* e NO_2 e MP_{10} no de *P. gonoacantha*) resultaram na redução do conteúdo foliar desse composto fenólico. Desse modo, essas associações encontradas no presente estudo poderiam ser interpretadas como uma estratégia de adaptação ao esse estresse oxidativo pelas espécies de estudo.

Segundo Close e Mcarthur (2002), o acúmulo de flavonoides já foi verificado em tricomas. Os autores citam ainda que este acúmulo se dá pela função de absorção de raios UV-B e pela atuação anti-herbivoria.

Ainda, segundo Tattini e colaboradores (2004), foi possível verificar um aumento no teor de flavonoides em folhas de *Ligustrum vulgare* expostas ao sol, em comparação ao conteúdo desse composto em plantas expostas à sombra. Efeito similar foi verificado em árvores de *A. graveolens* coletadas durante os períodos úmidos de 2012 e 2013. Os teores foliares de flavonoides em árvores amostradas no período úmido de 2012 foram comparativamente mais baixos do que os obtidos nas árvores amostradas no período úmido de 2013, fato que poderia ser explicado pela diferença no nível de exposição destas à radiação solar. As árvores incluídas na amostragem realizada em 2012 foram expostas, em média, a 22% menos intensidade de radiação solar do que as amostradas no mesmo período em 2013.

Em relação à composição de compostos fenólicos, foi possível verificar que *A. graveolens* e *C. floribundus* apresentam flavonóis, derivados de quercetina e campferol, que apresentam caráter antioxidante mais eficaz. Ainda, dentre os flavonóis, a quercetina e seus derivados são considerados os compostos mais antioxidantes, corroborando os resultados encontrados por Sá e colaboradores (2012), que observaram maior atividade antioxidante para a quercetina em extratos de *Selaginella convoluta*.

P. gonoacantha, por sua vez, apresenta exclusivamente flavonas, que são derivados de apigenina e luteolina, que estão entre as classes de flavonoides mais comuns, porém são antioxidantes menos eficazes, segundo Reisch (2002).

Ainda, alguns autores relacionam a diminuição dos teores de compostos fenólicos à influência da poluição sobre o metabolismo de açúcares, pois praticamente todos os compostos fenólicos são formados pela via do ácido chiquímico e da fenilalanina, ambos

derivados do metabolismo de açúcares. Esses metabólitos primários podem ser afetados pela poluição através da diminuição da assimilação de carbono (Herrmann, 1995), o que poderia explicar os valores reduzidos dos compostos fenólicos em *Piptadenia gonoacantha* em comparação as demais espécies. Ainda nesta linha, é plausível explicar a redução flavonoides e carboidratos, por exemplo, durante o período seco, época em que há maior concentração de SO₂, MP₁₀ e NO₂. Segundo Katoh e colaboradores (1989), poluentes como SO₂ causaram uma redução nos níveis de glicose, alterando o metabolismo do ácido chiquímico e reduzindo os teores de taninos em *Cryptomeria japonica*.

Há consenso na literatura, também, que os diversos estresses ambientais além daqueles decorrentes da poluição atmosférica podem levar à redução de compostos do metabolismo secundário das plantas (Knight e Knight, 2001). Foi possível notar que o excesso de luz e estresse hídrico afeta significativamente o metabolismo primário (Balakumar *et al.*, 1993), desta forma, afetando a quantidade de carbono disponível para a síntese de metabólitos secundários (Panuelas e Estiarte *et al.*, 1998; Jifon e Syvertsen, 2003).

Carboidratos solúveis são fontes importantes de energia para todos os organismos vivos. As plantas sintetizam esta substância orgânica durante a fotossíntese e sua quebra ocorre durante a respiração (Tzvetkova e Kolarov, 1996). Além disso, carboidratos solúveis em água como, glicose, sacarose ou frutose, podem ter contribuído para reforçar o sistema antioxidante de *C. floribundus*, uma vez que estes tem sido citados como sinalizadores para as vias das EROs (Van Den Ende e Valluru, 2009).

Tripathi e Gautam (2007) citam que ocorre redução no teor de carboidratos solúveis em plantas que crescem em locais poluídos, devido ao aumento na respiração e à diminuição na fixação do CO₂ pela deterioração da clorofila. No presente estudo, análises de regressão multilinear apontaram para alterações nas concentrações de compostos primários (carboidratos solúveis e amido) das três espécies estudadas por poluentes aéreos (O₃, NO₂ e MP₁₀), tanto durante a estação úmida quanto seca.

O amido funciona como carboidrato de reserva temporário, acumulando-se nos cloroplastos durante o dia e servindo como fonte principal para a síntese de sacarose citosólica durante a noite (Vandeputte e Delcour, 2004; Tester *et al.*, 2004).

Os menores teores de carboidratos solúveis em *P. gonoacantha* e o conteúdo elevado de amido também observado podem ser, respectivamente, relacionados com um aumento da respiração ou inibição da fotossíntese (Huttunen e Manninen, 2013; Munir *et*

al., 2014), ou ainda, a inibição da alocação de carbono das folhas para as raízes (Skärby *et al.*, 1998).

De acordo com Prokopiev (1978), o acúmulo de amido em folhas expostas à poluição aérea poderia ser resultado da maior resistência do aparato fotossintético e da baixa exportação de amido a partir do mesófilo. Ainda, o amido nas espécies arbóreas amostradas, tenderam a relacionar-se positivamente com os dados meteorológicos (especialmente radiação) e negativamente com os dados de poluição aérea (principalmente ozônio e material particulado), o que poderia explicar o menor conteúdo de amido quando expostos a poluição, com exceção de *C. floribundus* que mostrou uma relação inversa.

Segundo Chazdon e colaboradores (1996), há variações na capacidade fotossintética em plantas que crescem em ambientes sob diferentes condições ambientais. Sabe-se que as espécies pioneiras e não pioneiras contrastam em relação à tolerância à alta intensidade luminosa, apresentando diferenças em suas características fotossintéticas. Dessa forma, esperam-se diferenças nas taxas fotossintéticas nessas espécies quando crescem sob condições ambientais similares, especialmente sob alta luminosidade (Gandolfi, 2000). Segundo Press e colaboradores (1996), menores taxas fotossintéticas de espécies secundárias, poderiam ser explicadas pela aclimação à sombra. Favaretto *et al.*, (2011) acrescentam, ainda, que essas espécies secundárias são susceptíveis à diminuição reversível da eficiência fotossintética sob alta intensidade luminosa (processo denominado fotoinibição) do que as espécies pioneiras. Assim, tendo em vista que as espécies incluídas no estudo pertencem a categorias sucessionais distintas, é possível supor que as diferenças nos níveis de metabólitos primários e secundários nessas espécies poderiam ser explicadas por diferenças nas taxas fotossintéticas ou mesmo de perturbações diferenciadas ao processo da fotossíntese. Tais suposições nos motivaram a realizar a segunda etapa experimental.

Em relação às análises do andamento diário, esperar-se-ia encontrar taxas fotossintéticas mais altas em árvores de *C. floribundus*, por ser uma espécie pioneira e maior acúmulo de carboidratos do que *A. graveolens*, uma espécie secundária tardia. As espécies pioneiras realmente apresentam maior assimilação líquida de CO₂, em função dos maiores fluxos de fótons fotossintéticos e eficiência quântica (Nogueira *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2010).

Realmente, as árvores de *C. floribundus* tenderam a alcançar maiores taxas de assimilação líquida de carbono, condutância estomática e concentrações foliares de carboidratos solúveis do que *A. graveolens*. No entanto, o acúmulo de carboidratos ao

longo do dia nessas espécies não aumentou linearmente em resposta ao aumento das taxas fotossintéticas. Esse fato tanto pode indicar mudanças na eficiência fotossintética ao longo do dia (devido à fotoinibição ou danos oxidativo em alguma etapa do processo da fotossíntese, por exemplo), quanto no nível de translocação de fotossintatos ou de sua utilização em outras rotas metabólicas. Além disso, as curvas polinomiais entre acúmulo de amido e Asat inversas para *A. graveolens* e *C. floribundus* (figuras 12 e 13) podem indicar estratégias distintas de aproveitamento dos carboidratos solúveis. *C. floribundus* pareceu acumular mais amido no decorrer do dia em paralelo ao aumento da assimilação de carbono do que *A. graveolens*. Nesta última espécie, os carboidratos solúveis oriundos da fotossíntese podem ter sido canalizados para a síntese de flavonoides no decorrer do dia, considerando os resultados obtidos na primeira etapa experimental. No entanto, essa hipótese ainda precisa ser testada experimentalmente.

No entanto, espécies pioneiras necessitam de maior proteção antioxidante para compensar o estresse oxidativo imposto pela alta luminosidade as quais estão expostas (Hansen *et al.*, 2002, Favaretto *et al.*, 2011). Domingos e colaboradores (2015) e Aguiar-Silva, *et al.* (2016) verificaram que *C. floribundus* foi a espécie mais eficiente contra o efeito tóxico das EROs, apresentando aumento da atividade da APX e elevada atividade da GR, resultando em baixa peroxidação lipídica. Além disso, carboidratos solúveis como a glicose, sacarose e /ou frutose podem ter contribuído para reforçar o sistema antioxidante dessa espécie, uma vez que eles são amplamente mencionados como sinalizadoras das EROs (Ma *et al.*, 2011).

Coincidentemente, as correlações de Pearson apresentadas na Tabela 12 indicaram haver associação inversa entre variações nas concentrações de carboidratos solúveis e concentrações de O₃ e NO₂ apenas nas amostras foliares de *A. graveolens*. Sendo assim, a hipótese de que a relação entre produção de carboidratos solúveis e as trocas gasosas ao longo de um único dia é modulada por oscilações horárias tanto em variáveis microclimáticas quanto nos níveis de poluentes atmosféricos na região de estudo parece ter sido confirmada para essa espécie secundária tardia.

Ainda neste sentido de maior proteção, segundo Evert (2006) e Favaretto *et al.* (2011), as plantas podem possuir vantagens adaptativas ao tolerarem as condições estressantes, o que parece ser o caso de *C. floribundus*. Além das concentrações de carboidratos em suas folhas não terem sido moduladas por poluentes ao longo do dia (tomando por base a ausência de correlações significativas; Tabela 12), essa espécie se destaca por possuir mesofilo mais espesso e numerosos tricomas estelares na superfície

abaxial das folhas, que escondem os estômatos e podem ser possíveis barreiras contra a captação dos poluentes atmosféricos. Este mecanismo de evitação resulta em uma possível redução do dano oxidativo em *C. floribundus*, o que foi confirmado também pela ausência de lesões oxidativas visíveis microscopicamente (Moura, 2013B; Moura *et al*, 2014B).

Finalmente, houve uma tendência de diminuição da taxa fotossintética nas plantas coletadas no período seco (inverno), que poderia ser atribuída à menor disponibilidade de água para as árvores em consequência da baixa pluviosidade no período na região estudada. Segundo Kozłowski e Pallardy (1996), o déficit hídrico reduz a fotossíntese pelo fechamento dos estômatos, diminuindo a eficiência do processo de fixação de carbono, suprimindo a formação e expansão foliar, podendo induzir a queda de folhas. CETESB (2014) destaca, também, que as condições meteorológicas em dias excessivamente secos favorecem a ocorrência de inversões térmicas, que dificultam a dispersão dos poluentes, explicando os valores mais elevados de SO₂, NO₂ e MP₁₀ observados durante a estação seca na região de estudo. Esses poluentes, em concentrações mais altas na atmosfera, podem ter afetado, também, a eficiência fotossintética das árvores de ambas as espécies em seu ambiente natural, durante o período seco, uma hipótese que merece ser testada experimentalmente.

6. CONCLUSÕES

Os resultados da primeira etapa experimental, em seu conjunto, permitiram concluir que a análise da ocorrência e das concentrações de compostos dos metabolismos primário e secundário contribuiu para o estabelecimento do nível de tolerância das espécies arbóreas, frente a variações sazonais nas condições climáticas e nos níveis de poluentes. Carboidratos (principalmente amido) e compostos fenólicos (principalmente flavonoides) foram marcadores adequados do aumento de tolerância aos estresses ambientais em folhas de *C. floribundus* e *A. graveolens* respectivamente. *P. gonoacantha* pareceu ser a espécie arbórea mais vulnerável aos estresses ambientais. Em síntese, as hipóteses foram confirmadas, visto que:

- A composição de compostos dos metabolismos primário e secundário analisados variou entre as espécies arbóreas. Folhas de *C. floribundus* são compostas por maior diversidade de carboidratos e açúcares álcoois. Folhas de *A. graveolens* e *C. floribundus* apresentam flavonóis derivados de quercetina e campferol, que apresentam caráter antioxidante mais eficaz e as de *P. gonoacantha* apresentaram exclusivamente flavonas derivadas de apigenina e luteolina, que são antioxidantes menos eficazes;
- Os níveis de compostos dos metabolismos primário e secundário analisados também variaram entre as espécies arbóreas incluídas no estudo. As árvores de *C. floribundus* foram caracterizadas principalmente por concentrações mais altas de metabólitos primários (carboidratos totais e amido) e as de *A. graveolens* acumularam mais compostos secundários (flavonoides, taninos condensados, taninos totais e fenois totais do que as outras duas espécies). As concentrações de flavonoides e taninos condensados foram menores em *Piptadenia gonoacantha* do que nas demais espécies;
- Os níveis de compostos dos metabolismos primário e secundário também variaram sazonalmente; as árvores amostradas nos períodos úmidos tenderam a apresentar altos teores de taninos totais e condensados, fenois totais e carboidratos solúveis totais; as árvores amostradas no período seco de 2012 foram caracterizadas por concentrações mais elevadas de flavonoides;
- Análises de regressão multivariada indicaram que variações nas condições ambientais afetaram somente as concentrações de carboidratos solúveis totais e

amido e de flavonoides, em ambos os períodos de amostragem. Os níveis foliares desses compostos tenderam a aumentar em resposta a aumentos de radiação solar, umidade relativa e temperatura do ar e diminuir em resposta a aumento da concentração de poluentes.

Os resultados da segunda etapa experimental demonstraram que houve a associação entre produção de carboidratos solúveis e as trocas gasosas, seguindo o modelo polinomial. A hipótese de que a associação entre produção de carboidratos solúveis e as trocas gasosas ao longo de um único dia é modulada por oscilações horárias tanto em variáveis microclimáticas quanto nos níveis de poluentes atmosféricos na região de estudo foi confirmada apenas para *Astronium graveolens*. Em síntese, as hipóteses foram confirmadas, visto que:

- Notou-se queda na condutância estomática e na assimilação líquida de carbono ao longo do dia, tendendo a coincidir com a queda nos teores de açúcares totais e amido em árvores de *A. graveolens* e *C. floribundus*. No entanto, análises de regressão indicaram que as concentrações de carboidratos ou amido não foram correlacionadas linearmente com as taxas de assimilação líquida de carbono ao longo dos dias de amostragem nos períodos seco e úmido.
- Houve correlação significativa e negativa entre o conteúdo foliar de carboidratos e O_3 e entre amido e temperatura do ar, no período úmido, e entre níveis foliares de carboidratos e concentrações de NO_2 no período seco.
- Para *C. floribundus*, não foi encontrada correlação significativa entre variações em carboidratos e nas condições ambientais ao longo dos dias de amostragem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, M., Singh, J., 2000.** Impact of coal power plant emission on the foliar elemental concentrations in plants in a low rainfall tropical region. *Environ. Monit. Assess.* 60, 261–282.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012.** Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* 196, 67-76.
- Agati, G., Brunetti, C., Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M., 2013.** Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 35–45.
- Aguiar-Silva, C. ; Brandão, S.E. ; Domingos, M. ; 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* , v. 63, p. 154-164.
- Amaral, L.; Gaspar, M.; Costa, P.M.F.; Aida, M.P.M.; Buckeridge, M.S.** Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34: 425-431, 2007.
- Apel, K., Hirt, H, 2004.** Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Plant Biol.* 55:373.
- Atkins P, Paula J.** Physical Chemistry. 8. ed. Oxford: Oxford University Press, 2006.
- Baier M, Kandlbinder A, Gollack D, Dietz KJ (2005)** Oxidative stress and ozone: perception, signaling and response. *Plant, Cell and Environment* 28: 1012-1020.
- Baker, N. R., Rosenqvist, E.** Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 403, p.1607–1621, 2004.
- Bieski, I. G. C, 2004.** Marketing das plantas medicinais na saúde pública. Especialização. Centro Amazônico de ensino pesquisa e extensão - CAEPE. p. 3, Cuiabá-MT.
- Boian, C., Andrade, M.F., 2012.** Characterization of ozone transport among Metropolitan Regions. *Rev Bras Meteorol* 27:229-242.
- Bors, W., Langebartels, C., Michel, C., Sandermann Jr., H.** Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* 28: 1589 –1595, 1989.
- Balakumar, T.; Hani, V.; Vincent, B.; Paliwal, K, 1993.** On the interaction of UV-B radiation (280-315 nm) with water stress in crop plants. *Physiologia Plantarum*, v. 87, p. 217-22.
- Bray EA, Baylei-Serres J, Werentilnyk E (2000)** Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds.). American Society of Plant Physiologists. USA, New York, pp. 1158-1203
- Brook R.D., Brook J.R., Rajagopalan S. 2003.** Air pollution: the “heart” of the problem. *Current Hypertension Reports* 5: 32-39
- Carvalho, P.E.R. 1994.** Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa–CNPQ/SPI, Brasília, 676p.
- Chaves, M.M.** Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42: 1-16, 1991.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S.,** Understanding plant responses to drought – From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, v.30, p.239-264, 2003.
- Chaves M. M., Pereira J.S., Maroco J.P., Rodrigues M.L., Ricardo C.P.P., Osório M.L., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C.,** How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, v. 89, p. 907-916, 2002.

- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C.** Phototynthesis under drought and salt stress: regulations mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, Oxford, V.103, n4, P.551-560, 2009.
- CETESB:** Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2014) Qualidade do ar no Estado de São Paulo 2014. Série relatórios, São Paulo, 123p.
- Chazdon, R.L., Pearcy, R.W., Lee, D.W., Fetcher, N.,** 1996. Photosynthetic response of tropical forest plants to contrasting light environments. In: Mulkey, S.S., Chazdon, R.L., Smith, A.P. (Eds.), *Tropical Forests Plant Ecophysiology*. Chapman & Hall, New York, pp. 5–55.
- Close, D. C., McArthur, C,** 2002. ‘Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores? *Oikos* 99, 166–172.
- Costa, E. S.; Bressan-Smith R ; Oliveira J. G.; Campostrini E.;** Chlorophyll a fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. *Photosynthetica*, v. 41, 77-82 p., 2003.
- Dewick, P. M, 2009.** Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 539p.
- 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. 1a. ed. London: Imperial College Press, p. 287-308
- Dubois, M.; Gilles, A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355, 1956.
- Durigan, G.; Leitão Filho, H,** 1995. Florística e fitossociologia de matas ciliares do oeste paulista. *Revista do Instituto Florestal*, São Paulo, v.7, n.2, p.197-239.
- Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Murray, F., Kuylensstierna, J.C.I., Percy, K.E., Izuta, T., Zheng, Y., Shimizu, H., Sheu, B.H., Liu, C.P., Agrawal, M., Wahid, A., Abdel-Latif, N.M., van Tienhoven, M., de Bauer, L.I., Domingos, M.,** 2001. Impacts of air pollutants on Vegetation in Developing Countries. *Water, Air, and Soil Pollution*, Volume 130, Issue 1, pp 107-118.
- Engel, V.L., Moraes, A.L. & Poggiani, F.** 1984. Guia de localização e reconhecimento das principais espécies arbóreas do Parque da Esalq. Relatório de Pesquisa. FEALQ
- Evert, R.F.,** 2006. *Easau's Plant Anatomy*. John Wiley & Sons Inc, New Jersey.
- Farrant, J.M., Brandt, W. & Lindsey, G.G.** 2007. An overview of mechanism of desiccation tolerance in selected angiosperm resurrection plants. *Plant Stress* 1: 72-84.
- Farrant, J.M., Lehner, A., Cooper, K. & Wiswedel, S.** 2009. Desiccation tolerance in the vegetative tissues of the fern *Mohria caffrorum* is seasonally regulated. *The Plant Journal* 57: 65-79.
- 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.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M,** 1997. Protection oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *Febs Letters*, v.416, p.123-129.
- Ferretti, M., Fischer, R., Mues, V., Granke, O., Lorenz, M.,** 2010. Basic design principles for the ICP forests monitoring networks. Manual Part II. In: *Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and*

- Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests. UNECE ICP Forests Programme Coordinating Centre, Hamburg, ISBN 978-3-926301-03-1, p. 22. <http://www.icpforests.org/Manual.htm>.
- Fiscus, E.L., Booker, F.L., Burkey, K.O.,** 2005. Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell & Environmental* 28: 997–1011.
- 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.
- Furlan, C.M., Santos, D. Y. A. C., Motta, L.B., Domingos, M., Salatino, A.** Guava flavonoids and the effects of industrial air pollutants. *Atmospheric Pollution Research*, 1:30-35, 2010.
- Galindo-Leal, C., Câmara, I. G,** 2005. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. Capítulo 1. In: GalindoLeal, C. e Câmara, I.G. (Eds). *Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 3-11 pp
- Gandolfi, S.** 2000. História natural de uma Floresta Estacional Semidecidual no município de Campinas, SP. Tese de Doutorado, Universidade de Campinas, São Paulo.
- 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.
- Grantz, D.A. & Yang, S.** 2000. Ozone impacts on allometry and root hydraulic conductance are not mediated by source limitation not developmental age. *Journal of Experimental Botany* 51: 919–927.
- Groeneveld, J., Alves, L.F., Bernacci, L.C., Catharino, E.L.M., Knogge, C., Pütz, S., Grulke, N.E., Paoletti, E. & Heath, R.L.** 2007. Comparison of calculated and measured foliar O₃ flux in crop and forest species. *Environmental Pollution* 146: 640-647.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P.** Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.** 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hansen, U., Fiedler, B., Rank, B,** 2002. Variation of pigment composition and antioxidative systems along the canopy light gradient in a mixed beech/oak forest: a comparative study on deciduous tree species differing in shade tolerance. *Trees* 16, 354–364.
- Herrmann, K,** 1995. The shikimate pathway as an entry to aromaticsecondary metabolism. *Plant Physiol.* 107, 7–12.
- Hong-Bo S, Li-ye C, Ming-an S, Jaleel CA & Hong-mei M.** 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies* 331, 433-441.
- Huber, S.C.; Huber, J.L.** Role and regulation of sucrose-phosphatase synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 47, p. 431-444, 1996.
- 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.
- Huttunen, S., Manninen, S.,** 2013. A review of ozone responses in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Environ. Exp. Bot.* 90, 17e31.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística),** 2008. *Censo Demográfico 2006*. Rio de Janeiro: IBGE.

- ICP – Forest.** 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, 2005.
- Instituto De Nacional De Pesquisas Espaciais. INPE.** Disponível em: <<http://www.dgi.inpe.br/CDSR/>>. Acesso em: 06 de janeiro de 2016.
- Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. IBGE.** Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_geog_int.shtm?c=6 >. Acesso em: 06 janeiro 2016.
- Iqbal, M.; Abdin, M.Z.; Mahmooduzzafar, M.Y. & Agrawal, M.** 1996. Resistance mechanisms in plant against air pollution. In: Plant Response to Air Pollution (M. Yunnus e M. Iqbal eds). John Wiley and Sons, Chischester, p. 195 – 240.
- Iriti, M., Faoro, F.** 2007. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollut.* 187: 285–301.
- Jifon, J.L. and Syvertsen, J.P,** 2003. Kaolin particle film applications can increase photosynthesis and water use efficiency of ‘RubyRed’ grapefruit leaves. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 128: 107-112.
- Katoh, T., Kasuya, M., Kagamimori, S., Kozuka, H., Kawano, S.** 1989. Effects of air pollution on tannin biosynthesis and predation damage in *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 28:439-445.
- Knight, H.; Knight, M.R,** 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, v.6, p.262-267.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. & Fomin, A.** 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (Eurobionet). *Revista Brasileira Botânica* 24 (4): 511 – 518.
- Kovalchuk, I.** Multiple roles of radicals in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, p.31-44, 2010.
- Kozlowski, T.T e Pallardy, S.G,** 1996. Physiology of woody plants. 2nd ed. San Diego, Academic Press. 411p.
- Krupa, S., McGrath, M. T., Andersen, C. P., Booker, F. L., Burkey, K. O., Chappelka, A. H., Chevone, B. I., Pell, E. J., Zilinskas, B. A.** 2001. Ambient ozone and plant health. *Plant Disease* 85: 4-12.
- Klumpp, A., Klumpp, G. & Domingos, M.** 1996. Bio-indication of air pollution in the tropics. The active monitoring programme near Cubatão, Brazil. *Gefahrstoffe Reinhaltung Der Luft* 56: 27-31.
- Lambers, H.; Chapin, F. S; Pons, T. L.** Plant physiological ecology. Ed. 2, 2008, 610 p.
- Leitão-Filho, H.F.** Aspectos taxonômicos das florestas do Estado de São Paulo. *Silvicultura em São Paulo*, 16^a (1)197-206, 1987.
- 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, 80e89.MMA, 2010. Ministério do Meio Ambiente, Plano de Manejo ARIE Mata de Santa Genebra. Campinas, p. 1-162
- Lamourex, J, Fonseca, G. A. B,** 2004. Hotspots Revisited. Mexico City: CEMEX.
- Long, S.P.; Naidu, S.L,** 2003. Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone. In: Air pollution and plant life, (J.N.B. Bell & M. Treshow eds.). John Wiley & Sons Ltd. England. p. 69-88.

- Lorenzi, H.** 1992. Árvores brasileiras. Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa. Ed. Plantarum. 352p.
- Ma, Y.; Ma, F-W.; Wang, Y.H.** 2011. The responses of the enzymes related with ascorbate–glutathione cycle during drought stress in apple leaves. *Acta physiology Plant* 33:173–180.
- Manninen, S.; Huttunen, S.** Response of needle sulphur and nitrogen concentrations of *Scots pine* versus *Norway spruce* to SO₂ and NO₂. *Environmental Pollution* 107: 421-436, 2000.
- Mittermeier, R.A, Gil, P.R, Hoffman, M, Pilgrin, J, Brooks, T, Mittermeier, C.G, Monaghan, P., Metcalfe, N.B., Torres, R.,** 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* 12, 75-92.
- Moura, B.B,** 2013. Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Moura, B.B., Alves, E.S., Souza, S.R., Domingos, M., Vollenweider, P.,** 2014a. Ozone phytotoxic potential with regard to fragments of the Atlantic Semi-deciduous Forest downwind of Sao Paulo, Brazil. *Environ. Pollut.* 192, 65 e 73.
- Moura, B.B., Souza, S.R., Alves, E.S.,** 2014b. Response of Brazilian native trees to acute ozone dose. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 4220 e 4227.
- Muggli, R.** Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In: Free radicals and antioxidants in nutrition (F. Corongiu, S. Banni, M.A. Dessi and C. Rice-Evans eds.). Richelieu Press, London, p. 189 – 250, 1993.
- Munir, M.T., Xu, B., Perkins, M., Strack, M,** 2014. Responses of carbon dioxide flux and plant biomass to water table drawdown in a treed peatland in northern Alberta: a climate change perspective, *Biogeosciences*, 11, 807–820.
- Nalon, M. A.** 2008. Meio Físico e aspectos da fragmentação vegetação. In diretrizes para a conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo. (R.R. Rodrigues, C.A. Joly, M.C.W. de Brito, A. Paese, J.P. Metzger, L. Casatti, M.A. Nalon N. Menezes, N.M. Ivanauskas, V. Bolzani, V.L.R. Bononi, coords). Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Instituto de Botânica.
- Neufeld, S.H., Peoples, S.J., Davison, A.W., Chappelka, A.H., Somers, G.L., Thomley, J.E., Booker, F.L.** 2012. Ambient ozone effects on gas exchange and total non-structural carbohydrate levels in cutleaf coneflower (*Rudbeckia laciniata* L.) growing in Great Smoky Mountains National Park. *Environmental Pollution* 160:74 e 81.
- 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.
- Penuelas J, Estiarte M,** 1998. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? *Trends in Ecology & Evolution*, 13:20-24.
- Pasqualetti, C. B.; Sandrin, C. Z.; Pedroso, A. N. V.; Domingos, M.; Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2015. Fructans, ascorbate peroxidase, and hydrogen peroxide in ryegrass exposed to ozone under contrasting meteorological conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 6, p. 4771-4779.
- Pasqualini, C.R.; Garzino, S.; Greff, S.; Bousquet-Melou, A.** 2003. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere* 52: 239–248.
- Pellinen, R., Palva, T., Kangasjarvi, J.,** 1999. Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal*, 20, 349-356.

- Peshev, D.; Van Den Ende W**, 2012. Sugars as antioxidants in plants. In: TUTEJA.; N, GILL S.S, eds. Crop improvement under adverse conditions. New York: Springer Science Business Media, 285–308.
- Percy, K. E, Ferretti, M.** 2004. Air pollution and forest health: toward new monitoring concepts. *Environmental Pollution* 130: 113–126.
- Press, M.C.; Brown, N.D.; Barker, M.G.; Zipperlen, S.W**, 1996. Photosynthetic responses of light in tropical rain forest tree seedlings. In: SWAINE, M.D. (Ed.) *The Ecology of Tropical Tree Seedlings*. Carnforth: Parthenon Publishing Ltd, p.41-54.
- Rautio, P., Fürst, A., Stefan, K., Raitio, H., Bartels, U.**, 2010. Sampling and analysis of needles and leaves. Manual Part XII. In: *Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests*. UNECE, ICP Forests Programme Co-ordinating Centre, Hamburg, ISBN 978-3-926301-03-1, p. 19. <http://www.icpforests.org/Manual.htm>.
- RMA. Mata Atlântica: Uma rede pela floresta.** 2006. Rede de ONGs da Mata Atlântica, Brasília.
- Resolução CONAMA 03/1990**, de 28/06/1990, dispõe sobre os padrões de qualidade do ar previstos no PRONAR. Publicação DOU: 22/08/1990, pp. 15937-15939.
- Rezende, F. M.** Efeito da atmosfera enriquecida com CO₂ em mudas de *Psidium guajava* L . cv. Pedro Sato. 2013. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Orientadora: Furlan, C. M.), para a obtenção do título de Mestre em Botânica.
- 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, 1141-1153.
- Roessner, U.; Luedemann, A.; Brust, D.; Fiehn, O.; Linke, T.; Willmitzer, L.; Fernie, A.R.** Metabolic profiling and phenotyping of genetically and environmentally modified systems. *Plant Cell* 13: 131-142, 2001.
- Santos, K; Kinoshita L. S.** 2003. Flora arbustivoarbórea do fragmento de floresta estacional semidecidual do Ribeirão Cachoeira, município de Campinas, SP. *Acta Botanica Brasilica* 17(3): 325-341.
- Skärby, L., Ro-Poulsen, H., Wellburn, F.A.M., Sheppard, L.J.**, 1998. Impacts of ozone on forests: a European perspective. *New Phytol.* 139, 109-122.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.** (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.
- Seyyednejad, S.M.; Niknejad, M.; Koochak, H.** A review of some different effects of air pollution on plants. *Research Journal of Environmental Sciences* 5, (4): 302-309, 2011.
- Sharma, Y. K., Davis, K. R.** 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology, Medicine*, Vol. 23, No. 3, pp. 480–488.
- Souza, C.S.M., Silva, W.L.P., Guerra, A.M.N.M., Cardoso, M.C.R., Torres, S.B**, 2007. Alelopatia do Extrato Aquoso de Folhas de Aroeira Na Germinação de Sementes de Alfafa. Mossoro (RN): Revista Verde v. 2, n. 2.
- Smith, A.M.; Stitt, M.** Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell and Environmental**, Oxford, v. 30, p. 1126-1149, 2007.
- Streit, B.; Stumm, W.** Chemical properties of metals and the process of bioaccumulation in terrestrial plants. In: MARKERT, B. (eds). *Plants as biomonitors. Indicators for heavy metals in the Terrestrial Environment*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 2-27, 1993.

- Swaine, M.D.**, 1996. *The ecology of tropical forest seedlings*. Man and the biosphere series volume 17. UNESCO and The Parthenon Publishing Group, Carnforth, Lanes, UK 340 pages.
- Taiz, L.; Zeiger, E.**, 2006. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 4ª Ed, 719 p.
- Takahama, U., Oniki, T.**, 1992. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 33, 379-387.
- Tattini, M., Gravano, E., Pinellis, P., Mulinaccis, N., Romani, A.**, 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148, 69–77.
- Tausz, M.; Jiménez, M.S.; Grill, D.** 1998. Antioxidative defence and photoprotection in pine needles under field conditions. A multivariate approach to evaluate patterns of physiological response at natural sites. *Physiologia Plantarum* 104:170-764, 1998.
- Tausz, M., Landmesser, H., Posch, S., Monschein, S., Grill, D., Wienhaus, O.** 2007. Multivariate patterns of antioxidative and photoprotective
- Tzvetkova, N., D. Kolarov**, 1996. Effect of air pollution on carbohydrate and nutrients concentrations in some deciduous tree species, Bulg. *J Plant Physiol.*, 22(1-2), 53.
- Toniato, M.T.Z. e Oliveira-Filho, A.T.** 2004. Variations in tree community composition and structure in a fragment of tropical semideciduous forest in southeastern Brazil related to different human disturbance histories. *Forest Ecology and Management* 198: 319-339.
- Treutter, D.** Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**. v.4, n.3, p.147-157, 2006. FURLAN, C.M. Efeitos da poluição aérea de Cubatão sobre o conteúdo de nitrogênio, fibras, ligninas e substâncias fenólicas foliares e atividade herbívora em *Tibouchina pulchra* Cogn. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 1998.
- Tripathi, A.K.; Gautam, M.**, 2007. Biochemical parameters of plants as indicators of air pollution. *Journal of Environmental Biology* 28: 127-132.
- Tester, R. F.; Karkalas, J.; Qi, X.** Starch – composition, fine structure and architecture.
- Thomas, V.F.D., Hiltbrunner, E., Braun, S., Flückiger, W.**, 2002. Changes in root starch contents of mature beech (*Fagus sylvatica* L.) along an ozone and nitrogen gradient in Switzerland. *Phyton* 42, 223-228.
- Vandeputte, G.E.; Delcour, J.A.**, 2004. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p.245-266.
- Veloso, P.H.; Rangel-Filho, A.L.R., Lima, J.C.A.**, 1991. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro. 123p.
- Vermerris, W.; Nicholson, R.** Phenolic Compound Biochemistry. Dordrecht: Springer, 2006. 276p.
- Viana, V.M., Tabanez, A.J.A., Martinez, J.L.A.**, 1992. Restauração e manejo de fragmentos florestais. In: Anais do II Congresso Nacional sobre Essências Nativas, 400–402, 1992.
- Valluru, R., Van Den Ende, W.** Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*, Lancaster: 59: 2905-2916, 2008.
- Watanabi, T.; Furlan, C.M.** Optimizing the use of solvents and reagents in the spectrophotometric analysis of phenolic compounds. Hoehnea, 2011.
- Wagner, G.** Large-scale screening of heavy metals burdens in higher plants. In: MARKERT, B. (eds). Plants as biomonitors. Indicators for heavy metals in the Terrestrial Environment. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 425-434, 1993.

Wang, X.; Manning, W.; Feng, Z.; Zhu, Y. Ground-level ozone in China: distribution and effects on crops yields. **Environmental Pollution**, 147: 394-400, 2007.

Wang, Y.; Chen, S.; Yu, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.91, n.4, p.949-956, 2011.