



JULIANA MORENO PINA

**Trocas gasosas, sintomas foliares visíveis e  
atividade enzimática antioxidativa em plantas  
jovens de *Psidium guajava* ‘Paluma’ expostas ao  
ozônio no Parque Estadual das Fontes do  
Ipiranga, São Paulo, SP**

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

SÃO PAULO

2010

JULIANA MORENO PINA

**Trocas gasosas, sintomas foliares visíveis e  
atividade enzimática antioxidativa em plantas  
jovens de *Psidium guajava* ‘Paluma’ expostas ao  
ozônio no Parque Estadual das Fontes do  
Ipiranga, São Paulo, SP**

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

ORIENTADORA: DRA. REGINA MARIA DE MORAES

CO-ORIENTADOR: DR. SÉRGIO TADEU MEIRELLES

Pina, Juliana Moreno

P645t Trocas gasosas, sintomas foliares visíveis e atividade enzimática antioxidativa em plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostas ao ozônio no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP / Juliana Moreno Pina -- São Paulo, 2010.

129 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010

Bibliografia.

1. Myrtaceae. 2. Bioindicador. 3. Ozônio. I. Título

CDU: 582.883

Dedido este trabalho  
ao Claudio,  
à minha Vó Tida (*in memoriam*)  
e à minha Vó Maria  
que embora nunca tenha estudado ensina  
que essa é uma das melhores coisas da vida.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (Processo 05/57816-6) e pela bolsa concedida ao projeto onde este trabalho encontra-se inserido (Processo 05/51169-9).

À coordenação do programa de Pós graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica pela criação e manutenção, com muito esforço e dedicação, do curso de pós-graduação.

Ao Instituto de Botânica e à Seção de Ecologia pela utilização de suas instalações e seus equipamentos.

Ao Instituto de Astronomia e Geofísica da Universidade de São Paulo (IAG/USP) pela concessão dos dados de monitoramento climático.

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

À professora Dra. Regina Maria de Moraes pela dedicação e valiosa orientação desde a iniciação científica. Por acreditar e confiar em mim permitindo que, mesmo mais ausente que presente, eu continuasse desenvolvendo o mestrado e, mais adiante, o transformasse em um doutorado direto. Obrigada pelo enorme carinho, amizade e pelas conversas divertidíssimas.

Ao professor Dr. Sérgio Tadeu Meirelles por aceitar a co-orientação, pela orientação em, infelizmente, tempo exíguo e pela sinceridade e preocupação.

À professora Dra. Marisa Domingos, coordenadora do projeto sob o qual pude desenvolver meu trabalho, pelos ensinamentos e por permitir que eu continuasse trabalhando no projeto mesmo tendo assumido outros compromissos.

À Dra. Miriam Rinaldi pelo fundamental auxílio na metodologia enzimática.

Ao Dr. Shoey Kanashiro pelas informações sobre tratos fitossanitários.

À professora Dra. Patricia Bulbovas pelos ensinamentos botânicos e enzimáticos e pela amizade.

As auxiliares técnicas do laboratório da Seção de Ecologia Amariles C. de Souza, Marli Rodrigues Battaglia, Maria Auxiliadora P.C. Silva e Valdenice Soares da Silva Amorim pela descontração e auxílio em muitas etapas desse trabalho.

Aos pós-graduandos Marcelle Martinelli, Ana Paula Dias, Ricardo Nakazato e Jéssica Nobre pelo auxílio mais do que essencial no laboratório, pelos e-mails esclarecedores e pela amizade tão agradável. Sinto por não poder ter estado ao lado de vocês mais frequentemente.

À Fernanda Tresmondi pelo auxílio com as “Palumas”, cooperação e pela companhia nos sábados de manhã.

Aos doutores e mestres Silvia Sant’Anna, Marisia Esposito, Mauricio Lamano, Lilian Carminitti e Andrea Pedroso, amigos queridos do Instituto de Botânica, cuja amizade espero sempre manter, mesmo em lugares tão distante e frios como o Canadá.

Aos estagiários, alunos, funcionários e pesquisadores da Seção de Ecologia e todos aqueles que de alguma forma contribuíram com esse trabalho.

À Paola Mihály, Cristina Poletto, Elzira Dea Barbour, Iracy Xavier, Márcio Lopes, Celina Bragança e Ana Cristina P. Costa por concederem preciosas horas que permitiram que eu pudesse me dedicar à execução desse trabalho.

À bonita Elaine Vicentin que com simpatia me enviou muitos artigos científicos e à família Vicentin, em especial Dona Carmita e Seu Osmar, por me acolherem com carinho em sua casa.

À minha querida família por ser tão maravilhosa e essencial para mim. Agradeço aos meus pais, Angela e Adão, pelo amor incondicional, pelo modelo de vida e pelo incentivo. Agradeço ao meu irmão Daniel (melhor irmão do mundo) pelo companheirismo e por pacientemente ouvir muitas apresentações no power-point. Agradeço a minha dinda Cris pelos conselhos gráficos e pelos conselhos profissionais. Agradeço ao meu padrinho Marquinho que desde antes de eu entrar na faculdade torcia pelo meu futuro como bióloga.

Ao Claudio Vicentin, meu amado, pela compreensão, pelos sábados, domingos e feriados perdidos, pelo apoio físico e emocional e pelo amor imensurável. Sem sua ajuda esse trabalho não seria possível.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido ascórbico

ACP – análise de componentes principais

AOT40 – concentração acumulada de ozônio acima de 40 ppb

APX – ascorbato peroxidase

$A_{\text{sat}}$  – assimilação de gás carbônico sob radiação fotossinteticamente ativa saturante

$C_i$  – concentração intercelular de gás carbônico

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

$\text{CO}_2$  – gás carbônico

DHA – dehidroascorbato

DHAR – dehidroascorbato redutase

DPV – déficit de pressão de vapor

DTT – DL-dithiothreitol

DTNB – ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)

E – transpiração

$\text{EAO}_F$  – exposição acumulada de ozônio fitotóxica (acima de  $78,4 \mu\text{g m}^{-3}$ )

$\text{EAO}_{10\text{h}}$  – exposição acumulada de ozônio no período das 7h00 às 17h00

$\text{EAO}_{24\text{h}}$  – exposição acumulada de ozônio no período das 0h00 às 24h00

ERO – espécies reativas de oxigênio

EDTA – etilenodiamino tetra-acético

EUA – eficiência do uso da água ( $A_{\text{sat}}/E$ )

$\text{EUA}_i$  – eficiência intrínseca do uso da água ( $A_{\text{sat}}/g_s$ )

GR – glutathione redutase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

$g_s$  – condutância estomática

$\text{H}_2\text{O}_2$  - peróxido de hidrogênio

IIF – índice de injúria foliar

MDHA – monodehidroascorbato redutase

MDHAR - monodehidroascorbato redutase

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NBT – azul *p*-nitrotetrazolio

NO – monóxido de nitrogênio

$\text{NO}_2$  – dióxido de nitrogênio

O<sub>2</sub> – gás oxigênio

O<sub>2</sub><sup>·-</sup> – radical superóxido

O<sub>3</sub> – ozônio

OH – radical hidroxila

PEP - fosfoenolpiruvato

PEPc – fosfoenolpiruvato carboxilase

PEFI – Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

PVPP – polivinilpirrolidona

RMSP – Região Metropolitana de São Paulo

Rubisco - ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase

SOD – superóxido dismutase

UN/ECE – United Nations Economic Comision for Europe

Valverão – distância dos dias de análise em relação ao solstício de inverno (21 de junho)



## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1 Área de Estudo.....	13
3.2 Cultivo e exposição.....	14
3.3 Clima e qualidade do ar.....	16
3.4 Sintomas foliares visíveis .....	19
3.5 Trocas gasosas .....	20
3.6 Atividade enzimática antioxidativa.....	22
3.7 Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS .....	26
4.1 Condições meteorológicas e qualidade do ar .....	26
4.2 Sintomas foliares visíveis .....	35
4.3 Trocas gasosas .....	45
4.3.1 Outono 2007.....	45
4.3.2 Primavera 2007.....	46
4.3.3 Verão 2008.....	46
4.3.4 Outono 2008.....	47
4.3.5 Inverno 2008 .....	48
4.3.6 Primavera 2008.....	49
4.3.6 Síntese das trocas gasosas .....	62
4.4 Atividade enzimática antioxidativa.....	65
4.4.1 Primavera 2007.....	65
4.4.2 Verão 2008.....	65
4.4.3 Outono 2008.....	65
4.4.4 Inverno 2008 .....	65
4.4.5 Primavera 2008.....	65
4.4.6 Síntese da atividade enzimática antioxidativa.....	71
4.5 Análise conjunta das variáveis bióticas e abióticas .....	72
4.5.1 Análise de componentes principais: trocas gasosas .....	72
4.5.2 Análise de componentes principais: atividade enzimática antioxidativa.....	76
4.5.3 Análise conjunta das variáveis bióticas e abióticas .....	78

5. DISCUSSÃO.....	80
5.1 Condições meteorológicas e qualidade do ar .....	80
5.2 Sintomas foliares visíveis .....	82
5.3 Trocas gasosas .....	86
5.4 Atividade enzimática antioxidativa.....	89
5.5 <i>Psidium guajava</i> 'Paluma' como bioindicadora da poluição por ozônio.....	92
6. CONCLUSÃO .....	95
RESUMO.....	96
ABSTRACT.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100
ANEXO I.....	115
ANEXO II.....	116
ANEXO III.....	117

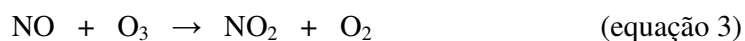
## 1. INTRODUÇÃO

O ozônio ( $O_3$ ) está presente de forma natural em proporções variadas por várias camadas da atmosfera. Na estratosfera ele atua como um filtro absorvendo a radiação ultravioleta e auxilia na remoção de gases do efeito estufa por meio da produção de radicais hidroxilas ( $OH\cdot$ ) (Crutzen & Ramanathan 2002, Farrel 2005). Contudo, suas concentrações troposféricas, que naturalmente seriam mínimas, vêm aumentando significativamente desde o início da revolução industrial (Krupa *et al.* 2001, Vingarzan 2004). Condição, que associada ao seu alto poder oxidativo, fez com que este passasse a atuar como poluente atmosférico afetando a saúde humana, a vegetação, os materiais e participando do aquecimento global, quer diretamente devido a sua força radioativa de  $+ 0,35 \text{ W m}^{-2}$ , quer indiretamente devido aos efeitos prejudiciais na produtividade primária das plantas (EPA 2006, Forster *et al.* 2007, Sixth *et al.* 2007).

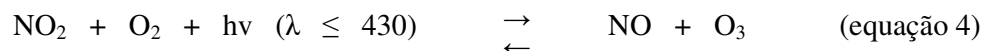
Poluente atmosférico pode ser definido como uma substância presente na atmosfera em uma concentração capaz de induzir efeitos adversos nos animais, vegetais e materiais (Freedman 1995). Com relação a sua origem, os poluentes podem ser classificados como primários, aqueles emitidos diretamente pelas fontes de emissão; ou secundários, aqueles formados na atmosfera por meio da reação química entre poluentes primários e/ou constituintes naturais da atmosfera (CETESB 2009).

O ozônio troposférico caracteriza-se por ser um poluente secundário formado como consequência de uma série de reações fotoquímicas entre os óxidos de nitrogênio ( $NO_x$ ), monóxido de carbono (CO), metano ( $CH_4$ ) e compostos orgânicos voláteis não metânicos (Freedman 1995, Jacob 1999).

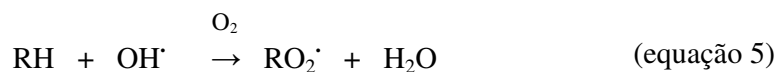
Em uma atmosfera não poluída, a formação de  $O_3$  ocorre junto aos  $NO_x$  e a luz solar. Nesse processo, o dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) é decomposto por meio da luz solar em monóxido de nitrogênio (NO) e oxigênio atômico (O) (equação 1). Na presença de uma molécula inerte que absorve energia (M), a molécula de gás oxigênio ( $O_2$ ) reage com o oxigênio atômico produzindo  $O_3$  (equação 2). Por sua vez, o NO reage com o  $O_3$  regenerando o  $NO_2$  e o  $O_2$  (equação 3).



Estas reações encontram-se em um equilíbrio fotoestacionário, ou seja, os produtos das reações reagem entre si regenerando os reagentes (equação 4).



Em uma atmosfera poluída, o aumento das concentrações de ozônio troposférico se deve à perda do equilíbrio fotoestacionário devido a reações com outros poluentes primários. A reação mais comum ocorre com compostos orgânicos voláteis não metânicos, como os hidrocarbonetos emitidos durante a queima de combustíveis fósseis. Na presença de luz solar, o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), naturalmente presente na atmosfera, reage com os hidrocarbonetos (RH, notação simplificada onde R é um grupo orgânico) produzindo radical peróxi (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>) (equação 5). O radical peróxi oxida NO a NO<sub>2</sub> (equação 6), sem que ocorra o consumo de O<sub>3</sub> exposto na equação 3. Nessas condições, a subsequente fotólise do NO<sub>2</sub>, apresentada na equação 1, seguida da reação com o O<sub>2</sub>, retratada na equação 2, são uma fonte líquida de produção de O<sub>3</sub> troposférico (Krupa & Manning 1988, Jacob 1999).



Hidrocarbonetos emitidos pela vegetação, como o terpeno e o isopreno, podem participar da formação de ozônio uma vez que esses gases reagem com o radical hidroxila formando radicais peróxi (equação 5) (Jacob 1999). Dessa forma, é esperado que em áreas com grande volume de tráfego ou próximas a unidades industriais, a concentração de O<sub>3</sub> seja baixa devido ao seu consumo pelo NO (equação 3). Ao passo que em áreas mais afastadas, que apresentam fragmentos de vegetação, podem ser encontradas altas concentrações de ozônio devido à emissão de hidrocarbonetos biogênicos, como os isoprenos, e ao transporte pelo vento de poluentes oriundos de áreas poluídas.

No ambiente, as relações entre as reações de formação do O<sub>3</sub> são mais complexas visto que são influenciadas pela distribuição e intensidade do espectro da luz solar, temperatura, altitude, estabilidade atmosférica, fatores topográficos, concentração de precursores no ambiente e transporte regional e transcontinental de precursores (Jacob 1999, Vingarzan 2004, EPA 2006). Sendo que este último fator, em adição ao uso de uma matriz energética baseada predominantemente na queima de combustíveis fósseis e biomassa, colabora para que o O<sub>3</sub>

troposférico constitua um problema em escala global sendo observado um aumento nas concentrações médias (Ashmore 2005, Klumpp *et al.* 2006, Forster *et al.* 2007).

Quando no interior da folha, o O<sub>3</sub> desencadeia uma intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Mudd 1996, Pell *et al.* 1997). As ERO caracterizam um grupo químico que atua como agente oxidante e inclui desde radicais oxigenados, tais como o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•</sup>), radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) e radical hidroperoxila (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>); até não-radicais derivados do oxigênio, tais como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Mittler 2002, Halliwell 2006).

A produção de espécies reativas de oxigênio é uma consequência inerente da vida aeróbica (Halliwell 2006). Nas plantas são produzidos continuamente como derivados de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (mitocôndria, cloroplastos, peroxissomos e apoplasto) (Levine 1999, Apel & Hirt 2004). As ERO participam do ciclo de vida dos vegetais atuando como mensageiros secundários sinalizando mudanças no ambiente, na defesa à patógenos, na expressão gênica, na morte celular programada, no desenvolvimento e no crescimento (Mittler 2002, Vranová *et al.* 2002, Apel & Hirt 2004, Foyer & Noctor 2005). No entanto, devido à sua reatividade, quando em excesso as ERO apresentam ação deletéria oxidando moléculas biológicas como proteínas, aminoácidos, lipídeos, ácidos nucleicos e levando à produção de outras ERO (Blokhina *et al.* 2003, Halliwell 2006, Halliwell & Gutteridge 2007). Dessa forma, é essencial que a planta mantenha um controle sobre a produção de ERO de modo que os efeitos deletérios sejam minimizados (Vranová *et al.* 2002, Halliwell 2006).

Mecanismos que evitam a produção excessiva de ERO incluem adaptações anatômicas (como por exemplo, movimento foliar e desenvolvimento de epiderme refratante), adaptações fisiológicas (fotossíntese C4 e metabolismo ácido das crassuláceas), movimento dos cloroplastos, modulações dos fotossistemas e das antenas e supressão da fotossíntese (Mittler 2002). Uma outra linha de defesa é o sistema antioxidativo, o qual elimina as ERO por meio da ação de compostos e enzimas antioxidantes que dissipam o excesso de energia sem que eles mesmos se convertam em um radical destrutivo (Gratão *et al.* 2005, Halliwell & Gutteridge 2007). Os antioxidantes compreendem moléculas de baixo peso molecular que reagem com as ERO se oxidando, enzimas que regeneram as formas oxidadas das moléculas antioxidantes e enzimas que interagem com as ERO (Noctor & Foyer 1998, Blokhina *et al.* 2003, Apel & Hirt 2004, Gratão *et al.* 2005, Munné-Bosh 2005, Jaleel *et al.* 2009).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das enzimas que atua no sistema antioxidativo. Ela é responsável pela dismutação do radical superóxido (reação na qual um elemento é simultaneamente reduzido e oxidado formando dois diferentes produtos) em peróxido de

hidrogênio e água (Blokhina *et al.* 2003, Gratão *et al.* 2005). A SOD está presente em todos os organismos aeróbicos e em todos os compartimentos subcelulares sujeitos à formação de ERO (Bowler *et al.* 1992). Foram identificadas algumas isoformas de SOD classificadas de acordo com seu metal cofator: Mn-SOD, Fe-SOD, Cu/Zn-SOD, Ni-SOD (Bowler *et al.* 1992, Youn *et al.* 1996, Gratão *et al.* 2005). A Mn-SOD é encontrada na mitocôndria e peroxissomos, a Fe-SOD está associada aos cloroplastos enquanto que a Cu/Zn-SOD está localizada no citoplasma, cloroplasto e peroxissomos (Gratão *et al.* 2005). Os genes que codificam os três tipos de enzimas, localizados no núcleo celular, mostram ser sensíveis aos estresses ambientais (Blokhina *et al.* 2003).

A enzima ascorbato peroxidase (APX) participa da destoxificação de ERO reduzindo o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Asada 1992). A família APX consiste de cinco diferentes formas, com isoenzimas presentes nos tilacóides, estroma, citoplasma, peroxissomo e apoplasto, as quais respondem diferentemente aos sinais metabólicos e ambientais (Asada 1992, Gratão *et al.* 2005).

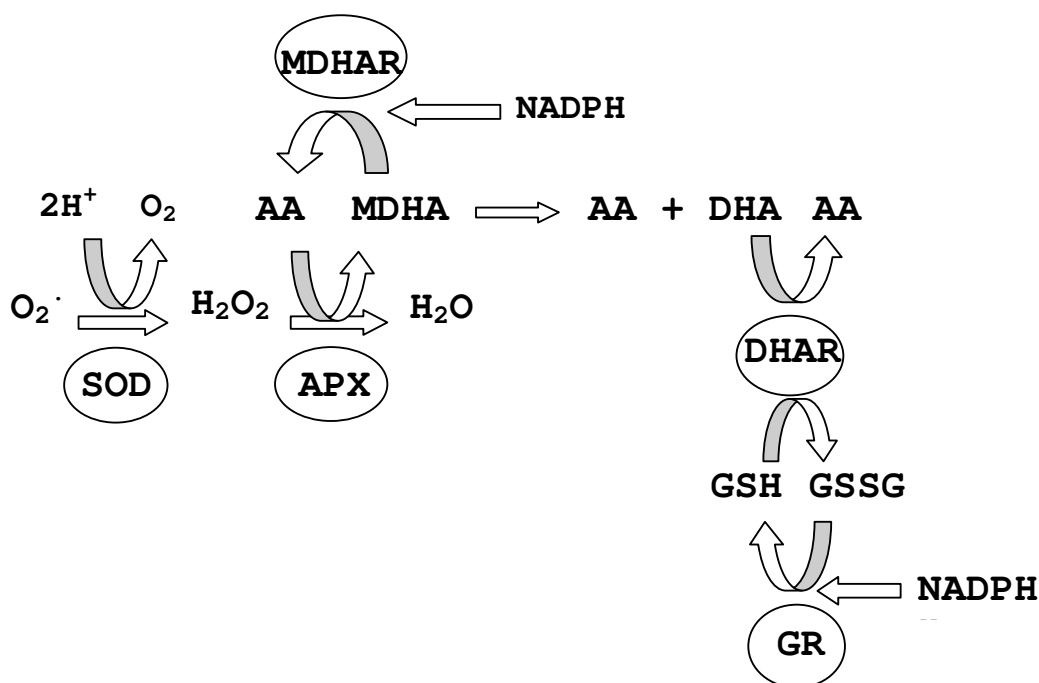
Atuando de maneira similar à APX, ou seja, metabolizando o  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , está a catalase (CAT), contudo, enquanto a APX é responsável pela modulação fina do controle da produção de ERO, a CAT é responsável por remover o excesso de ERO durante o estresse (Mittler 2002, Gratão *et al.* 2005).

A glutationa redutase (GR), também integrante do sistema antioxidativo, catalisa a redução da glutationa oxidada a glutationa reduzida. Possui seis isoformas que apesar de serem sintetizadas no citoplasma, podem atuar tanto no cloroplasto quanto na mitocôndria (Gratão *et al.* 2005, EPA 2006). Essas três enzimas, SOD, APX e GR, em conjunto com outras enzimas e metabólitos participam da via antioxidativa Ascorbato-Glutationa.

A via Ascorbato-Glutationa, também denominada de ciclo Halliwell-Asada-Foyer, envolve sucessivas oxidações e reduções do ascorbato, da glutationa e da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) pelas enzimas APX, GR, dehidroascorbato redutase (DHAR) e monodehidroascorbato redutase (MDHAR) (Noctor & Foyer 1998, Bray *et al.* 2000, Gratão *et al.* 2005).

A figura esquemática 01 apresenta o funcionamento do ciclo Halliwell-Asada-Foyer. A enzima SOD é a primeira a agir, dismutando o radical superóxido ( $O_2^{\cdot}$ ) em oxigênio e  $H_2O_2$ , subsequentemente a enzima APX catalisa a reação em que o  $H_2O_2$  é reduzido a água usando ácido ascórbico (AA) como substrato redutor. Como consequência, há a produção de monodehidroascorbato (MDHA), um radical com tempo de vida curto que se não é rapidamente reduzido, dismuta-se em AA e dehidroascorbato (DHA). O MDHA também pode ser reduzido diretamente a AA por meio da doação de elétrons pelo citocromo ou pela

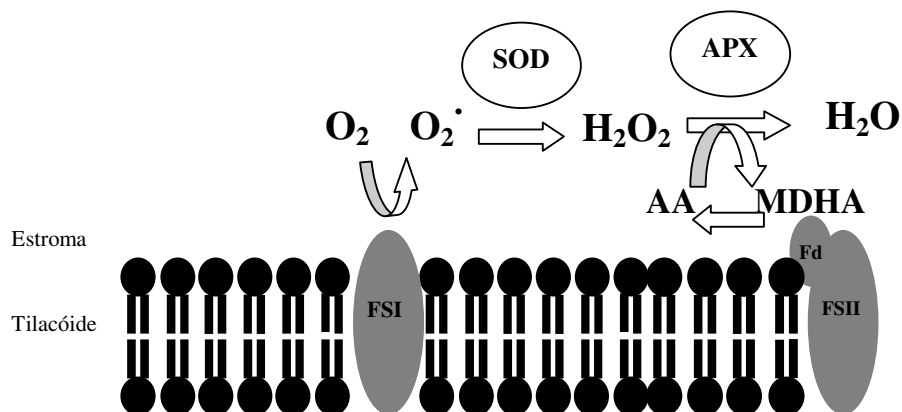
ferredoxina, ou pode ser reduzido mediante catálise da enzima MDHAR usando NADPH como doador de elétrons. O DHA formado na etapa anterior é reduzido a AA pela ação da enzima DHAR usando glutatona (GSH) como substrato redutor. Esta reação gera glutatona oxidada (GSSG), a qual é reduzida novamente a GSH, por catálise da GR, usando NADPH como doador de elétrons. Na condição reduzida o ácido ascórbico e a glutatona podem ser novamente utilizados, caracterizando um ciclo (Noctor & Foyer 1998, Bray *et al.* 2000). Embora não representados na figura esquemática, a GSH pode reagir ainda com o oxigênio singlete e os radicais hidroxila e hidroperoxila.



**Figura 01.** Ciclo Halliwell-Asada-Foyer. Adaptado de Noctor & Foyer (1998) e Bray *et al.* (2000). AA: ácido ascórbico; APX: ascorbato peroxidase; DHA: dehidroascorbato; DHAR: dehidroascorbato redutase; GR: glutatona redutase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; H<sub>2</sub>O: água; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; H<sup>+</sup>: íon hidroxila; MDHA: monodehidroascorbato; MDHAR: monodehidroascorbato redutase; NADPH: nicotiamida adenina dinucleotídeo fosfato; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: superóxido; O<sub>2</sub>: oxigênio; SOD: superóxido dismutase.

Além do ciclo Halliwell-Asada-Foyer, a detoxificação das ERO pode ocorrer por meio da via Água-Água (figura 02) que envolve as enzimas SOD e APX atuando na detoxificação do superóxido e do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formados no cloroplasto pela reação de Mehler (redução do O<sub>2</sub> a superóxido no fotossistema I); e por meio das vias Glutatona-Peroxidase e Catalase, que ocorrem, respectivamente, no citosol e no peroxissomo promovendo a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (Veljovic-Jovanovic 1998, Gratão *et al.* 2005).

Não obstante, o equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO (equilíbrio pró-oxidante / antioxidante) pode ser perturbado por condições ambientais adversas como o déficit hídrico, temperaturas extremas, radiação ultravioleta, alta intensidade luminosa e poluentes aéreos, fatores que podem intensificar a produção de ERO, excedendo a capacidade de remoção do sistema antioxidativo e acarretando no estresse oxidativo (Levine 1999, Bray *et al.* 2000).



**Figura 02.** Ciclo Água-água. Adaptado de Gratão *et al.* (2005). AA: ácido ascórbico; APX: ascorbato peroxidase; FSI: fotossistema I; FSII: Fotossistema II; Fd: ferredoxina;  $H_2O$ : água;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio;  $H^+$ : íon hidroxila; MDHA: monodehidroascorbato;  $O_2^{\cdot -}$ : superóxido;  $O_2$ : oxigênio; SOD: superóxido dismutase.

Conforme mencionado anteriormente, após ser absorvido pelos estômatos e se difundir no espaço apoplástico, o ozônio pode reagir com moléculas gasosas (etileno e isoprenóides, por exemplo) produzindo radicais orgânicos reativos ou pode se solubilizar na água que circunda os espaços aéreos, reagir com componentes da parede celular e com grupos sulfidrilas e promover a formação de ERO, que por sua vez irão reagir formando mais ERO (Kangasjärvi *et al.* 1994, Mudd 1996, EPA 2006). Se a produção de ERO for superior à capacidade de remoção do sistema antioxidativo, o  $O_3$  e/ou seus produtos de reação podem alcançar a plasmalema e promover um severo estresse oxidativo no interior da célula (Long & Naidu 2002). A própria membrana plasmática pode ser afetada por meio do processo de peroxidação lipídica no qual as ERO reagem com as ligações insaturadas dos ácidos graxos comprometendo a fluidez, permeabilidade e seletividade da mesma (Kangasjärvi *et al.* 1994, Mudd 1996).

Como consequência do estresse oxidativo e das alterações na membrana, há um aumento nas concentrações citoplasmáticas de  $H_2O_2$  e de íons  $Ca^{2+}$ , os quais, juntamente com outras moléculas (etileno, ácido salicílico e ácido jasmônico), podem atuar como mensageiros secundários alterando a expressão gênica por meio de fatores de transcrição (Kangasjärvi *et al.* 1994, Dizengremel 2001). As respostas decorrentes da alteração na expressão gênica



variam e abrangem desde o aumento na produção de hormônios, como o etileno, a alterações nos níveis de RNAm e na atividade de algumas enzimas como as que participam do sistema de defesa antioxidativo (Kangasjärvi *et al.* 1994, Pell *et al.* 1997, Long & Naidu 2002, Tausz *et al.* 2007), pode também ocorrer indução da senescência celular acelerada devido a maior concentração de etileno e a expressão de genes associados à senescência (Pell *et al.* 1997). Contudo, se a concentração de ERO for muito alta e ocorrerem danos oxidativos irreparáveis ao DNA, a morte celular programada pode ser disparada, ou necroses podem ser formadas, ou ambos os processos podem ocorrer (Halliwell 2006).

Ainda em decorrência do estresse oxidativo, verifica-se um aumento geral no metabolismo da mitocôndria com o favorecimento da degradação da sacarose antes que sua síntese, uma maior atividade da enzima fosfoenol piruvato carboxilase (PEPc), uma maior atividade de enzimas que participam da via das pentoses fosfato, a redução na fotossíntese e alterações na atividade de enzimas que participam do metabolismo secundário, podendo ocorrer, inclusive uma maior produção e acúmulo de compostos secundários ocasionando na pigmentação das folhas (Pell *et al.* 1997, Long & Naidu 2002, Andersen 2003, Ashmore 2005, EPA 2006, Dizengremel *et al.* 2008).

De maneira geral, observa-se uma modificação nos metabolismos primários e secundários em prol dos processos de destoxificação e reparo à custa do crescimento e da produtividade (Dizengremel 2001, EPA 2006, Leitão *et al.* 2008), com o conseqüente aumento da suscetibilidade aos estresses bióticos e abióticos (Ashmore 2005).

A fotossíntese é um processo particularmente suscetível ao estresse induzido pelo ozônio, o qual pode inibir ou provocar danos em todas as etapas, desde a captura de luz até o acúmulo de amido (EPA 2006). Restrições em qualquer das etapas da fotossíntese repercutirão no transporte de energia pela membrana fotossintética, aumentando o potencial para formação de ERO dentro do cloroplasto e podendo provocar fotoinibição (Long & Naidu 2002). De fato, danos aos fotossistemas resultantes da degradação da clorofila e da redução da eficiência fotoquímica do PSII, têm sido verificados em plantas expostas a este poluente (Guidi *et al.* 2000, Castagna *et al.* 2001, Moraes *et al.* 2004). Ademais, verifica-se que a ocorrência de alta intensidade luminosa pode intensificar ou agravar os efeitos do O<sub>3</sub> por meio dos processos de fotoinibição (Massman 2004).

Embora os mecanismos da resposta da fotossíntese ao O<sub>3</sub> ainda não estejam totalmente elucidados, sabe-se que uma das etapas mais sensíveis é a carboxilação devido a reduções na síntese e na quantidade da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (Eckardt & Pell 1994, Brendley & Pell 1998, Farage & Long 1999). Ainda que a maior parte das evidências indique que a redução na condutância estomática verificada em plantas sob

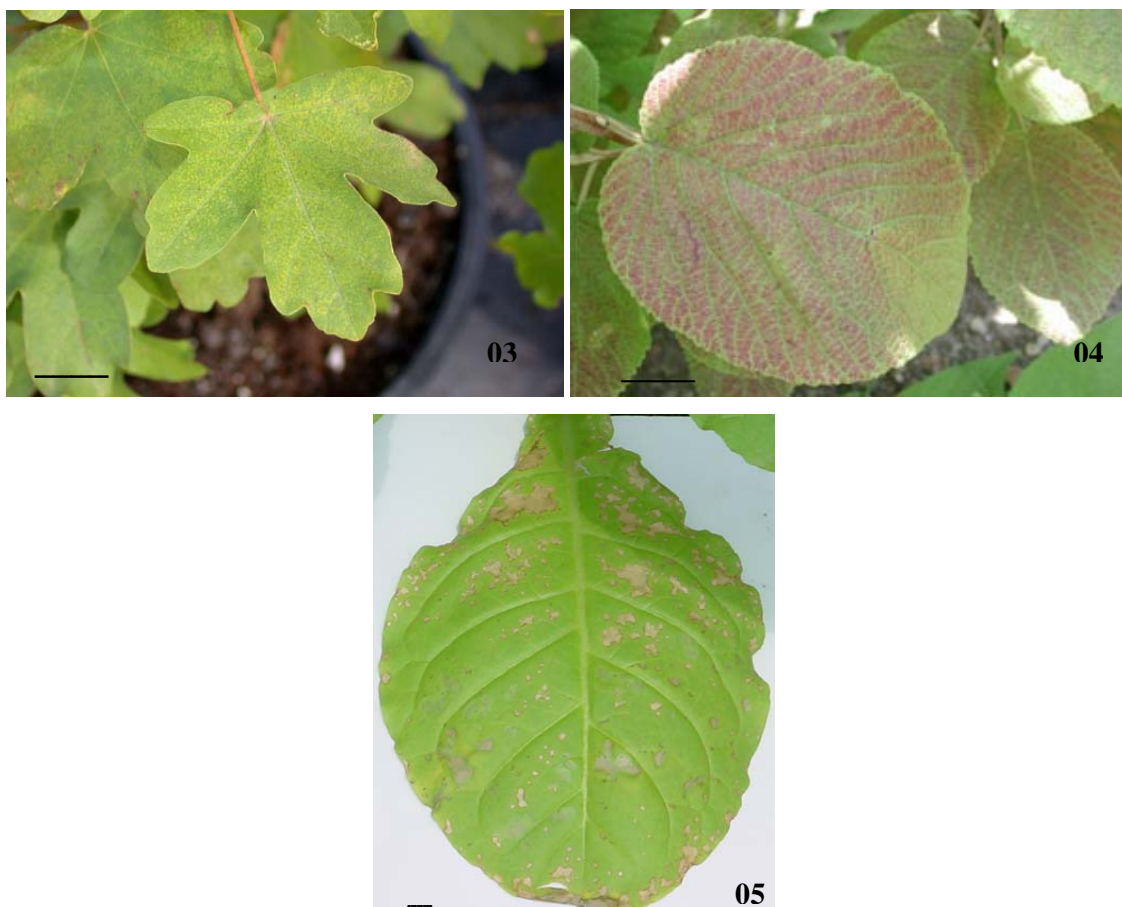
exposição ao O<sub>3</sub> é consequência do aumento na concentração interna de CO<sub>2</sub> (Farage *et al.* 1991, Bortier *et al.* 2000, Noormets *et al.* 2001, Long & Naidu 2002, Paoletti & Grulke 2005), é possível que o ozônio e/ou as ERO, ao alterarem as relações iônicas e hídricas das células guarda e subsidiárias, provoquem a redução da condutância, limitando a fixação de CO<sub>2</sub> (Torsenthaugen *et al.* 1999, EPA 2006).

Todavia, a condutância estomática é um aspecto de extrema relevância, pois determina a concentração de ozônio que efetivamente irá agir no interior da folha, uma vez que devido à alta reatividade do O<sub>3</sub> com os componentes intracelulares assume-se que sua concentração no interior da célula é igual à zero (Reich 1987, Laisk *et al.* 1989, Kouterick *et al.* 2000, Dittmar *et al.* 2005). Assim, espécies que apresentam alta condutância estomática estarão mais suscetíveis ao O<sub>3</sub> quando comparadas as espécies que apresentam uma menor condutância, dada uma mesma concentração de ozônio no ar. Deste modo, fatores que interferem na abertura estomática (déficit hídrico e o déficit de pressão de vapor, por exemplo) contribuem para uma maior ou menor exposição da planta ao ozônio (EPA 2006).

Algumas das respostas obtidas em espécies sensíveis ao O<sub>3</sub> como a degradação da clorofila, a formação de necroses e o acúmulo de compostos do metabolismo secundário ocasionam a formação de sintomas foliares visuais (figuras 03 a 05) (Heath *et al.* 2009). Tais sintomas podem ser utilizados no biomonitoramento da qualidade do ar (De Termmerman *et al.* 2004).

O biomonitoramento é a utilização de seres vivos para a verificação e avaliação das condições ambientais (Klumpp 2001). Ele fornece alertas quanto à ocorrência de mudanças no ambiente, fornece evidências sobre danos em ecossistemas naturais e não-naturais, determina a variação espacial e temporal dos efeitos dos poluentes, fornece dados para modelagens e previsão de risco, entre outras funções (Niemi & MacDonal 2004, Carignan & Villard 2004).

Embora o biomonitoramento não substitua os métodos físico-químicos, ele fornece informações complementares a tais medidas e possibilita uma ampliação significativa da área de abrangência de monitoramento, que geralmente é restrito devido ao alto custo de implantação (Arndt & Schweizer 1991). Além disso, como as respostas dos organismos resultam não só da concentração do poluente no ar, mas da interação desta com as condições climáticas e com as características biológicas de cada espécie, o uso de bioindicadores confere significado biológico ao monitoramento físico-químico (Manning 2003), evidenciando o estresse a que as plantas e a vegetação foram expostas (Smith *et al.* 2003).

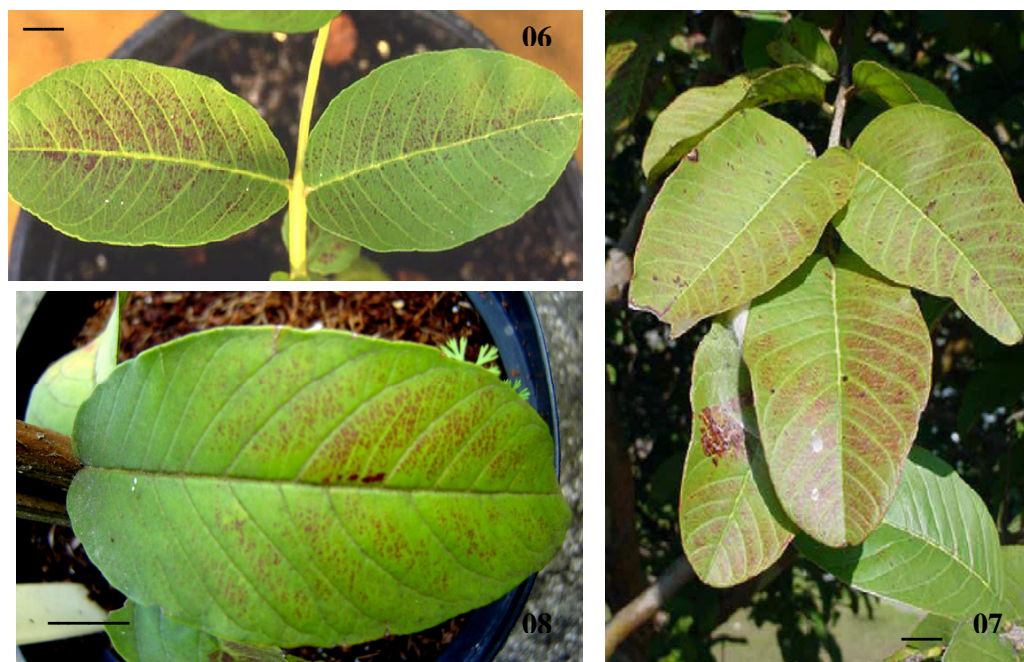


**Figuras 03 a 05** Aspectos dos sintomas foliares visíveis induzidas pelo O<sub>3</sub> em folhas de plantas sensíveis. (03) cloroses em folha de *Acer campestre* (Schaub *et al.* 2002); (04) pigmentação em folha de *Virbunum lantana* (Schaub *et al.* 2002); (05) necroses em folha de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' (Sant'Anna 2007). Escala: 2 cm.

Uma espécie bioindicadora da poluição atmosférica é aquela que exibe injúrias quando exposta a um determinado poluente ou mistura de poluentes (De Termmerman *et al.* 2004). Um difundido bioindicador da poluição por ozônio é a cultivar *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' que vem sendo empregada a várias décadas no mapeamento e distribuição geográfica das concentrações fitotóxicas de O<sub>3</sub> (Heggestad 1991). Contudo, a utilização de plantas nativas como no biomonitoramento permite uma avaliação mais fidedigna, uma vez que estas espécies estão mais adaptadas às condições climáticas vigentes, permitindo, portanto, a obtenção de uma resposta com significado ecológico (Manning 2003).

O potencial bioindicador da presença de ozônio no ar foi recentemente definido para a espécie tropical *Psidium guajava* cultivar Paluma por meio de exposição sob condições controladas (câmaras de topo aberto com e sem fumigação com ozônio) (Furlan *et al.* 2007) e sob condições ambientais na cidade de São Paulo (Pina & Moraes 2007). *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) é uma espécie tropical, nativa da América Central com ampla ocorrência em territorial nacional, conhecida popularmente como goiabeira. A cultivar Paluma é derivada

das variedades Rubi e Supreme e foi desenvolvida pelo Professor Fernando Mendes Pereira da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, campus de Jaboticabal. Seus frutos são adequados para consumo *in natura* e para produção de polpa (ITAL 1988). Os sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em 'Paluma' caracterizam-se como pontuações avermelhadas na superfície adaxial (figura 06 a 08).



**Figuras 06 a 08.** Sintoma foliar visível induzido por ozônio em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos ao ozônio (06 e 07) sob condições semi-controladas (Furlan *et al.* 2007) e sob condições ambientais (08) (Pina & Moraes 2007). Escala: 1 cm.

A cidade de São Paulo integra conurbação urbana denominada Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), a qual é considerada a maior região industrializada e urbanizada da América Latina (Molina & Molina 2004). A deterioração da qualidade do ar na RMSP é decorrente das emissões atmosféricas de cerca de 2.000 indústrias de alto potencial poluidor e da frota registrada de aproximadamente 9,2 milhões de veículos (CETESB 2009). A topografia da região, cercada por cadeias de montanhas que atingem até 1.200 m, favorece o acúmulo e a baixa dispersão de poluentes, condição intensificada quando da ocorrência de inversões térmicas (CETESB 2009). Dessa forma, a RMSP apresenta condições favoráveis à formação de O<sub>3</sub>, o que é comprovado por meio do monitoramento realizado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) que observa frequentemente a ocorrência de eventos de alta concentração desse poluente.

Diferentes estudos desenvolvidos em condições ambientais, inclusive na cidade de São Paulo, nos quais foram empregadas ferramentas do biomonitoramento, evidenciaram que a

resposta das plantas bioindicadoras sensíveis ao ozônio, ou seja, a manifestação e a progressão das injúrias foliares, não apresenta linearidade com o aumento na exposição ao ozônio (Klumpp *et al.* 2006, Pina & Moraes 2007), diferentemente dos estudos realizados sob condições controladas (Furlan *et al.* 2007). Embora ideal para o estabelecimento de programas padronizados de biomonitoramento de qualidade do ar, a função matemática linear entre a porcentagem de área foliar afetada por sintomas, que indicam a presença de poluentes na atmosfera, e as concentrações atmosféricas do poluente não é alcançada com facilidade. Na realidade, a manifestação do sintoma foliar visível é determinada pela ação conjunta de múltiplos fatores ambientais (concentração dos poluentes e variáveis meteorológicas como déficit de pressão de vapor, temperatura, umidade relativa, velocidade do vento, irradiância e fotoperíodo) e biológicos, entre eles, as trocas gasosas de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e a atividade do sistema de defesa antioxidativo. Logo, o biomonitoramento da poluição por ozônio torna-se mais preciso quando são elucidadas as interações entre os fatores ambientais e biológicos e a influência deles na manifestação de sintomas foliares visíveis.

Dessa forma foi realizado o presente estudo, considerando que:

- O ozônio é um poluente fitotóxico cujas concentrações troposféricas vêm aumentando;
- Que na cidade de São Paulo ocorrem altas concentrações de ozônio, possivelmente capazes de promoverem danos à vegetação;
- Que a utilização de espécies tropicais no biomonitoramento produz uma resposta mais significativa para a vegetação nativa dessa região;
- Que *Psidium guajava* 'Paluma' mostrou ser um bioindicador da poluição por ozônio;
- Que é necessário um maior esclarecimento sobre os efeitos do ozônio na fisiologia da planta;
- Que é necessário um maior esclarecimento sobre o efeito dos fatores abióticos e bióticos na manifestação de sintomas foliares visíveis em 'Paluma' a fim de que ela efetivamente seja utilizada como espécie bioindicadora da poluição por ozônio.

## 2. OBJETIVOS

Face ao exposto, os objetivos do presente estudo foram:

- Verificar a relação entre a manifestação de sintomas foliares visíveis e alguns aspectos do processo de fotossíntese e das defesas antioxidativas em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' mantidos em ambiente contaminado por ozônio, ao longo de um gradiente temporal de condições ambientais, tanto no que diz respeito à contaminação atmosférica quanto às condições meteorológicas;
- Determinar quais dos fatores ambientais, abrangendo os de qualidade do ar e os meteorológicos, exercem maior influência nas variáveis biológicas estudadas;
- Fornecer subsídios visando o estabelecimento efetivo de *Psidium guajava* 'Paluma' como a primeira espécie arbórea tropical bioindicadora de ozônio.

As hipóteses a serem testadas são as de que:

- O O<sub>3</sub> troposférico provoca alterações nas trocas gasosas e na atividade enzimática antioxidativa em 'Paluma';
- A manifestação de sintomas foliares visíveis é sempre precedida de alterações nas trocas gasosas e/ou no sistema antioxidativo;

Com o conhecimento adquirido neste estudo, espera-se contribuir para o estabelecimento de protocolo para biomonitoramento da poluição por ozônio em São Paulo. Cabe ressaltar que a presente Tese de Doutorado é parte integrante do projeto "Respostas fisiológicas antioxidativas e estruturais a fatores ambientais em plantas bioindicadoras sensíveis a compostos do smog fotoquímico" (Processo FAPESP 05/51169-9, sob coordenação do Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Domingos, Instituto de Botânica) que tem como principal objetivo avaliar a performance bioindicadora de três espécies *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3', *Ipomoea nil* 'Scarlett O'Hara' e *Psidium guajava* 'Paluma' expostas as condições ambientais na cidade de São Paulo, analisando processos fisiológicos, defesas antioxidativas, ultraestrutura celular, estrutura anatômica e intensidade de sintomas foliares típicos para verificar qual delas é mais adequada ao biomonitoramento do ozônio em regiões tropicais.

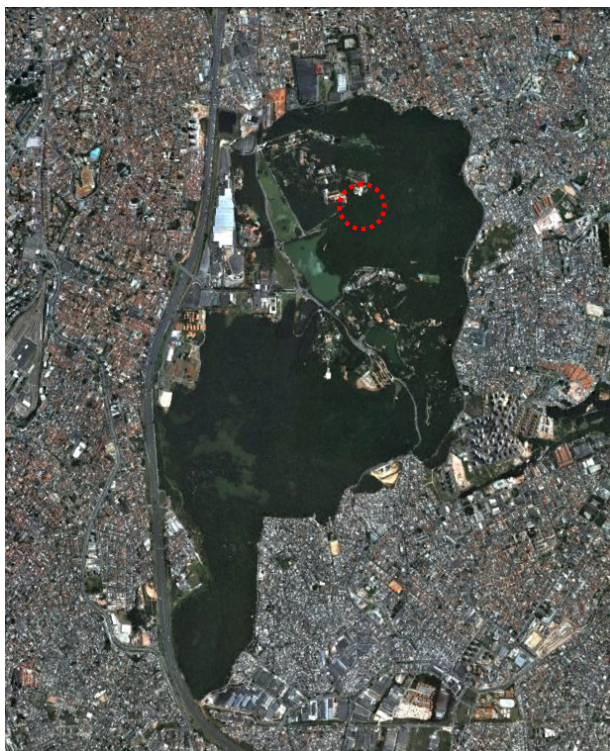
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

A sede do Instituto de Botânica, situado no interior do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), constituiu a área de estudo. Localizado na zona sul da cidade de São Paulo entre os paralelos 23° 38' e 23° 40' S e os meridianos 46° 36' e 46° 38' W, o PEFI apresenta áreas recobertas por fragmentos de vegetação em diferentes estágios de regeneração e imediações ocupadas por avenidas com volume de tráfego moderado (figura 09).

Estudos anteriores com plantas bioindicadoras indicaram que no interior do PEFI ocorrem concentrações significativas de O<sub>3</sub> e baixas concentrações de poluentes primários (Domingos *et al.* 2002). Especula-se que os precursores do ozônio nessa área sejam oriundos de emissões biogênicas dos fragmentos florestais e de emissões veiculares, sendo que esta última fonte, por estar um pouco mais afastada do PEFI, não contribuiria para um aumento das concentrações dos poluentes primários, nem promoveria o consumo químico do ozônio (Domingos *et al.* 2002).

O experimento foi instalado próximo à casa de vegetação e à casa de fumigação, ambas pertencentes à Seção de Ecologia do Instituto de Botânica.



**Figura 09.** Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – PEFI e entorno, zona sul da cidade de São Paulo, SP (23° 38' e 23° 40' S, 46° 36' e 46° 38' W). Linha tracejada indica a área onde foi instalado o experimento (Google Earth 2009).

### 3.2 Cultivo e exposição

Indivíduos jovens de 'Paluma' foram obtidos na produtora João Mateus e Outros, localizada no município de Taquaritinga, a qual realiza a propagação das mudas por meio da técnica de estaquia de ramos herbáceos. Procurou-se selecionar mudas com características fenotípicas homogêneas, com cerca de 30 cm de altura e oito pares de folhas com limbo expandido. Ao final do período de exposição (aproximadamente 80 dias) as mudas apresentavam em média 13 pares de folhas.

Após obtenção, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 3,05 L de volume, utilizando como substrato uma mistura de casca de *Pinus*, vermiculita fina e fibra de coco (2:1:1). Estudo prévio realizado com 'Paluma' em distintos substratos indicou que essa mistura proporciona um desenvolvimento adequado.

Posteriormente, os indivíduos jovens, com cerca de 75 dias, permaneceram por cerca de quinze dias em casa de vegetação com ar filtrado para recuperação do transplante (figura 10). A casa de vegetação em questão conta com filtro de carvão ativado (*VECO*<sup>®</sup>, BR) para retirada de poluentes gasosos, filtros de lã de vidro e de papel para retirada de partículas grossas e finas e com aparelhos de ar condicionado, ativados por termostato, para controle da temperatura. O monitoramento da qualidade do ar na casa de vegetação foi realizado por meio de medidas descontínuas com um Amostrador de Grandes Volumes (AGV 10, *Energética*<sup>®</sup>, materiais particulados até 10 µm – MP<sub>10</sub>) e com um TRI-Gás (*Energética*<sup>®</sup>, O<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub>). As análises indicaram a existência de concentrações negligenciáveis de poluentes no interior da casa de vegetação (média diária de 3 µg de O<sub>3</sub> m<sup>-3</sup>, médias horárias inferiores a 10 µg de O<sub>3</sub> m<sup>-3</sup>, média horária de 7 µg de NO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> e média diária de 13 µg de MP<sub>10</sub> m<sup>-3</sup>). Durante o período de recuperação, a temperatura média e a umidade relativa média do ar no interior da casa de vegetação ficaram em torno de 21 °C e 75 %.

Em seguida, 72 indivíduos jovens em vasos numerados foram levados para a área de estudo. O modelo de exposição adotado na área de estudo foi adaptado do proposto por Arndt & Schweizer (1991) (figura 11). Caixas plásticas preenchidas com água foram dispostas sobre bancadas com 70 cm de altura; sobre cada caixa foram colocadas telas de arame galvanizado onde ficaram apoiados os vasos. O posicionamento dos suportes em campo foi estabelecido com bússola a fim de padronizar o nível de insolação das plantas.





**Figura 10.** Casa de vegetação com sistema de ar filtrado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. (foto: Mauricio Lamano).



**Figura 11.** Sistema de exposição na área de estudo.

A irrigação das plantas foi garantida por capilaridade por intermédio de cordões de náilon inseridos, em uma extremidade, na base dos vasos, portanto em contato com as raízes e, na outra extremidade, mergulhados nas caixas com água (VDI 2003). Em acréscimo, os

vasos com 'Paluma' recebiam rega superficial diária com auxílio de regador. As telas de arame foram recobertas com filme plástico escuro a fim de evitar a proliferação de larvas nas caixas. Os cuidados fitossanitários adotados incluíram a utilização de acaricida (*Actara*<sup>®</sup>, 0,01g L<sup>-1</sup>) após o transplante das plantas e utilização de solução de fumo e álcool quando da presença de pulgões (50 g L<sup>-1</sup> e 10 ml de álcool). A adubação foi realizada mensalmente com 100 ml de solução hidrossolúvel de N:P:K (10:10:10).

O experimento teve duração de cerca de um ano e oito meses, começando em 09 de abril de 2007 e terminando em 13 de dezembro de 2008. Durante esse período foram realizadas sete exposições, de aproximadamente 80 dias cada, no período de 09 de abril de 2007 a 22 de junho de 2007, de 10 de julho de 2007 a 29 de setembro de 2007, de 08 de outubro de 2007 a 20 de dezembro de 2007, de 14 de janeiro de 2008 a 04 de abril de 2008, de 07 de abril de 2008 a 27 de junho de 2008, de 14 de julho de 2008 a 26 de setembro de 2008 e de 13 de outubro de 2008 a 12 de dezembro de 2008. Uma vez que as datas das exposições foram escolhidas de forma a coincidir com as estações do ano, a título de apresentação os períodos foram denominados, respectivamente, de Outono 2007, Inverno 2007, Primavera 2007, Verão 2008, Outono 2008, Inverno 2008 e Primavera 2008.

Iniciada a exposição, a cada semana foram sorteados seis exemplares de 'Paluma' para as análises de trocas gasosas e da atividade enzimática. Os dados da exposição de Inverno 2007 não serão apresentados e discutidos uma vez que nesse período não houve monitoramento das concentrações de poluentes e a metodologia das análises enzimáticas ainda estava sendo ajustada.

### **3.3 Clima e qualidade do ar**

Os dados de temperatura (°C), umidade relativa (%), precipitação (mm), irradiação solar global (MJ m<sup>-2</sup>), pressão atmosférica (mmHg), direção e velocidade dos ventos (km h<sup>-1</sup>) foram fornecidos pela Estação Meteorológica do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo (IAG/USP). A Estação Meteorológica está situada no interior do PEFI a cerca de 1 km de distância da área de estudo. Com os dados de temperatura e umidade foi calculado o déficit de pressão de vapor (DPV, kPa) conforme fórmula apresentada no Anexo I.

Na exposição de Outono 2007 o monitoramento da concentração de O<sub>3</sub>, NO e NO<sub>2</sub> foi realizado por uma estação móvel da CETESB estacionada junto à área de estudo (figura 12). A partir da exposição de Primavera 2007 o monitoramento dos poluentes foi realizado por analisadores de gases traços (O<sub>3</sub>, NO e NO<sub>2</sub>) instalados junto à casa de fumigação. Os gases traços foram medidos por meio de analisadores contínuos (APOA-360CE, *HORIBA*<sup>®</sup>)

previamente calibrados e conectados a um computador (APNA-360E HORIBA®) para registro automático das medidas a cada segundo. Para aquisição dos valores foi utilizado o software IDA-2000.



**Figura 12.** Estação móvel de monitoramento do ar pertencente à CETESB, instalada próxima à casa de vegetação no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, durante a exposição de Outono 2007.

Os dados de concentração obtidos originalmente em partes por bilhão (ppb) foram transformados em micrograma por metro cúbico ( $\mu\text{g m}^{-3}$ ), uma vez que a legislação federal e a estadual, que tratam dos padrões de qualidade do ar, utilizam a unidade  $\mu\text{g m}^{-3}$  para quantificar a concentração de  $\text{O}_3$ ,  $\text{NO}$  e  $\text{NO}_2$ . Para conversão das unidades foi utilizada fórmula que considera a massa da molécula, a pressão e a temperatura (Anexo II). Dessa forma, adotando-se uma temperatura média em torno de  $20\text{ }^\circ\text{C}$  e uma pressão média de  $695\text{ mmHg}$  (dados IAG/USP) foram obtidos os seguintes fatores de conversão:  $1\text{ ppb de } \text{O}_3 = 1,96\text{ } \mu\text{g m}^{-3}$  de  $\text{O}_3$ ;  $1\text{ ppb de } \text{NO}_2 = 1,8\text{ } \mu\text{g de } \text{NO}_2\text{ m}^{-3}$ , e  $1\text{ ppb de } \text{NO} = 1,2\text{ } \mu\text{g de } \text{NO m}^{-3}$ .

Com as concentrações horárias do  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}$  foram calculadas as médias e máximas diárias e as médias e máximas referentes ao período do dia em que caracteristicamente ocorrem as concentrações mais altas de  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}$ , ou seja, o período das 7h00 às 12h00 e o período das 7h00 às 9h00, respectivamente. Embora tenham ocorrido algumas lacunas no monitoramento, todas as exposições foram monitoradas à exceção da Primavera 2008 devido às falhas em um dos aparelhos.

O monitoramento das concentrações de ozônio também apresentou algumas lacunas (75 % dos dias de exposição foram efetivamente monitorados). Contudo, devido à utilização das concentrações de  $\text{O}_3$  nas análises estatísticas multivariadas, essas lacunas foram preenchidas com valores estimados. Para tanto, foram feitas análises de regressão linear entre

os dados de concentrações horárias obtidos no PEFI e em estações monitoras da CETESB localizadas em áreas que normalmente apresentam altos níveis de O<sub>3</sub>. Das estações monitoras comparadas com o PEFI (Ibirapuera, Mooca e IPEN), aquela que apresentou a maior explicabilidade para a variação dos dados foi a do Ibirapuera. As equações da reta utilizadas na estimativa dos valores ausentes são apresentadas na tabela 01. Ressalva-se que na exposição de Outono 2007 os dados de concentração estavam completos, não sendo necessário a realização de estimativas.

**Tabela 01.** Equações da reta utilizadas no cálculo dos dados ausentes de concentração de O<sub>3</sub> durante o período de outubro a dezembro de 2007 (Primavera 2008), janeiro a abril de 2008 (Verão 2008), abril a junho de 2008 (Outubro 2008), julho a setembro de 2008 (Inverno 2008) e outubro a dezembro de 2008 (Primavera 2008) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. ( $P < 0,001$ ) ( $n \approx 900$ )

<b>Exposições</b>	<b>Equação da reta</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>Primavera 2007</b>	$y = -0,571 + 0,564 x$	0,660
<b>Verão 2008</b>	$y = 0,616 + 0,465 x$	0,635
<b>Outono 2008*</b>	$y = 2,956 + 0,992 x$	0,897
<b>Inverno 2008</b>	$y = -0,084 + 0,855 x$	0,881
<b>Primavera 2008</b>	$y = 1,058 + 0,661 x$	0,851

\*na análise de regressão foram utilizados os valores obtidos na exposição de Outono 2007

Com os dados horários das concentrações de O<sub>3</sub> foram calculadas as médias e máximas diárias e as médias e máximas registradas no período de luz, ou seja, o período das 7h00 às 18h00 na exposição de Verão 2008 e das 7h00 às 17h00 nas demais.

Para uma melhor caracterização do período foram calculados três índices de exposição acumulada. Define-se 'exposição' como a concentração do poluente no ambiente medida por um período de tempo; e 'índice' como as medidas que procuram relacionar os danos causados à vegetação (menor crescimento e/ou perda na produtividade) a uma determinada concentração de ozônio visando à identificação de níveis críticos de exposição ("critical levels") (EPA 2006, Musselman *et al.* 2006). A United Nations Economic Commission for Europe (UN/ECE) define nível crítico como "a concentração de ozônio a partir da qual podem ocorrer efeitos adversos em plantas sensíveis baseado no conhecimento presente" (UN/ECE 1988). Uma vez que os índices cumulativos são os que melhor descrevem a relação: exposição ao O<sub>3</sub> / perda de produtividade, a UN/ECE, baseando-se em alguns estudos, estabeleceu como 'nível crítico' uma concentração limiar de 40 ppb de ozônio, a partir da qual a exposição acumulada se tornaria prejudicial, o índice resultante foi denominado de AOT40 (Accumulated exposure Over a Threshold of 40 ppb) (Fuhrer *et al.* 1997).

O cálculo da AOT40 considera as concentrações horárias de O<sub>3</sub> que ultrapassaram o nível crítico de 40 ppb durante as horas do dia em que a radiação solar é maior que 50 W m<sup>-2</sup>. A diferença entre a concentração horária e o nível crítico resulta em uma concentração horária excedente (por exemplo: 60 ppb – 40 ppb resultando em uma concentração excedente de 20 ppb) que é somada a outras concentrações horárias excedentes. No presente estudo foi calculada a AOT40 para cada exposição, contudo o termo foi traduzido para EAO<sub>F</sub> (Exposição Acumulada de Ozônio Fitotóxica) e a unidade de concentração ppb transformada em µg m<sup>-3</sup> (40 ppb = 78,4 µg m<sup>-3</sup>).

Além da EAO<sub>F</sub>, foram calculados os índices de exposição EAO<sub>10h</sub> (Exposição Acumulada de Ozônio no período das 7h00 às 17h00) que considera a soma das concentrações horárias de O<sub>3</sub> registradas durante o período das 7h00 às 17h00 (10 h) e o EAO<sub>24h</sub> (Exposição Acumulada de Ozônio no período das 0h00 as 24h00) que considera a soma das concentrações horárias de O<sub>3</sub> registradas durante o período de um dia (24 h).

### 3.4 Sintomas foliares visíveis

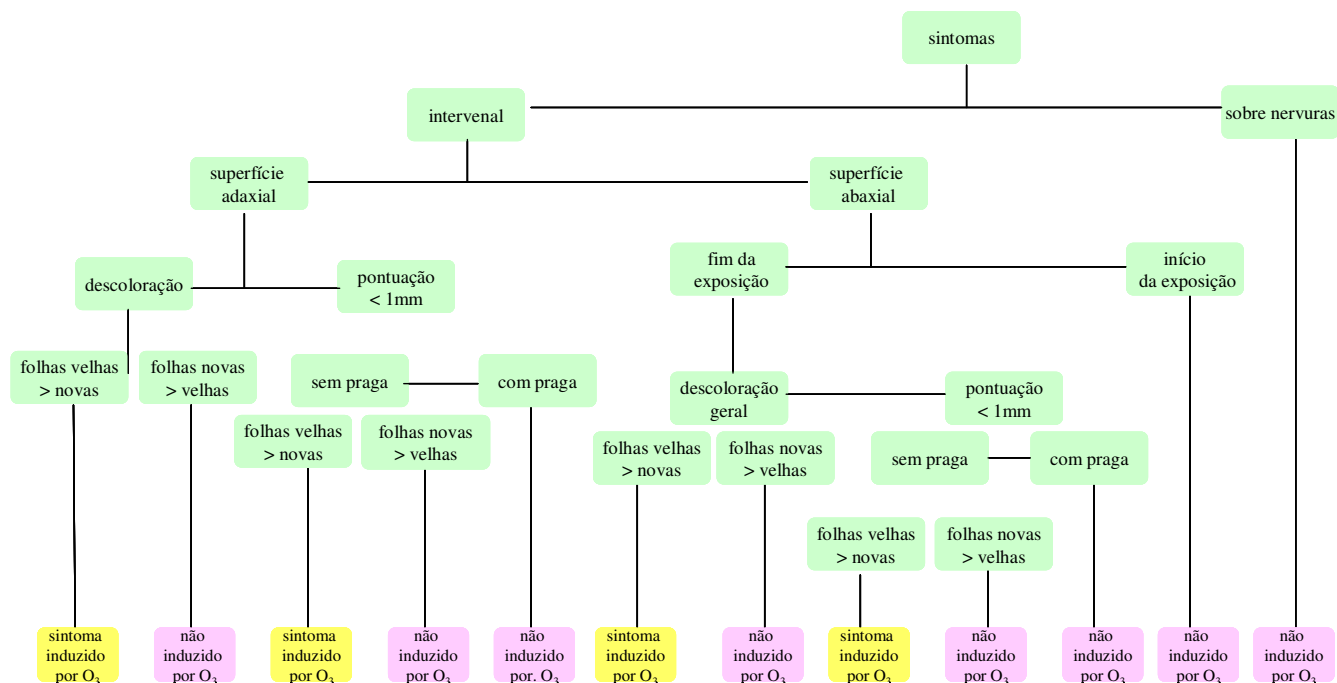
As avaliações da manifestação e da progressão de sintomas foliares visíveis em *Psidium guajava* 'Paluma' foram realizadas semanalmente. Após a manifestação dos primeiros sintomas, as avaliações foram realizadas conjuntamente com as medidas de trocas e da atividade antioxidante. Os critérios utilizados para classificar os sintomas foliares como induzidos pelo O<sub>3</sub> foram baseados na literatura de referência (Novak *et al.* 2003), os quais encontram-se reunidos na chave dicotômica apresentada na figura 13, e em estudos anteriores que analisaram a manifestação de sintomas induzidos por ozônio em 'Paluma' (Furlan *et al.* 2007, Pina & Moraes 2007).

Após o início da manifestação de sintomas foliares, foram calculadas a incidência e a severidade dos mesmos. Segundo Chappelka *et al.* (1997), a incidência é o número de indivíduos com sintomas foliares em porcentagem do número total de indivíduos e severidade é o número de folhas com danos em porcentagem do número total de folhas das plantas que possuem danos. Adicionalmente, foi estimada a porcentagem de área foliar ocupada pelos sintomas que eram então agrupadas em intervalos de: 1 – 5 % (classe 1), 6 – 25 % (classe 2), 26 – 50 % (classe 3), 51 – 75 % (classe 4) e 76 – 100 % (classe 5). Com os dados das classes de porcentagem foi calculado o Índice de Injúria Foliar (IIF), adaptado de El-Khatib (2003):

$$\text{IIF (\%)} = \frac{(N_1 \times 1) + (N_2 \times 2) + (N_3 \times 3) + (N_4 \times 4) + (N_5 \times 5)}{(N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5)} \times 100$$

Onde  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$ ,  $N_4$  e  $N_5$  representam a quantidade de folhas com sintomas classificados respectivamente na classe 1, classe 2, classe 3, classe 4 e classe 5; e  $N_0$  é o número de folhas que não apresentaram sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio.

A título de referência para a avaliação de sintomas foliares um lote de 'Paluma' foi sempre mantido na casa de vegetação sob ar filtrado. Em nenhum momento esses indivíduos apresentaram sintomas foliares visíveis que pudessem ser atribuídos ao ozônio. Os valores de incidência, severidade e IIF encontram-se listados no Anexo III.



**Figura 13.** Chave dicotômica para identificação dos sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em plantas sensíveis.

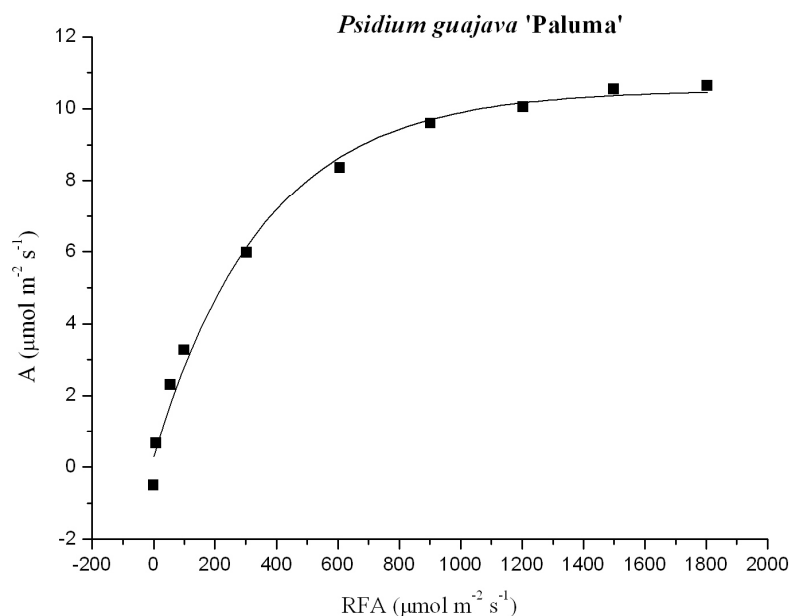
### 3.5 Trocas gasosas

As análises de trocas gasosas instantâneas foram feitas nas folhas referentes ao 3º nó contado a partir do ápice (o primeiro a apresentar folhas com o limbo totalmente expandido) e nas folhas referentes ao 4º e 5º nós contados a partir da base. A título de apresentação tais folhas foram denominadas respectivamente, como "folhas jovens" e "folhas maduras". No início dos períodos de exposição, as folhas jovens e maduras apresentavam, em média, um nó de distância uma da outra, ao passo que ao término da exposição esse valor era de, em média, 6 nós de distância.

As medidas de assimilação de  $\text{CO}_2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{\text{sat}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e concentração intercelular de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) foram

feitas com um analisador portátil de gases por infravermelho com fonte opcional de luz (*LCPPro+*, *ADC*<sup>®</sup>, UK) em área foliar de 6,25 cm<sup>2</sup> equivalente ao tamanho da câmara do analisador. O princípio da análise de gases por infravermelho reside na capacidade da molécula heteroatômicas, como o CO<sub>2</sub>, de absorverem energia na região do infravermelho em uma proporção relacionada à concentração do gás.

Com os dados de  $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$  e  $E$  foram calculadas a razão  $A_{\text{sat}}/E$  denominada de eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$ ) e a razão  $A_{\text{sat}}/g_s$  denominada de eficiência intrínseca do uso da água (EUA<sub>i</sub>,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ). Os parâmetros analisados ( $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i$ ) foram determinados sob concentração de CO<sub>2</sub> ambiente e sob densidade de fluxo de fótons saturante (800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) previamente determinada por meio de curva de resposta à luz (figura 14).



**Figura 14.** Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) em função da radiação fotossinteticamente ativa (RFA,  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para seis plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após 15 dias de campo.

As medidas de trocas gasosas foram feitas no período da manhã, entre 9h00 e 11h00 e sob concentração de CO<sub>2</sub> de cerca de 374 ppm. Após período de dois minutos para aclimação da folha às condições microclimáticas existentes dentro da câmara, eram tomadas seis medidas com intervalo de 10 segundos entre cada medida. O período de dois minutos para aclimação advém de testes conduzidos com a cultivar e baseado nas recomendações dispostas no manual do analisador de gases por infravermelho (ADC, 2006)

Em cada dia de análise foram medidas as trocas gasosas em seis indivíduos jovens. Ao longo do experimento foram realizados 44 dias de análises com ao menos uma semana de intervalo entre cada análise, sendo nove dias na exposição de Outono 2007, seis dias na exposição de Primavera 2007, nove dias na exposição de Verão 2008, sete dias na exposição de Outono 2008, cinco dias na exposição de Inverno 2008 e oito dias na exposição de Primavera 2008. Quando da ocorrência de chuvas ou de temperaturas excessivamente frias (entre 8 e 11 °C pela manhã) as trocas gasosas não foram medidas.

Os valores da  $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $C_i$ ,  $EUA$  e  $EUA_i$  obtidos no início e no final do período de exposição foram utilizados para calcular a porcentagem de variação relativa por meio da equação:  $[(\text{valor final} - \text{valor inicial}) / \text{valor inicial}] * 100$ . Os valores médios dos parâmetros de trocas gasosas encontram-se listados no Anexo III.

### **3.6 Atividade enzimática antioxidativa**

As análises da atividade enzimática antioxidativa foram conduzidas nas folhas maduras utilizadas na avaliação de trocas gasosas (4° e 5° nós contados a partir da base). As coletas do tecido foliar foram realizadas no período da manhã, aproximadamente às 11h00.

A atividade da enzima SOD foi determinada de acordo com o método proposto por Osswald *et al.* (1992) com algumas modificações. O material vegetal, cerca de 0,500 g de folhas frescas, foi homogeneizado com polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 6 ml de solução extração composta de 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH = 7,0), 1 mM de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), 50 mM de NaCl e 1 mM de ácido ascórbico. O extrato resultante foi centrifugado por 10 minutos na velocidade de 10.000 rpm sob temperatura de 2 °C. Finalizada a centrifugação, o extrato sobrenadante foi dividido em duas alíquotas para análise da atividade das enzimas SOD e APX e armazenados em freezer (-80 °C) até o momento da análise. Prosseguindo a análise, foram adicionados a um tubo de ensaio 100 µL de extrato foliar (oriundo de uma das alíquotas) e os reagentes EDTA, metionina, 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH = 7,0), azul *p*-nitrotetrazolio (NBT) e riboflavina. Os tubos de ensaio contendo a solução com extrato foliar foram expostos à luz fluorescente (80 W) por 15 minutos, enquanto que outros tubos contendo apenas os reagentes permaneceram no escuro (solução controle). A absorbância do extrato foi medida contra a absorbância da solução controle em espectrofotômetro UV/VIS com comprimento de onda a 560 nm. Os resultados foram expressos em unidades de enzima por grama de massa seca, Unidades SOD  $gMS^{-1}$ . Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de SOD que causa inibição de 50% na taxa de redução do NTB (Beauchamp & Fridovich 1971). O princípio do método reside na capacidade da enzima SOD, presente no extrato foliar, de inibir a redução



fotoquímica do NBT pelos radicais superóxidos oriundos da redução fotoquímica da riboflavina, ou seja, a SOD catalisa a reação de dismutação do  $O_2^-$  evitando a formação do composto NBT formazan que absorveria luz no comprimento de onda de 560 nm.

Para determinação da atividade da enzima APX foi utilizada a metodologia proposta por Asada (1984) com algumas modificações. O extrato foliar preparado anteriormente (parte da metodologia compartilhada com a SOD) foi adicionado a uma solução contendo 80 mM de tampão fosfato de potássio (pH = 7,0), 1 mM de EDTA, 10 mM de ácido ascórbico e 2 mM de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Após adição do extrato foliar à solução, foi realizada a leitura da reação em espectrofotômetro UV/VIS com comprimento de onda a 290 nm, por 2 minutos, em comparação com uma solução controle (somente os reagentes). Os resultados foram expressos em diferença de absorção por minuto por grama de massa seca,  $dA \text{ min}^{-1} \text{ gMS}^{-1}$ . O princípio do método reside na capacidade da enzima APX, existente no extrato foliar, de decompor o  $H_2O_2$  consumindo o ácido ascórbico presente na solução, molécula que absorveria luz no comprimento de onda 290 nm.

A atividade da enzima GR foi determinada segundo o método de Ramachandra Reddy *et al.* (2004). Para tanto, cerca de 0,300 g de folhas frescas foram homogenizadas com PVPP e 3 ml de solução contendo 50 mM tampão fosfato de potássio (pH = 7,8), 5 mM de ácido ascórbico, 5 mM de EDTA e 5 mM de dithiothreitol (DTT). O extrato resultante foi centrifugado por cerca de 10 minutos na velocidade de 10.000 rpm sob temperatura de 2 °C. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi armazenado e congelado em freezer (-80 °C) até o momento da análise. A determinação da atividade foi feita em uma mistura de reação contendo o extrato foliar, 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH = 7,5), 1 mM de DTNB, 0,1 mM de NADPH e 1 mM de glutathiona oxidada (GSSG) a 30 °C. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro UV/VIS com comprimento de onda a 412 nm por cerca de 20 segundos, em comparação com uma solução controle (somente os reagentes). Os resultados foram expressos em diferença de absorção por minuto por grama de massa seca,  $dA \text{ min}^{-1} \text{ gMS}^{-1}$ . O princípio do método reside na capacidade da enzima GR, presente no extrato foliar, de reduzir a glutathiona oxidada à glutathiona reduzida usando o NADPH como doador de elétrons. A glutathiona reduzida resultante se combina com o cromóforo ácido ditiobis nitrobenzóico (DTNB) passando a absorver luz no comprimento de onda de 412 nm.

A avaliação da atividade enzimática foi realizada nas folhas maduras de seis indivíduos jovens de 'Paluma' ao longo de todo experimento, à exceção da exposição de Outono 2007. Durante o experimento, a atividade da enzima SOD foi analisada em 36 dias distintos (oito dias na exposição de Primavera 2007, seis dias na exposição de Verão 2008, sete dias na exposição de Outono 2008, oito dias na exposição de Inverno 2008 e sete dias na

exposição de Primavera 2008), a atividade da APX foi analisada em 30 dias distintos (cinco dias na exposição de Primavera 2007, oito dias na exposição de Verão 2008, cinco dias na exposição de Outono 2008, sete dias na exposição de Inverno 2008 e cinco dias na exposição de Primavera 2008) e a atividade da GR foi analisada em 36 dias distintos (oito dias na exposição de Primavera 2007, sete dias na exposição de Verão 2008, oito dias na exposição de Outono 2008, seis dias na exposição de Inverno 2008 e sete dias na exposição de Primavera 2008). Os dias de análise apresentavam no mínimo uma semana de intervalo entre si. Os valores médios da atividade enzimática encontram-se listados no Anexo III.

### 3.7 Análise estatística

Primeiramente os dados obtidos nas exposições foram analisados quanto à existência de dados discrepantes (outliers), os quais foram retirados da amostragem. A definição dos outliers foi realizada por meio de análise subjetiva do conjunto de dados refinada por análise em programa estatístico Minitab (*Minitab Inc.*<sup>®</sup>).

Com o conjunto de dados resultantes foram realizadas análises de estatística descritiva (média e erro padrão) com auxílio do programa estatístico SigmaStat 3.1 (*SYSTAT Software Inc.*<sup>®</sup>).

Os dados de trocas gasosas e da atividade enzimática foram apresentados em gráficos do tipo box plot com auxílio do programa estatístico OriginPro 7.5 (*OriginLab Inc.*<sup>®</sup>). Nesse gráfico estatístico, a linha que divide o retângulo representa a mediana dos dados, as linhas horizontais inferior e superior indicam, respectivamente, os 25° e 75° percentis e as barras verticais indicam os valores mínimo e máximo (no gráficos de trocas) ou o 10° e 90° percentis (no gráfico da atividade antioxidativa). Outro gráfico estatístico utilizado foi o gráfico de contorno em três dimensões; para tanto os dados de três variáveis (DPV, concentração horária de ozônio e horas de exposição) foram transformados em uma matriz de correlação, a partir da qual foi criado o gráfico com auxílio do programa estatístico OriginPro 7.5.

Foram ainda feitas análises de correlação de Pearson entre a concentração horária de ozônio e o DPV e entre a  $A_{sat}$  e a  $g_s$ ; e análises de regressão linear entre os parâmetros de sintomas foliares (incidência, severidade e IIF) e os índices de exposição acumulada ( $EAO_F$ ,  $EAO_{10h}$  e  $EAO_{24h}$ ) com auxílio do programa estatístico SigmaStat 3.1.

As comparações entre os dados de trocas gasosas e da atividade enzimática obtidos em diferentes dias de uma mesma exposição foram feitas por meio de análise de variância unidirecional (one way Anova) por meio do programa estatístico SigmaStat 3.1. Quando o resultado da análise de variância mostrava a existência de diferença entre as médias, estas eram discriminadas pelo teste de Student-Newmann-Keuls. Antes de serem analisados os

dados eram testados quanto à normalidade (teste de Kolgomorov-Smirnov) e homoscedasticidade. O nível de significância adotado nas análises foi de  $P = 0,05$ .

As relações entre as variáveis bióticas e abióticas foram avaliadas por meio de análise multivariada de componentes principais (ACP) com os dados de trocas gasosas, com os dados da atividade enzimática e em conjunto com auxílio do programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences, SPSS®*). Foram feitas análises prévias para escolha dos dados a serem utilizados. Com os dados escolhidos foi feita uma reescalarização entre 0 e 1 ("ranging"), para posteriormente serem transformados em uma matriz de correlação, a partir da qual foi gerada a ACP. Em seguida, os escores do eixo 1 e 2 da ACP foram correlacionados com os dados de incidência, severidade e IIF. Na elaboração dos gráficos referentes às ACP foi utilizado o programa estatístico PAST 1.3 (Hammer *et al.* 2009).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Condições meteorológicas e qualidade do ar

A temperatura média e a umidade relativa do ar média no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga durante o período de estudo foram de, respectivamente, 19,4 °C e 79,6 %.

Os menores valores médios da temperatura mínima, média e máxima foram obtidos nas exposições de Inverno 2008 (12,3 °C, 17,2 °C e 24 °C, respectivamente) e de Outono 2008 (13,4 °C, 17,7 °C e 23,3 °C), ao passo que os maiores valores médios da temperatura mínima, média e máxima foram obtidos na exposição de Verão 2008 (17,4 °C, 21,3 °C e 26,7 °C) (tabela 02).

A variação das temperaturas mínimas e máximas diárias é apresentada na figura 15, onde se observa que as menores mínimas ocorreram nas exposições de Inverno 2008, Outono 2008 e Outono 2007 e que as maiores máximas ocorreram nas exposições de Primavera 2007 e 2008.

Em relação à umidade relativa, verifica-se que, enquanto na exposição de Inverno 2008 foram registrados os menores valores médios da umidade mínima, média e máxima (48,9 %, 76,3 % e 93,8 %), os maiores valores médios foram registrados na exposição de Verão 2008 (média de 81,8 % e mínima de 60,2 %) e na exposição de Outono 2007 (máxima de 95,4 %) (tabela 02). A variação da umidade mínima e máxima encontra-se na figura 16.

De acordo com o relatório do IAG/USP (2009), verifica-se que o período de estudo foi relativamente mais quente e mais seco que a normal climatológica (1961-1990).

**Tabela 02.** Médias diárias de temperatura (T, graus Celsius) e umidade relativa (UR, %) obtidas nos períodos de abril a junho de 2007 (Out/07), outubro a dezembro de 2007 (Pri/07), janeiro a abril de 2008 (Ver/08), abril a junho de 2008 (Out/08), julho a setembro de 2008 (Inv/08) e outubro a dezembro de 2008 (Pri/08) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga\*

	Out/07	Pri/07	Ver/08	Out/08	Inv/08	Pri/08	
<b>T</b>	média das mínimas	16,0	15,8	17,4	13,4	12,3	16,0
	média das médias	20,1	20,3	21,3	17,7	17,2	20,2
	média das máximas	26,2	25,9	26,7	23,3	24,0	26,2
<b>UR</b>	média das mínimas	53,3	59,9	60,2	56,7	48,9	56,0
	média das médias	79,3	80,9	81,8	80,3	76,3	79,6
	média das máximas	95,4	94	94	94,7	93,8	94,4

\* fonte: IAG/USP

A precipitação pluviométrica não esteve igualmente distribuída no período de estudo (figura 17). Durante as exposições de Outono 2007, Primavera 2007, Verão 2008, Outono

2008, Inverno 2008 e Primavera 2008 foi verificado acúmulo de, respectivamente, 119 mm, 369 mm, 483 mm, 185 mm, 130 mm e 257 mm de precipitação (tabela 03). Comparando com a normal climatológica para o período de 1961-1990 (IAG/USP 2009), observa-se que a precipitação acumulada anual foi próxima a da norma climatológica com oscilações mensais de valores acima e abaixo da média. Desse período, destaca-se o mês de julho que apresentou o menor volume de precipitação de toda série histórica da Estação Meteorológica do IAG/USP.

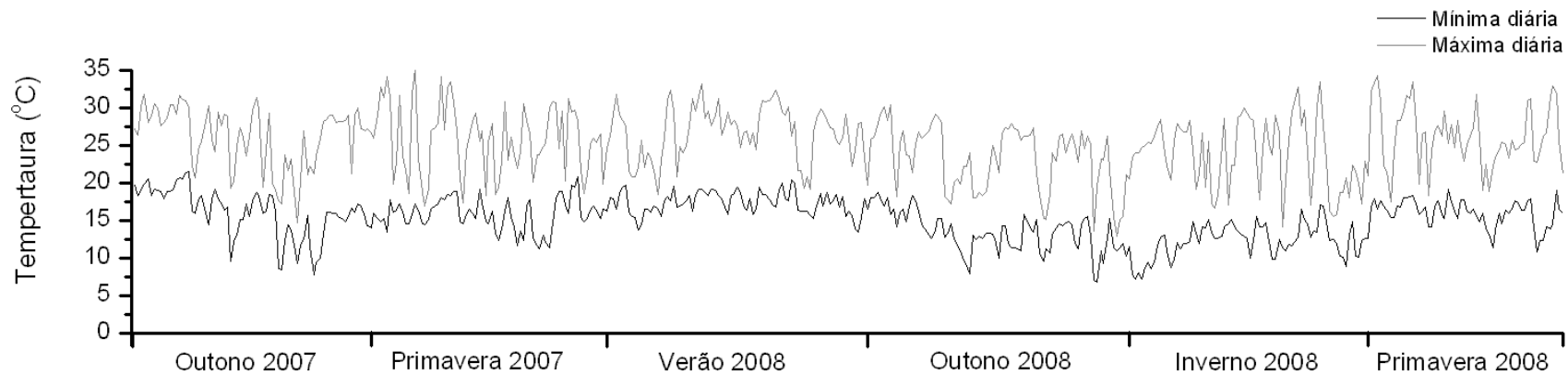
A irradiação solar global média foi maior nas exposições de Primavera 2007, Primavera 2008 e Verão 2008 (tabela 03). A variação da irradiação durante o período de análise encontra-se na figura 18.

A velocidade média dos ventos, considerando todas as exposições, foi de 6,2 km h<sup>-1</sup> com direção dominante leste-sudeste (ESE) e sudeste (SE) (tabela 03).

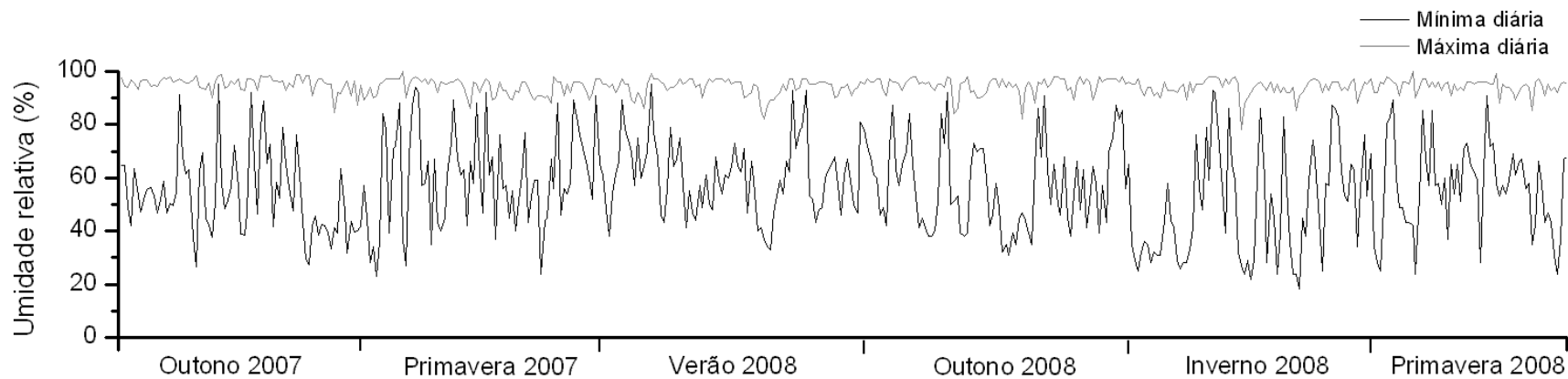
**Tabela 03.** Precipitação pluviométrica acumulada (mm), irradiação solar global média (MJ m<sup>-2</sup>), pressão atmosférica média (mmHg), velocidade média dos ventos (vel., km h<sup>-1</sup>) e direção dominante (dir.) obtidas nos períodos de abril a junho de 2007 (Out/07), outubro a dezembro de 2007 (Pri/07), janeiro a abril de 2008 (Ver/08), abril a junho de 2008 (Out/08), julho a setembro de 2008 (Inv/08) e outubro a dezembro de 2008 (Pri/08) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga\*

	<b>Out/07</b>	<b>Pri/07</b>	<b>Ver/08</b>	<b>Out/08</b>	<b>Inv/08</b>	<b>Pri/08</b>
<b>Precipitação</b>	118,6	369,3	483,3	185,3	130,2	257,5
<b>Irradiação</b>	13,1	17,3	15,8	12,2	14,5	18,4
<b>Pressão</b>	695,6	692,8	692,8	695	695,9	693,5
<b>Ventos</b> <b>vel.</b>	5,6	6,7	6,4	5,7	6,0	6,9
<b>dir.</b>	NW	ESE	E	ESE	SE	SE

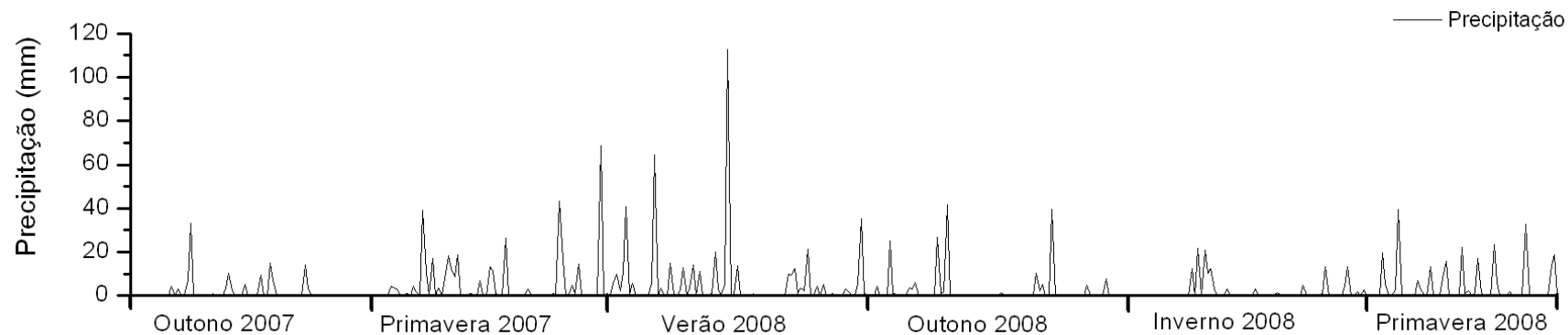
\* fonte: IAG/USP



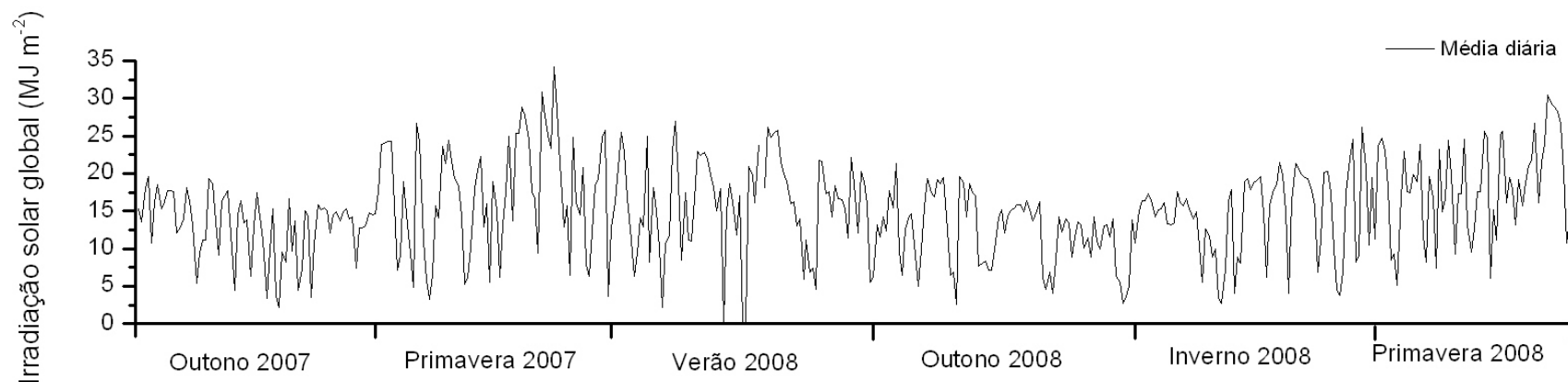
**Figura 15.** Variação da temperatura diária máxima e mínima durante as exposições de Outono 2007 (abr/jun 2007), Primavera 2007 (out/dez 2007), Verão 2008 (jan/abr 2008), Outono 2008 (abr/jun 2008), Inverno 2008 (jul/set) e Primavera 2008 (out/dez 2008) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Fonte: IAG/USP.



**Figura 16.** Variação da umidade relativa diária máxima e mínima durante as exposições de Outono 2007 (abr/jun 2007), Primavera 2007 (out/dez 2007), Verão 2008 (jan/abr 2008), Outono 2008 (abr/jun 2008), Inverno 2008 (jul/set) e Primavera 2008 (out/dez 2008) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Fonte: IAG/USP.



**Figura 17.** Variação da precipitação durante as exposições de Outono 2007 (abr/jun 2007), Primavera 2007 (out/dez 2007), Verão 2008 (jan/abr 2008), Outono 2008 (abr/jun 2008), Inverno 2008 (jul/set) e Primavera 2008 (out/dez 2008) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Fonte: IAG/USP.



**Figura 18.** Variação da irradiação solar global durante as exposições de Outono 2007 (abr/jun 2007), Primavera 2007 (out/dez 2007), Verão 2008 (jan/abr 2008), Outono 2008 (abr/jun 2008), Inverno 2008 (jul/set) e Primavera 2008 (out/dez 2008) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Fonte: IAG/USP.

No período de estudo, as maiores concentrações médias e máximas de dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) e de monóxido de nitrogênio (NO) ocorreram nas exposições de Inverno 2008, de Outono 2008 e de Outono 2007 (tabela 04).

As concentrações de NO<sub>2</sub> verificadas no PEFI ultrapassaram o Padrão Primário e Secundário de qualidade do ar (respectivamente 320 µg m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> e 190 µg m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, Resolução CONAMA 03/1990) nas exposições de Outono 2008 (5 ultrapassagens do Padrão Secundário e 1 ultrapassagem do Padrão Primário) e Inverno 2008 (8 ultrapassagens do Padrão Secundário e 2 ultrapassagens do Padrão Primário). Embora o NO não possua padrão legal para qualidade do ar, ele é um poluente importante no ciclo fotoquímico de formação do O<sub>3</sub>.

Em relação à concentração de ozônio (O<sub>3</sub>), observa-se que as maiores médias ocorreram nas exposições de Outono 2007, Inverno 2008, e Primavera 2008 (tabela 04 e figura 19). As exposições de Outono 2008, Verão 2008 e Primavera 2007 apresentaram as maiores concentrações máximas de O<sub>3</sub> (tabela 04), contudo os episódios de concentrações mais altas ficaram restritos a alguns dias dos períodos de exposição (figura 19).

**Tabela 04.** Concentração média e máxima dos poluentes dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>, µg m<sup>-3</sup>), monóxido de nitrogênio (NO, µg m<sup>-3</sup>) e ozônio (O<sub>3</sub>, µg m<sup>-3</sup>) durante o período de 24h (24h), das 7h00 às 12h00 (5 h), das 7h00 às 9h00 (2 h) e o período das 7h00 às 17h00 (10 h) nos meses de abril a junho de 2007 (Out/07), de outubro a dezembro de 2007 (Pri/07), de janeiro a abril de 2008 (Ver/08), de abril a junho de 2008 (Out/08), de julho a setembro de 2008 (Inv/08) e de outubro a dezembro de 2008 (Pri/08) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga\*\*

		Out/07	Pri/07	Ver/08	Out/08	Inv/08	Pri/08
NO <sub>2</sub>	média 24 h	27	12	21	49	54	nd
	máxima 24 h	135	95	115	401	377	nd
	média 5 h	29	16	29	268	68	nd
	máxima 5 h	135	95	115	327	377	nd
NO	média 24 h	29	7	5	23	38	nd
	máxima 24 h	445	186	96	407	339	nd
	média 2 h	43	12	14	47	55	nd
	máxima 2 h	272	175	96	337	331	nd
O <sub>3</sub>	média 24 h	26	21	14	18	26	26
	média 10 h	41	28	20*	27	39	36
	máxima 24 e 10 h	176	216	260	271	137	157

nd – não determinado

\*excepcionalmente período da 7h00 às 18h00

\*\* fonte: CETESB

O perfil diário das concentrações horárias médias de O<sub>3</sub> obtidas no PEFI mostra a variação diária característica desse poluente, ou seja, uma concentração mínima por volta do alvorecer, passando por um aumento no início da manhã com ápice por volta das 14h00 e declínio na parte da tarde até pouco depois do ocaso. Na madrugada ocorre um suave aumento na concentração seguido de um decréscimo (figura 20). O perfil diário também



mostra que as maiores médias horárias ocorreram na exposição de Inverno 2008, seguida pelas exposições de Outono 2007 e de Primavera 2008 (figura 20).

A correlação (Pearson) entre as concentrações horárias de ozônio e os valores horários do DPV, obtidos no período das 7h00 às 17h00 horas, resultou em um coeficiente de correlação de 0,743 na exposição Outono 2007, de 0,481 na exposição Primavera 2007, de 0,482 na exposição Verão 2008, de 0,404 na exposição Outono 2008, de 0,737 na exposição Inverno 2008 e de 0,590 na exposição Primavera 2008 ( $P < 0,0001$ ).

O Padrão Primário de qualidade do ar instituído para o  $O_3$  ( $160 \mu\text{g m}^{-3}$  horário de  $O_3$ , Resolução CONAMA 03/1990) foi ultrapassado 15 vezes, enquanto o Nível de Atenção ( $200 \mu\text{g m}^{-3}$  horário de  $O_3$ , Decreto Estadual 8.468/1976) foi ultrapassado oito vezes (tabela 05). O maior número de ultrapassagens ocorreu durante a exposição de Outono 2008 (seis ultrapassagens do Padrão Primário e quatro do Nível de Atenção) (tabela 05).

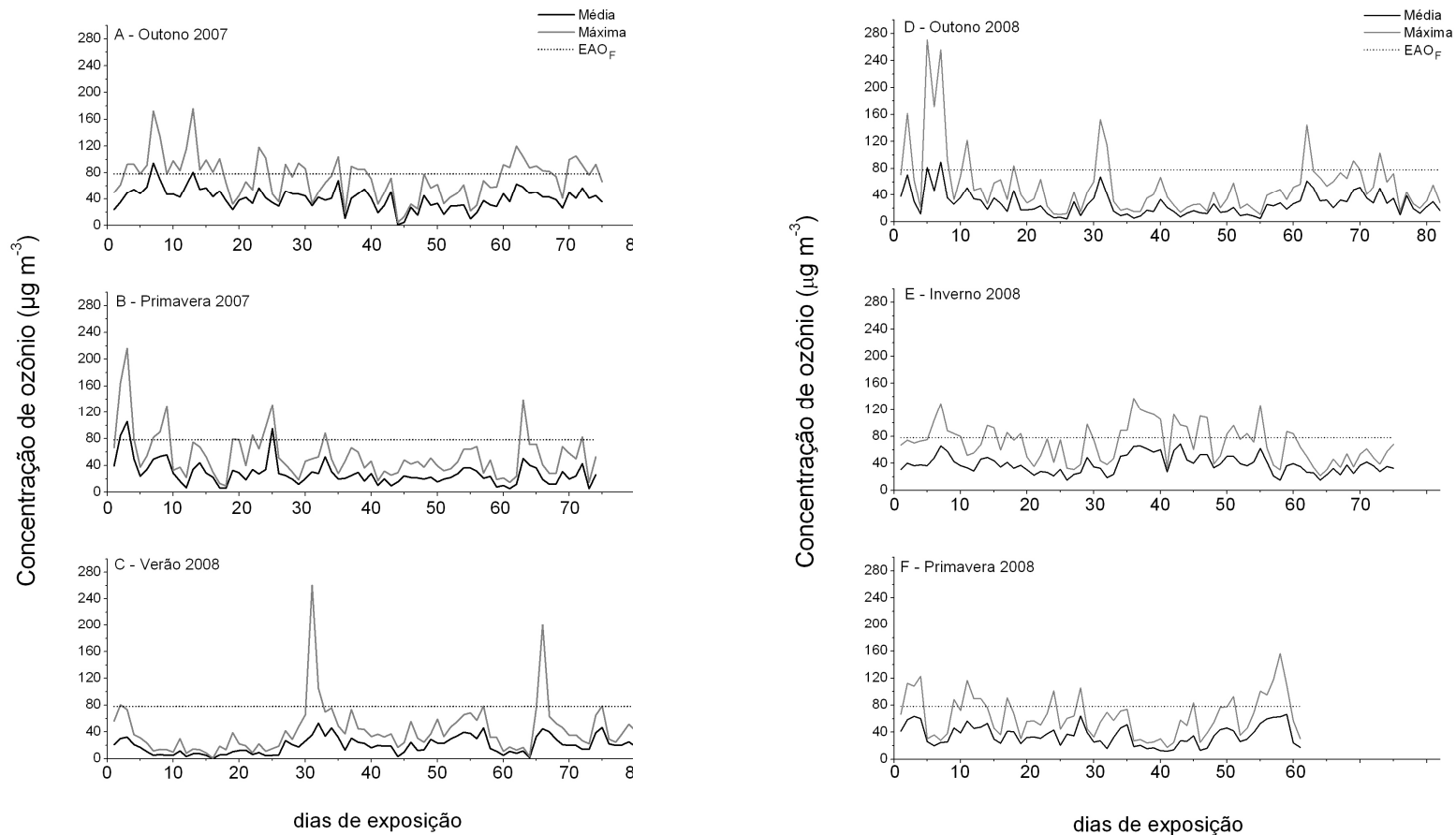
No período de estudo, os maiores valores da  $EAO_F$  (exposição acumulada de  $O_3$  acima de  $78,4 \mu\text{g m}^{-3}$ ) foram obtidos nas exposições de Outono 2007 ( $1.942 \mu\text{g m}^{-3}$ ), Outono 2008 ( $1.744 \mu\text{g m}^{-3}$ ) e Inverno 2008 ( $1.537 \mu\text{g m}^{-3}$ ), enquanto o menor valor foi obtido na exposição de Verão 2008 ( $382 \mu\text{g m}^{-3}$ ) (tabela 05). Observa-se que os episódios de concentração de ozônio acima de  $78,4 \mu\text{g m}^{-3}$  ficaram restritos a alguns momentos das exposições (figura 21).

Similarmente à  $EAO_F$ , o índice de exposição acumulada que considera as concentrações obtidas no período das 7h00 às 17h00,  $EAO_{10h}$ , registrou maiores valores durante as exposições de Outono 2007 ( $32.673 \mu\text{g m}^{-3}$ ) e Inverno 2008 ( $31.478 \mu\text{g m}^{-3}$ ) e menor valor na exposição de Verão 2008 ( $18.807 \mu\text{g m}^{-3}$ ) (tabela 05). Na exposição de Outono 2008, que apresentou a segunda maior  $EAO_F$ , foi obtido um  $EAO_{10h}$  de somente  $23.835 \mu\text{g m}^{-3}$  (tabela 05).

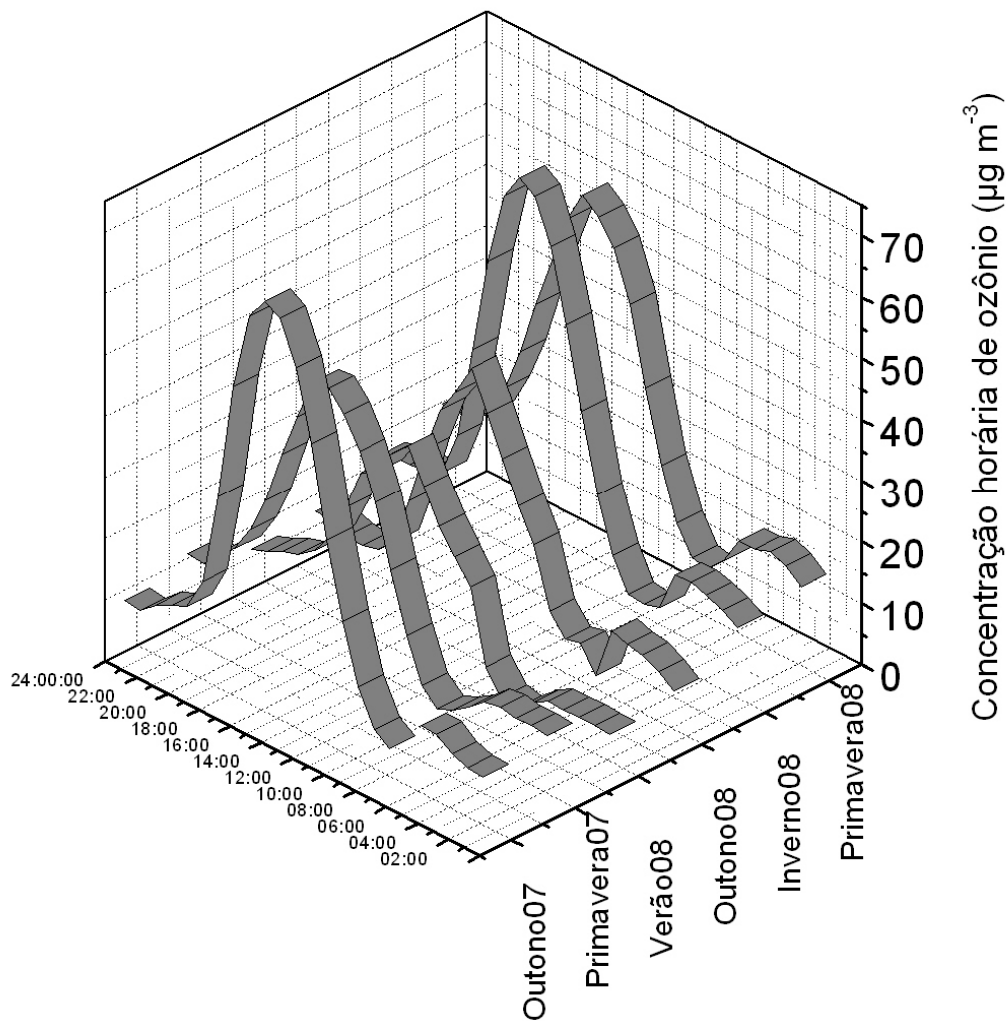
**Tabela 05.** Número de ultrapassagens do Padrão Primário de qualidade do ar ( $160 \mu\text{g m}^{-3}$ ), número de ultrapassagens do Nível de Atenção ( $200 \mu\text{g m}^{-3}$ ), exposição horária acumulada de ozônio acima de  $78,4 \mu\text{g m}^{-3}$  horário ( $EAO_F$ ) e exposição horária acumulada de ozônio entre as 7h00 e 17h00 s ( $EAO_{10h}$ ) durante os meses de abril a junho de 2007 (Out/07), outubro a dezembro de 2007 (Pri/07), janeiro a abril de 2008 (Ver/08), abril a junho de 2008 (Out/08), julho a setembro de 2008 (Inv/08) e outubro a dezembro de 2008 (Pri/08) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Fonte: CETESB

	Out/07	Pri/07	Ver/08	Out/08	Inv/08	Pri/08
<b>Padrão Primário</b>	2	4	3	6	0	0
<b>Nível de Atenção</b>	0	2	2	4	0	0
<b><math>EAO_F</math> (<math>\mu\text{g m}^{-3}</math>)</b>	1.942	1.297	382	1.744	1.537	983
<b><math>EAO_{10h}</math> (<math>\mu\text{g m}^{-3}</math>)</b>	32.673	22.629	18.807*	23.835	31.478	23.735

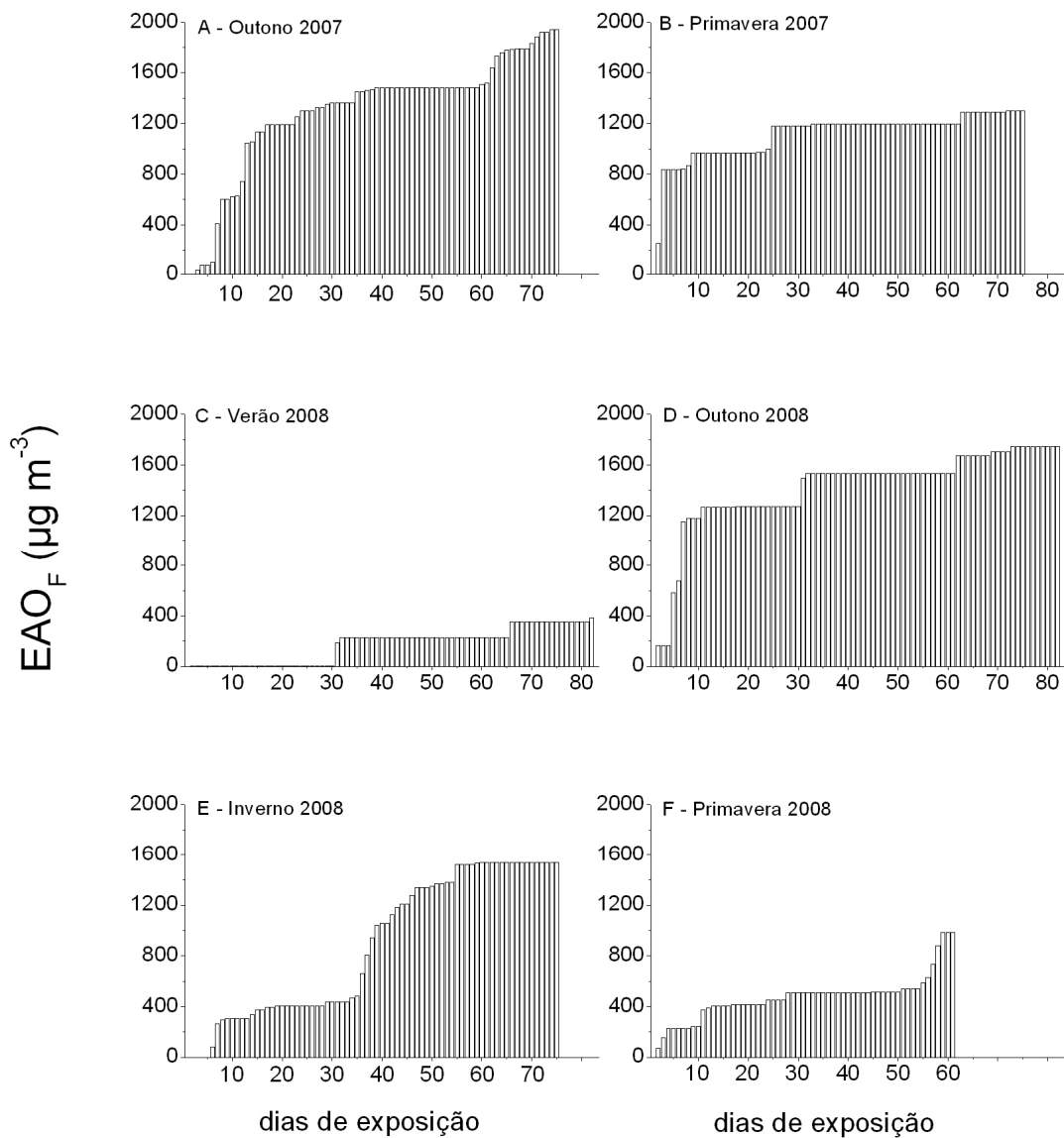
\*período das 7h00 às 18h00.



**Figura 19.** Variação da concentração média e máxima de ozônio, em  $\mu\text{g m}^{-3}$ , verificada no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, durante o período das 7h00 às 17h00, nos meses de abril a junho de 2007 (A - Outono 2007), outubro a dezembro de 2007 (B - Primavera 2007), abril a junho de 2008 (D - Outono 2008), julho a setembro de 2008 (E - Inverno 2008) e outubro a dezembro de 2008 (F - Primavera 2008); e durante o período das 7h00 às 18h00 nos meses de janeiro a abril de 2008 (C - Verão 2008). A linha tracejada representa a concentração de ozônio equivalente a  $78,4 \mu\text{g m}^{-3}$  ( $\text{EAO}_F$ ). Fonte: CETESB



**Figura 20.** Perfil diário das concentrações horárias médias de ozônio durante os meses de abril a junho de 2007 (Outono 2007), outubro a dezembro de 2007 (Primavera 2007), janeiro a abril de 2008 (Verão 2008), abril a junho de 2008 (Outono 2008), julho a setembro de 2008 (Inverno 2008) e outubro a dezembro de 2008 (Primavera 2008) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Fonte: CETESB.



**Figura 21.** Variação da exposição acumulada de ozônio acima de  $78,4 \mu\text{g m}^{-3}$  ( $\text{EAO}_F$ ) durante os meses de abril a junho de 2007 (A - Outono 2007), outubro a dezembro de 2007 (B - Primavera 2007), janeiro a abril de 2008 (C - Verão 2008), abril a junho de 2008 (D - Outono 2008), julho a setembro de 2008 (E - Inverno 2008) e outubro a dezembro de 2008 (F - Primavera 2008) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. Fonte: CETESB.

## 4.2. Sintomas foliares visíveis

Os sintomas foliares visíveis induzidos por  $O_3$  em *Psidium guajava* 'Paluma' se caracterizavam como pontuações intervenais vermelho-amarronzadas na superfície adaxial e foram observados durante todas as exposições (figuras 22 a 24). Inicialmente, eles abrangiam uma pequena parte do limbo de folhas mais maduras. Com o decorrer da exposição e acúmulo das concentrações fitotóxicas de ozônio, os sintomas passaram a ocupar uma maior área foliar e a atingir também folhas mais novas, restringindo-se, no entanto, à superfície adaxial (figuras 25, 26 e 27). Não foram observados sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio nas plantas jovens de 'Paluma' que permaneceram no interior da casa de vegetação (figura 28).

A concentração acumulada de  $O_3$  e o número de dias que antecederam a manifestação inicial de sintomas foliares variaram entre as diferentes exposições. Dessa maneira, os indivíduos jovens de 'Paluma' da exposição de Outono 2007 foram os que mais rapidamente apresentaram sintomas foliares, após 9 dias de exposição,  $EAO_F$  (exposição acumulada de ozônio acima de  $78,4 \mu\text{g m}^{-3} \text{ h}$ ) de  $602 \mu\text{g m}^{-3}$  e  $EAO_{10h}$  (exposição acumulada de ozônio entre 7:00 e 17:00) de  $5.251 \mu\text{g m}^{-3}$  (tabela 06). Nas exposições de Outono 2008, Primavera 2007 e Inverno 2008, o desenvolvimento de sintomas foliares em 'Paluma' ocorreu mais tardiamente, após, respectivamente, 40, 33 e 33 dias de exposição,  $EAO_F$  de 1.528, 1.194 e  $437 \mu\text{g m}^{-3}$  e  $EAO_{10h}$  de 12.363, 12.552 e  $12.844 \mu\text{g m}^{-3}$  (tabela 06). Peculiarmente, na exposição de Verão 2008, a manifestação de sintomas foliares em 'Paluma' ocorreu após 19 dias de exposição e  $EAO_F$  de  $2 \mu\text{g m}^{-3}$  (tabela 06).

**Tabela 06.** Número de dias, exposição horária acumulada de ozônio acima de  $78,4 \mu\text{g m}^{-3}$  ( $EAO_F$ ) e exposição horária acumulada de ozônio entre às 7h00 e 17h00 ( $EAO_{10h}$ ) que antecederam a manifestação de sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, durante as exposições de Outono 2007 (Out/07), Primavera 2007 (Pri/07), Verão 2008 (Ver/08), Outono 2008 (Out/08), Inverno 2008 (Inv/08) e Primavera 2008 (Pri/08)

	Out/07	Pri/07	Ver/08	Out/08	Inv/08	Pri/08
<b>número de dias</b>	9	33	19	40	33	26
<b><math>EAO_F</math> (<math>\mu\text{g m}^{-3}</math>)</b>	602	1.194	2	1.528	437	452
<b><math>EAO_{10h}</math> (<math>\mu\text{g m}^{-3}</math>)</b>	5.251	12.552	2.537*	12.363	12.844	10.946

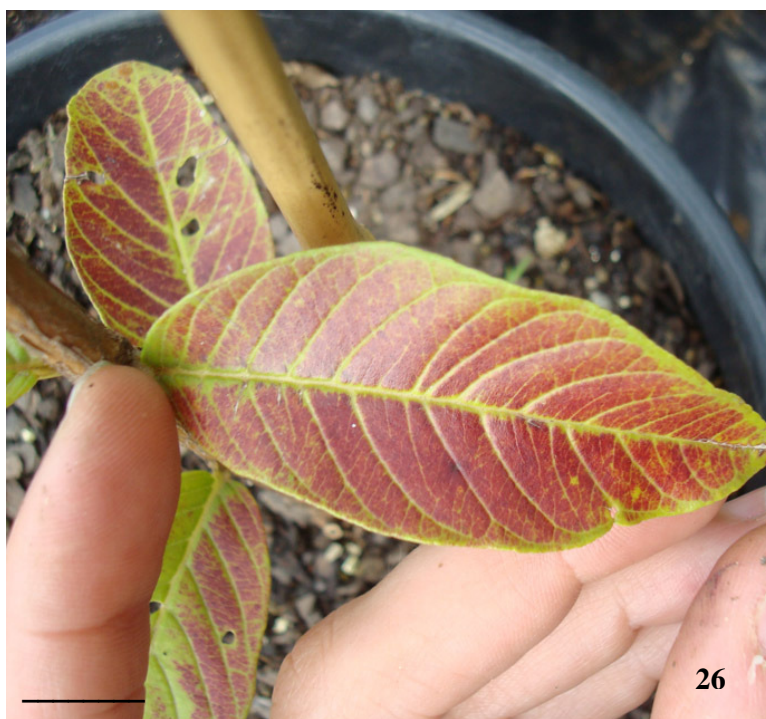
\*período das 7h00 às 18h00.



**Figuras 22 a 24.** Sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga durante o período de abril de 2007 a dezembro de 2008. (22) referente à exposição de Outono 2008 2º nó; (23) referente a exposição de Outono 2008 3º nó; (24) referente à exposição de Verão 2008 2º nó. Escala: 1,5 cm.



**Figura 25.** Sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga durante a exposição de Verão 2008. Escala: 1,0 cm.



**Figuras 26 e 27.** Sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma', folha referente ao 2º nó, expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga durante a exposição de Primavera 2007. Escala: 1,5 cm.





**Figura 28.** Plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no interior da casa de vegetação. Foto referente à exposição de Outono 2007.

As figuras 29, 30 e 31 apresentam a relação potencial entre o DPV horário e a concentração horária de ozônio no período que antecedeu a manifestação de sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em 'Paluma' nas diferentes exposições, onde sobressai que altas concentrações de O<sub>3</sub> estiveram associadas a altos DPV e que períodos de baixos DPV antecederam a manifestação dos sintomas foliares.

A variação da incidência, severidade e do índice de injúrias foliar (IIF) ao longo das exposições, é apresentada na figura 32 (os valores encontram-se no Anexo III). Observa-se que nas exposições de Primavera 2007, Verão 2008 e Inverno 2008 a incidência final foi de 100 % dos indivíduos jovens de 'Paluma' (figura 32). Os maiores valores de severidade e do IIF ocorreram nas exposições de Outono 2007 e Primavera 2007 (figura 32). No final da exposição de Primavera 2008, os valores dos parâmetros de sintomas foliares zeraram, pois as folhas que apresentavam sintomas foliares visíveis caíram na última semana de análise (figura 32).

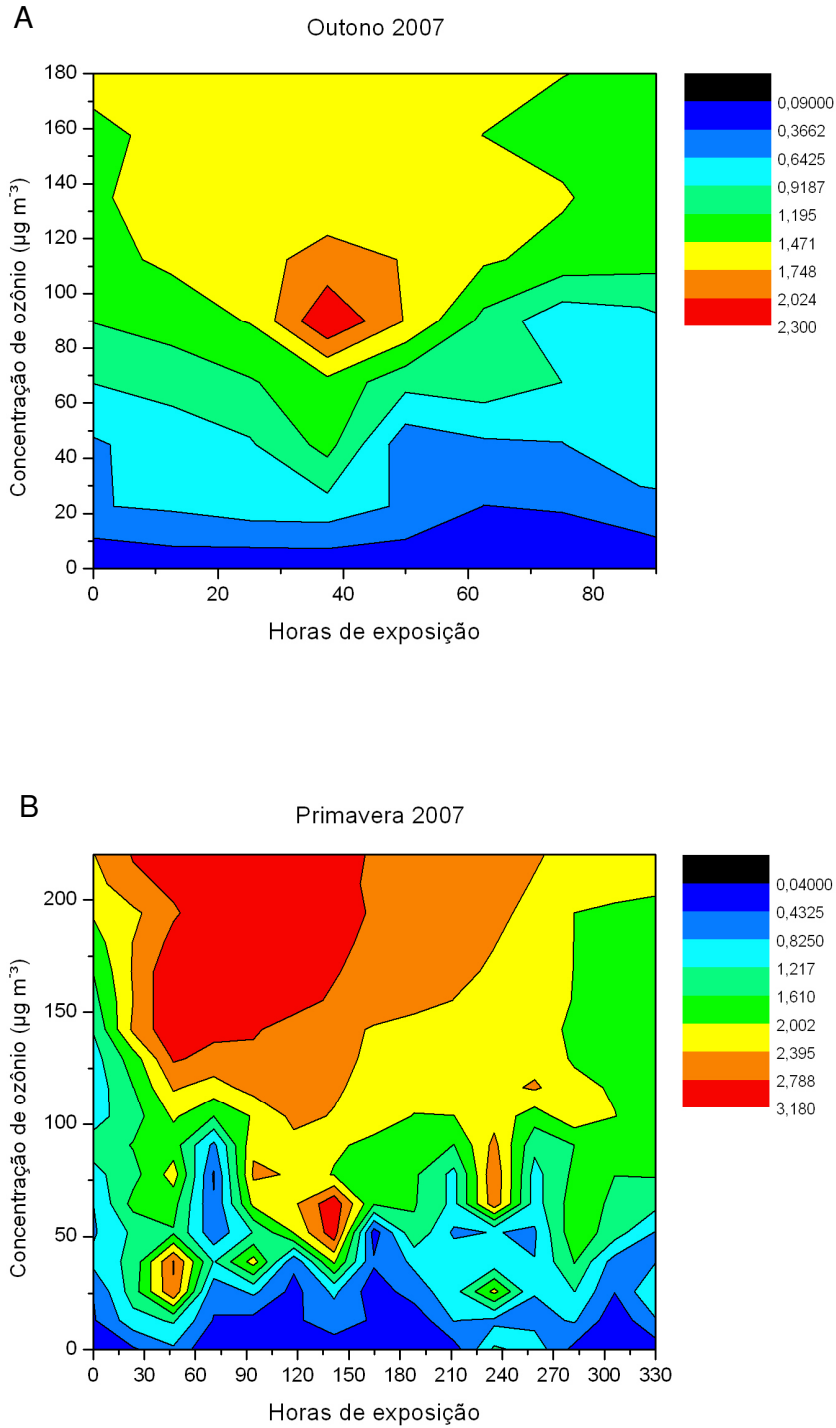
A análise de regressão linear entre os parâmetros de sintomas foliares e de concentração de ozônio resultou em uma associação positiva significativa (tabela 07). No entanto, os valores do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foram baixos indicando que somente uma pequena parte da variação dos sintomas foliares pode ser explicada unicamente pela variação da concentração de O<sub>3</sub> (tabela 07).

**Tabela 07.** Coeficientes de determinação e equação da reta obtidos entre os sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' (incidência, severidade e índice de injúria foliar - IIF) e a exposição ao ozônio (exposição horária acumulada acima de 78,4  $\mu\text{g m}^{-3}$ , EAO<sub>F</sub>; exposição horária acumulada entre às 7h00 e 17:00, EAO<sub>10h</sub>; exposição horária acumulada entre às 0h00 e 24h00, EAO<sub>24h</sub>) ( $P < 0,05$ ) ( $n = 42$ )\*

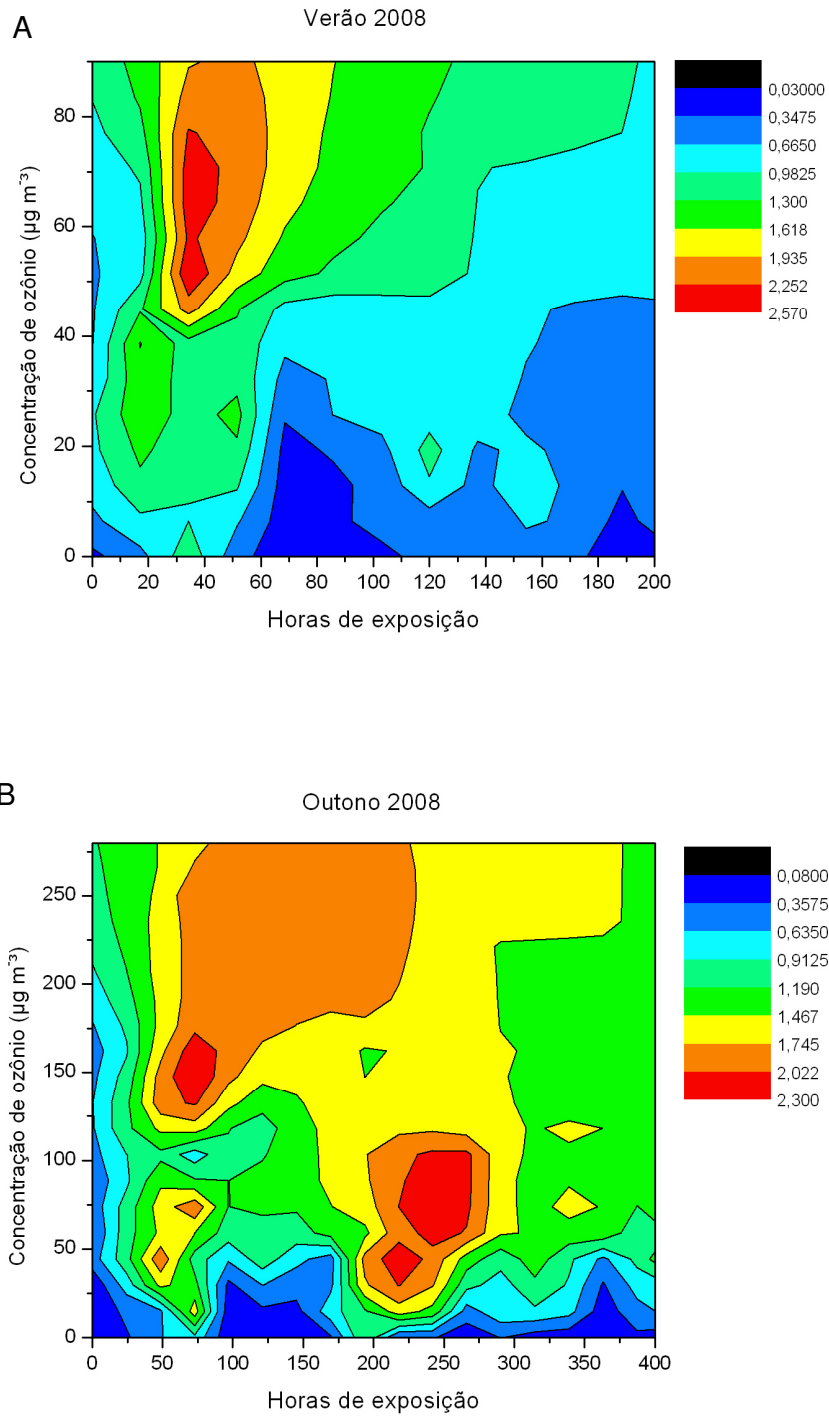
Parâmetros		r <sup>2</sup>	Equação
Incidência	EAO <sub>F</sub>	0,10	$y = 25,724 + 0,0393 x$
	EAO <sub>10h</sub>	0,23	$y = 3,171 + 0,00274 x$
	EAO <sub>24h</sub>	0,24	$y = 2,288 + 0,00174 x$
Severidade	EAO <sub>F</sub>	ns**	
	EAO <sub>10h</sub>	0,12	$y = 8,325 + 0,000182 x$
	EAO <sub>24h</sub>	0,16	$y = 7,796 + 0,000147 x$
IIF	EAO <sub>F</sub>	0,15	$y = 2,623 + 0,00252 x$
	EAO <sub>10h</sub>	0,26	$y = 1,550 + 0,0001366 x$
	EAO <sub>24h</sub>	0,30	$y = 1,365 + 0,000102 x$

\*não foram considerados os dados da última semana da Primavera 2008

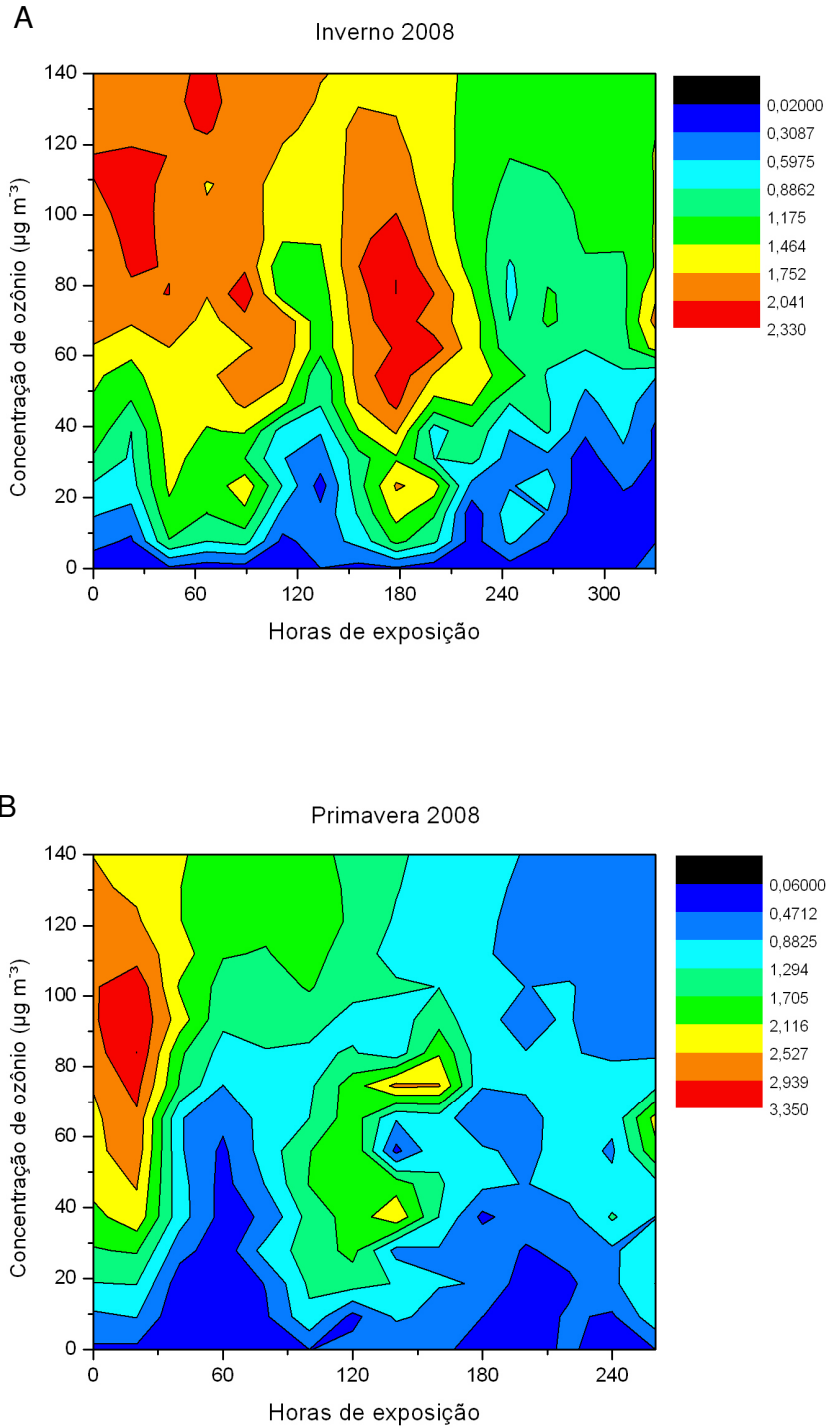
\*\*ns - relação não significativa



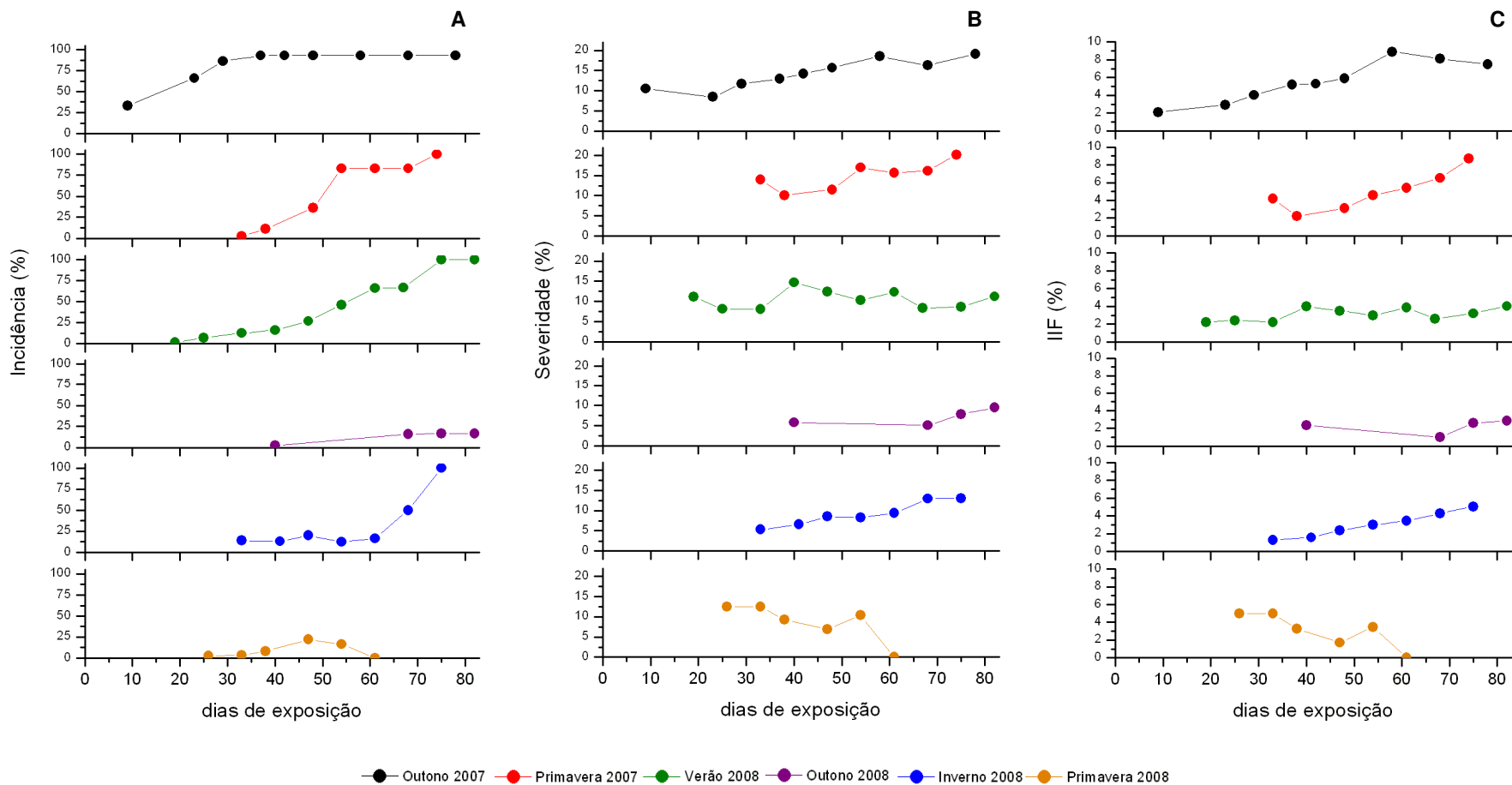
**Figura 29.** Gráfico de contorno indicando o período que antecedeu a manifestação de sintomas foliares (eixo x, horas de exposição), a exposição ao ozônio (eixo y, concentração horária de ozônio entre o período das 7h00 às 17:00) e o déficit de pressão de vapor horário entre o período das 7h00 às 17h00 (eixo z, em kPa, escala de cores à direita) para as exposições de Outono 2007 (A) e de Primavera 2007 (B).



**Figura 30.** Gráfico de contorno indicando o período que antecedeu a manifestação de sintomas foliares (eixo x, horas de exposição), a exposição ao ozônio (eixo y, concentração horária de ozônio entre o período das 7h00 às 17h00) e o déficit de pressão de vapor horário entre o período das 7h00 às 17h00 (eixo z, em kPa, escala de cores à direita) para as exposições de Verão 2008 (A) e de Outono 2008 (B).



**Figura 31.** Gráfico de contorno indicando o período que antecedeu a manifestação de sintomas foliares (eixo x, horas de exposição), a exposição ao ozônio (eixo y, concentração horária de ozônio entre o período das 7h00 às 17h00) e o déficit de pressão de vapor horário entre o período das 7h00 às 17h00 (eixo z, em kPa, escala de cores à direita) para as exposições de Inverno 2008 (A) e de Primavera 2008 (B).



**Figura 32.** Incidência (A.), severidade (B) e índice de injúria foliar (C) verificados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' durante as exposições de Outono 2007 (abril a junho de 2007), Primavera 2007 (outubro a dezembro de 2007), Verão 2008 (janeiro a abril de 2008), Outono 2008 (abril a junho de 2008), Inverno 2008 (julho a setembro de 2008) e Primavera 2008 (outubro a dezembro de 2008), no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga.

### 4.3. Trocas Gasosas

Durante o período de estudo, observou-se a ocorrência de variações significativas nos parâmetros de trocas gasosas obtidos nas folhas jovens (referente ao 3º nó a partir do ápice) e maduras (referente ao 4º e 5º nós a partir da base) de *Psidium guajava* 'Paluma'.

#### 4.3.1. Outono 2007

A assimilação de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ) obtida nas folhas jovens de 'Paluma' mostrou-se estatisticamente igual durante as análises realizadas na exposição de Outono 2007 (figura 33). As folhas maduras, por sua vez, apresentaram uma redução significativa na  $A_{sat}$  após 23 dias de exposição (figura 34).

No tocante à condutância estomática ( $g_s$ ), observa-se que ambas as folhas analisadas apresentaram uma redução significativa ao final do período considerando os valores de  $g_s$  obtidos no início do experimento (médias de 0,68 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> no primeiro dia de análise e 0,35 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> no último dia de análise nas folhas jovens e médias de 0,45 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> no primeiro dia de análise e 0,28 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> no último dia de análise nas folhas maduras) (figuras 33 e 34).

A transpiração (E) apresentada pelas folhas jovens e maduras no final do Outono 2007 foi estatisticamente igual à transpiração obtida no início da exposição (2,83 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 2,50 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nas folhas jovens e 2,47 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 2,28 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nas folhas maduras) (figuras 33 e 34). Observa-se, no entanto, que ambas as folhas mostraram no 29º dia de exposição os menores valores de E do período (1,21 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nas folhas jovens e 1,63 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nas folhas maduras) (figuras 33 e 34).

Em relação à concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), verifica-se que as duas folhas analisadas apresentaram ao final da exposição valores estatisticamente iguais àqueles obtidos no início do período (303 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> e 297 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> nas folhas jovens e 313 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> e 334 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> nas folhas maduras) (figuras 33 e 34). Todavia, em relação às folhas maduras é possível observar um aumento significativo na  $C_i$  se considerado o período de análise compreendido entre o 10º e o 71º dias de exposição.

A eficiência do uso da água (EUA) e a eficiência intrínseca do uso da água (EUA<sub>i</sub>), verificadas nas folhas jovens no fim do Outono 2007, foram estatisticamente similares aos valores obtidos no início da exposição (figura 33). Da mesma forma, a EUA<sub>i</sub> obtida nas folhas maduras apresentou valores estatisticamente iguais no início e no fim das análises, já a EUA mostrou uma redução significativa no final da exposição quando considerado os valores iniciais (figura 34).

### 4.3.2. Primavera 2007

Após 47 dias de campo, as folhas jovens e maduras de 'Paluma' da exposição de Primavera 2007 exibiram uma redução significativa na  $A_{\text{sat}}$  quando comparada a  $A_{\text{sat}}$  obtida no início da exposição ( $12,40 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $7,84 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $11,99 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $4,99 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 35 e 36). Nas análises posteriores até o fim da exposição, a  $A_{\text{sat}}$  se manteve estatisticamente igual em ambas as folhas analisadas.

Semelhantemente ao verificado na  $A_{\text{sat}}$ , no 48º dia de exposição, as duas folhas analisadas apresentaram uma redução significativa na  $g_s$  com a posterior manutenção desses valores no restante das análises (figuras 35 e 36).

Em relação à E, observa-se que tanto as folhas jovens como as folhas maduras mostraram uma redução significativa nesse parâmetro ao final da exposição quando comparado aos respectivos valores iniciais ( $1,90 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,38 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $2,27 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,17 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 35 e 36).

Enquanto nas folhas jovens de 'Paluma' a  $C_i$  final foi estatisticamente igual à inicial, nas folhas maduras verifica-se um aumento significativo da  $C_i$  no final do período quando considerados os valores iniciais ( $294 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e  $300 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  nas folhas jovens e  $308 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e  $325 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 35 e 36).

A EUA obtida nas folhas jovens foi estatisticamente igual ao longo das análises, ao passo que nas folhas maduras foi verificada uma redução significativa no início do terceiro mês de exposição (figuras 35 e 36).

As folhas jovens mostraram uma  $EUA_i$  estatisticamente similar no início e no fim da exposição, enquanto as folhas maduras apresentaram valores finais da  $EUA_i$  estatisticamente maiores que os iniciais (figuras 35 e 36). No entanto, as análises intermediárias indicam a ocorrência de diferenças significativas nesse parâmetro em ambas as folhas analisadas.

### 4.3.3. Verão 2008

Embora observe-se uma tendência de redução ao longo da exposição, as folhas jovens de 'Paluma' mostraram uma  $A_{\text{sat}}$  final estatisticamente igual à  $A_{\text{sat}}$  inicial ( $11,73 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $8,54 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (figura 37). Já nas folhas maduras a redução na  $A_{\text{sat}}$  final frente à  $A_{\text{sat}}$  inicial foi significativa ( $9,76 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $4,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (figura 38).

Ainda que tenham ocorrido variações significativas na  $g_s$  entre os dias de análises, os valores obtidos no início da exposição foram estatisticamente iguais aos valores obtidos no final do período em ambas as folhas analisadas ( $0,41 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,43 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$



nas folhas jovens e  $0,38 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,35 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 37 e 38).

No tocante à E, verifica-se que as folhas jovens e maduras mostraram uma redução significativa na E ao final da exposição quando comparada à E obtida no início do Verão 2008 ( $2,46 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,18 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $2,37 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,11 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 37 e 38).

Em relação à concentração intercelular de  $\text{CO}_2$ , observa-se que nas folhas jovens, excetuando o 26° e o 67° dia, os valores de  $C_i$  obtidos ao longo da exposição foram estatisticamente iguais aos valores obtidos no início do período (figura 37). Quanto às folhas maduras, nota-se um aumento gradual de  $C_i$  ao longo dos dias de análises (à exceção do 74° dia) resultando em um valor final estatisticamente maior que o inicial ( $287 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e  $318 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) (figura 38).

As folhas jovens apresentaram um aumento significativo na EUA obtida no final do período, ao passo que, nas folhas maduras, os valores iniciais e finais foram estatisticamente similares (figuras 37 e 38).

Verifica-se que a  $\text{EUA}_i$  obtida nas folhas jovens no final da exposição foi estatisticamente similar àquela obtida no início, todavia, nas folhas maduras observa-se uma redução significativa na  $\text{EUA}_i$  final considerando os valores iniciais (figuras 37 e 38).

#### **4.3.4. Outono 2008**

Embora, as folhas jovens de 'Paluma' tenham apresentado diferenças significativas nos valores de  $A_{\text{sat}}$  entre os dias de análises do Outono 2008, a  $A_{\text{sat}}$  final foi estatisticamente igual à inicial ( $11,16 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $8,62 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (figura 39). Por sua vez, as folhas maduras mostraram uma redução significativa ao fim do período de exposição ( $9,91 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $5,34 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (figura 40). Contudo, a redução da  $A_{\text{sat}}$  nas folhas maduras não foi uma constante ao longo do período, como é possível notar no 12° e no 61° dia de exposição onde houve um aumento significativo nesse parâmetro quando comparado aos valores obtidos nas análises precedentes.

Ao término da exposição, a  $g_s$  verificada nas duas diferentes folhas analisadas foi estatisticamente menor do que a  $g_s$  obtida no início do período ( $0,43 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,21 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $0,37 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,14 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 39 e 40).

Semelhantemente ao verificado na  $g_s$ , observa-se uma redução significativa na E no final da exposição quando comparada aos valores obtidos no início, tanto nas folhas jovens

quanto nas folhas maduras ( $2,40 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,18 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $2,20 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,01 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 39 e 40).

Em relação à  $C_i$ , verifica-se que os valores obtidos nas folhas jovens e maduras no fim do Outono 2008 foram estatisticamente iguais aos valores obtidos no início do período de exposição ( $289 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e  $286 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  nas folhas jovens e  $297 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e  $304 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  nas folhas maduras) (figura 39 e 40).

Os valores finais da EUA e da EUAi obtidos nas folhas maduras foram estatisticamente iguais àqueles obtidos no início do período (figura 40). Nas folhas jovens a EUAi também mostrou-se estatisticamente similar no início e no fim da exposição contudo, a EUA obtida no final foi estatisticamente maior do que a EUA inicial (figura 39).

#### 4.3.5. Inverno 2008

Os valores de  $A_{\text{sat}}$  observados no início da exposição de Inverno 2008 foram estatisticamente iguais aos obtidos no fim da exposição, tanto nas folhas jovens quanto nas folhas maduras ( $7,46 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $7,14 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $6,06 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $4,39 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 41 e 42). Salienta-se, no entanto, que no primeiro dia de análise da exposição de Inverno 2008 foram registradas baixas temperaturas horárias (temperatura média de  $13,6 \text{ } ^\circ\text{C}$ ), as quais podem ter influenciado negativamente na assimilação de  $\text{CO}_2$  (figuras 41 e 42).

Em relação à  $g_s$ , verifica-se que, embora ocorra uma variação significativa no 54º dia de exposição, os valores iniciais obtidos nas folhas jovens e maduras foram estatisticamente iguais aos respectivos valores apresentados no último dia de análise ( $0,22 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,25 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $0,23 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,28 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 41 e 42).

Semelhantemente ao verificado com a  $A_{\text{sat}}$ , a E apresentada pelas duas folhas analisadas foi estatisticamente igual no início e no fim do Inverno de 2008 ( $1,05 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,37 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $1,18 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,26 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 41 e 42).

Quanto à  $C_i$ , observa-se que as folhas jovens e maduras apresentaram no final do período um aumento significativo nesse parâmetro ( $274 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e  $302 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  nas folhas jovens e  $304 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e  $329 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 41 e 42).

Os valores da EUA obtidos nas folhas jovens e maduras no final da exposição foram estatisticamente menores do que àqueles obtidos no início, enquanto os valores da EUAi

obtidos nesses dois momentos foram estatisticamente iguais em ambas as folhas analisadas (figuras 41 e 42).

#### **4.3.6. Primavera 2008**

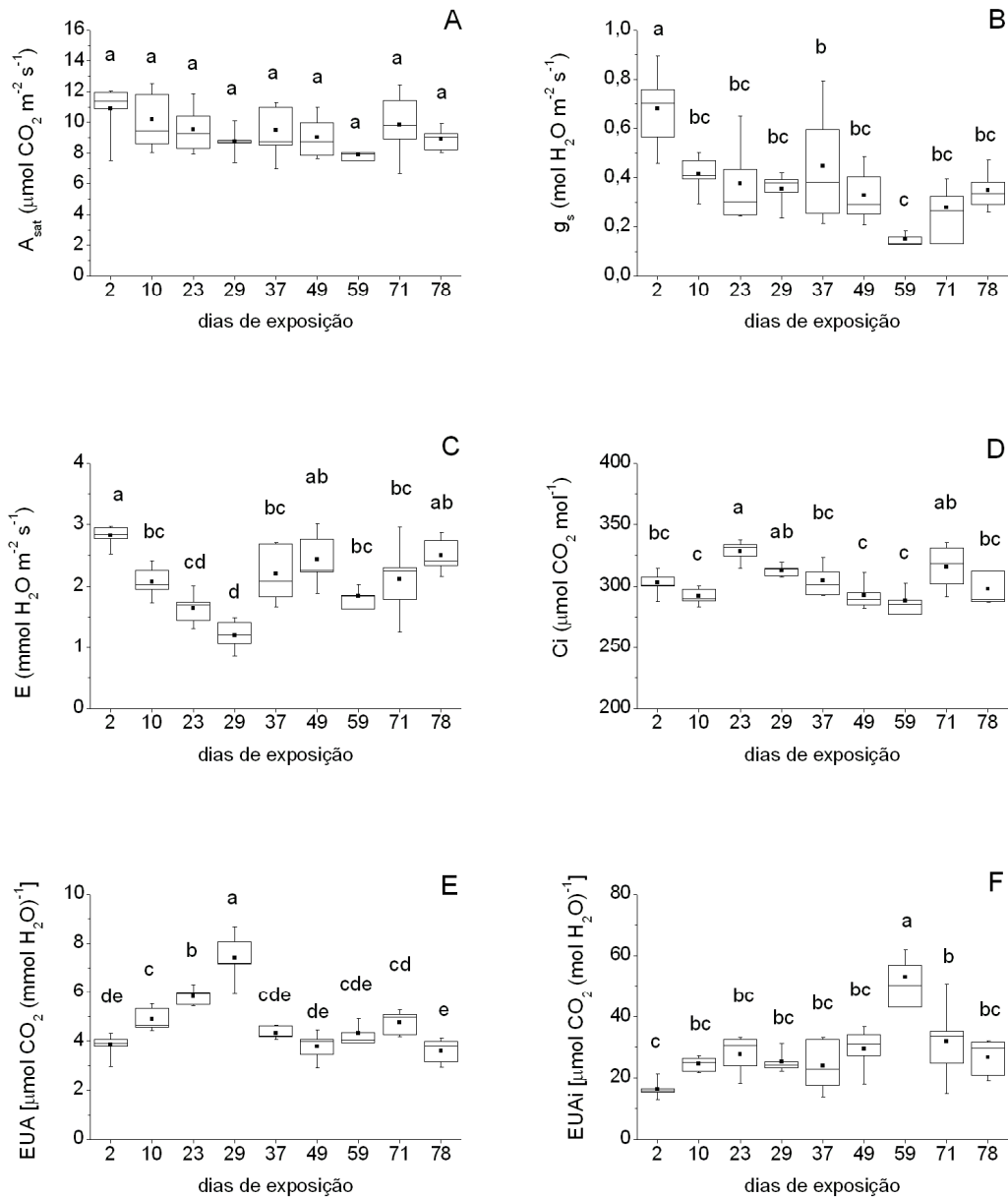
Na exposição de Primavera 2008, a  $A_{\text{sat}}$  final obtida nas folhas jovens e maduras foi estatisticamente igual à  $A_{\text{sat}}$  inicial ( $9,34 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $7,62 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $8,96 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $9,18 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 43 e 44).

A  $g_s$  final obtida nas duas folhas analisadas também foi estatisticamente similar à  $g_s$  inicial ( $0,23 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,28 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $0,24 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,33 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 43 e 44).

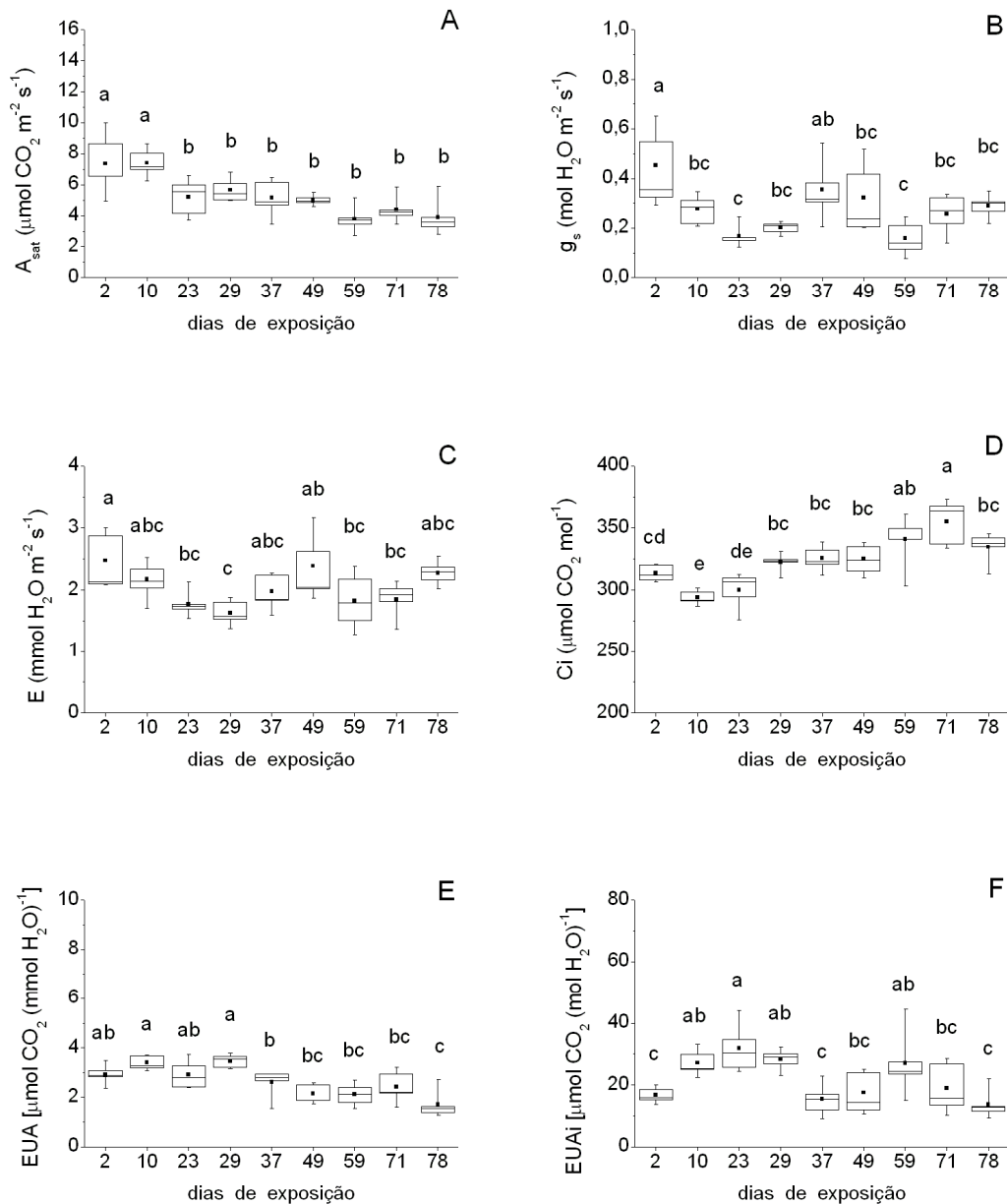
Diferentemente dos parâmetros acima citados, a  $E$  final das folhas jovens e maduras foi estatisticamente menor que àquela observada no início da Primavera 2008 ( $2,83 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,49 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas jovens e  $2,89 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $1,65 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 43 e 44).

Em ambas as folhas analisadas, a  $C_i$  verificada no último dia de análise foi estatisticamente igual àquela obtida no primeiro dia de análise da exposição ( $280 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e  $295 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  nas folhas jovens e  $282 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e  $288 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  nas folhas maduras) (figuras 43 e 44).

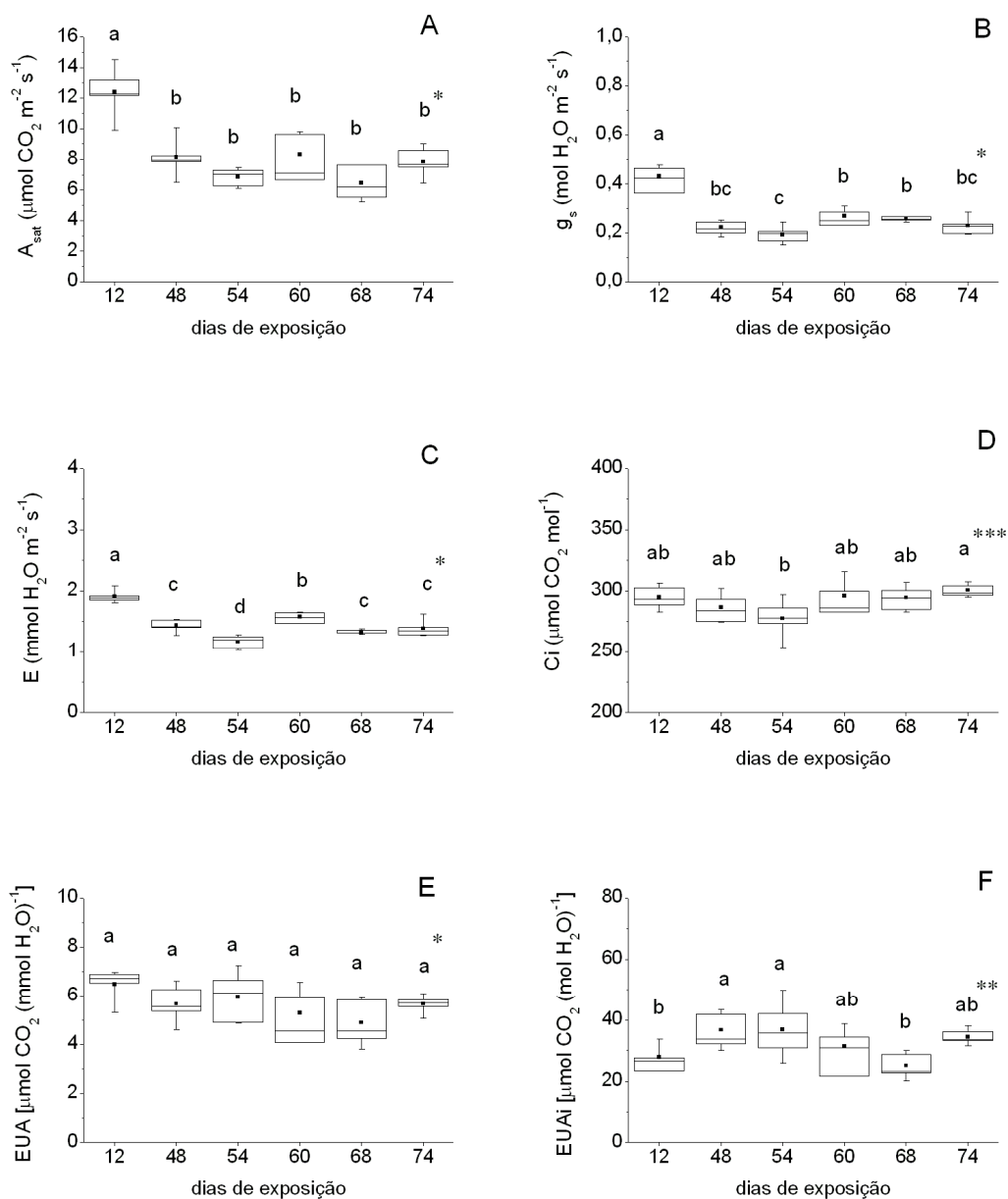
Ao final do período, foi verificado um aumento significativo na EUA das folhas jovens e maduras considerando os valores obtidos no início da exposição (figuras 43 e 44). Em relação à  $EUA_i$ , observa-se que, enquanto as folhas jovens apresentaram uma redução significativa nesse parâmetro, considerando a primeira e última análise da Primavera 2008, as folhas maduras apresentaram valores estatisticamente iguais (figuras 43 e 44).



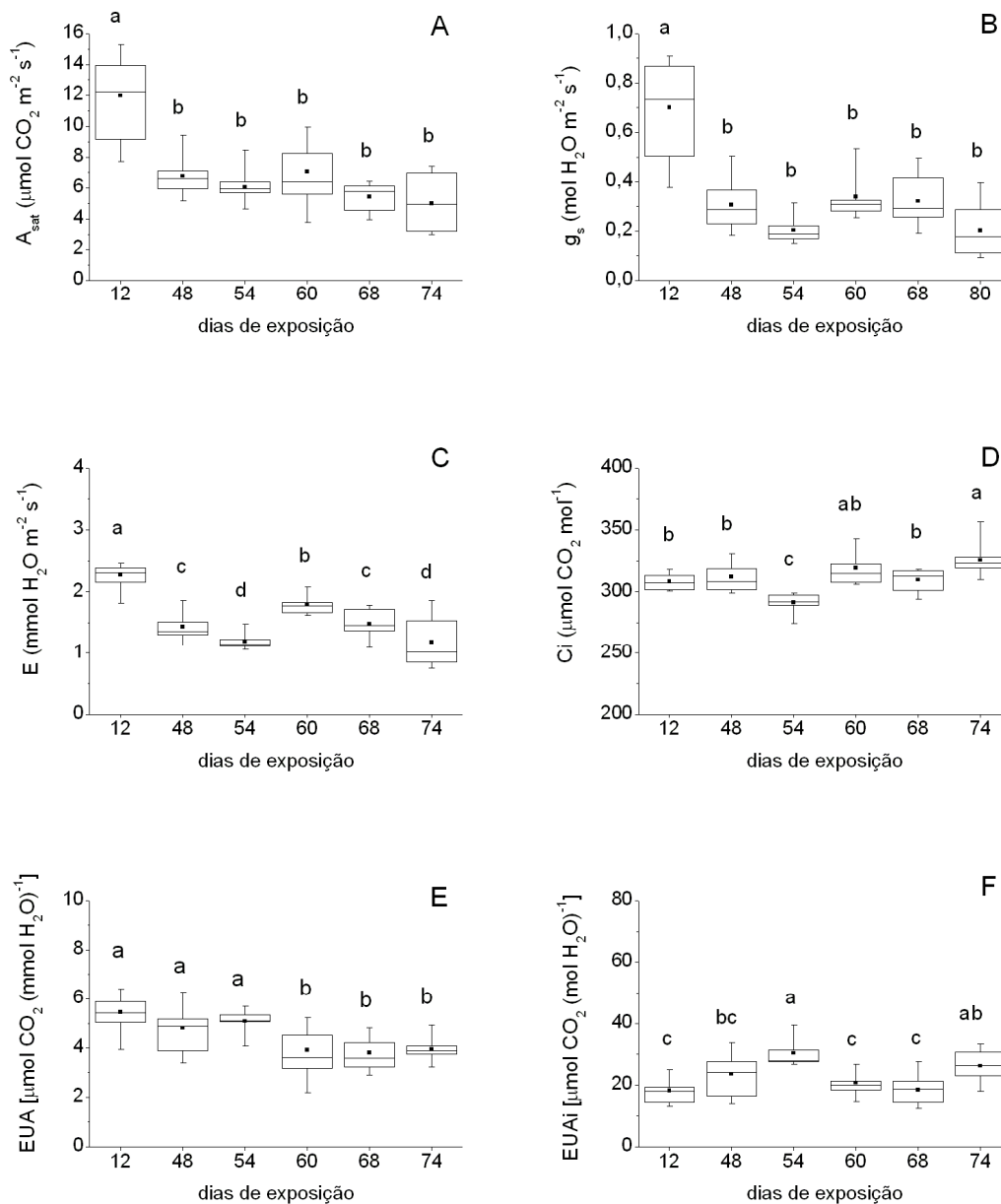
**Figura 33.** Outono 2007 – Gráfico box plot referente às folhas jovens. A - assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUAI,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de abril a junho de 2007. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).



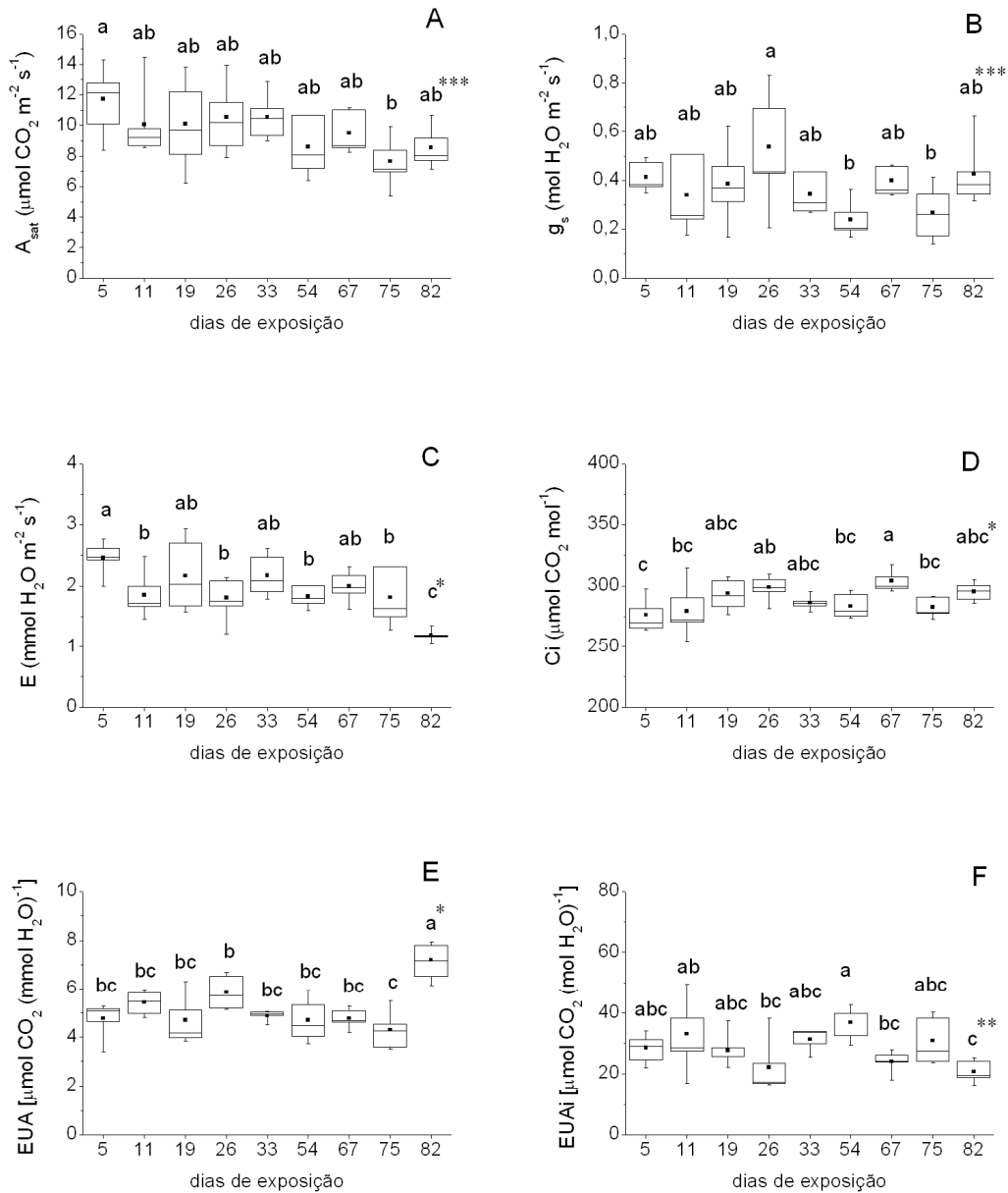
**Figura 34.** Outono 2007 – Gráfico box plot referente às folhas maduras. A - assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUA<sub>i</sub>,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de abril a junho de 2007. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).



**Figura 35.** Primavera 2007 – Gráfico box plot referente às folhas jovens. A - assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUAi,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de outubro a dezembro de 2007. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (\* $P < 0,05$ ); \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).

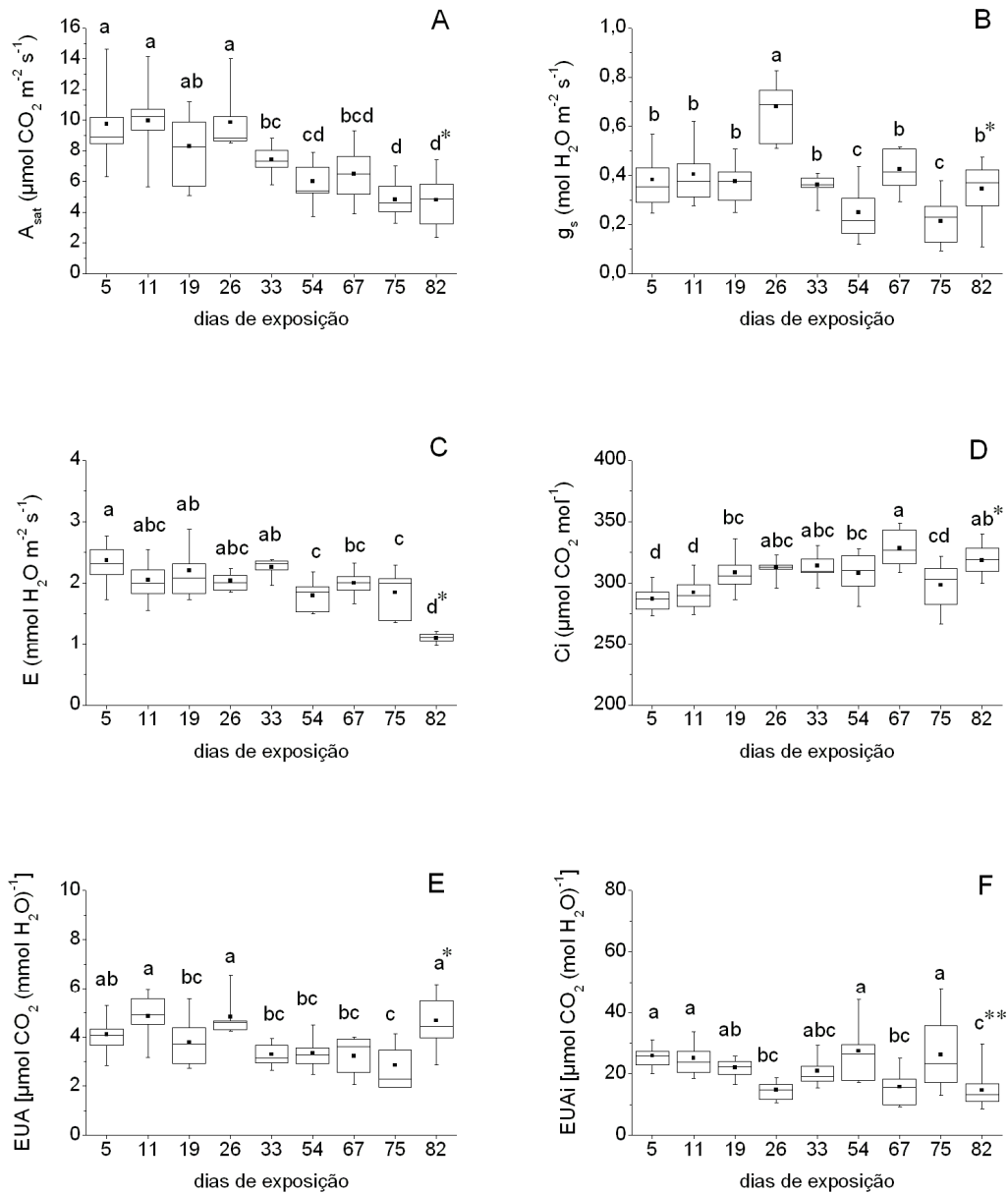


**Figura 36.** Primavera 2007 – Gráfico box plot referente às folhas maduras. A - assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUAI,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de outubro a dezembro de 2007. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).

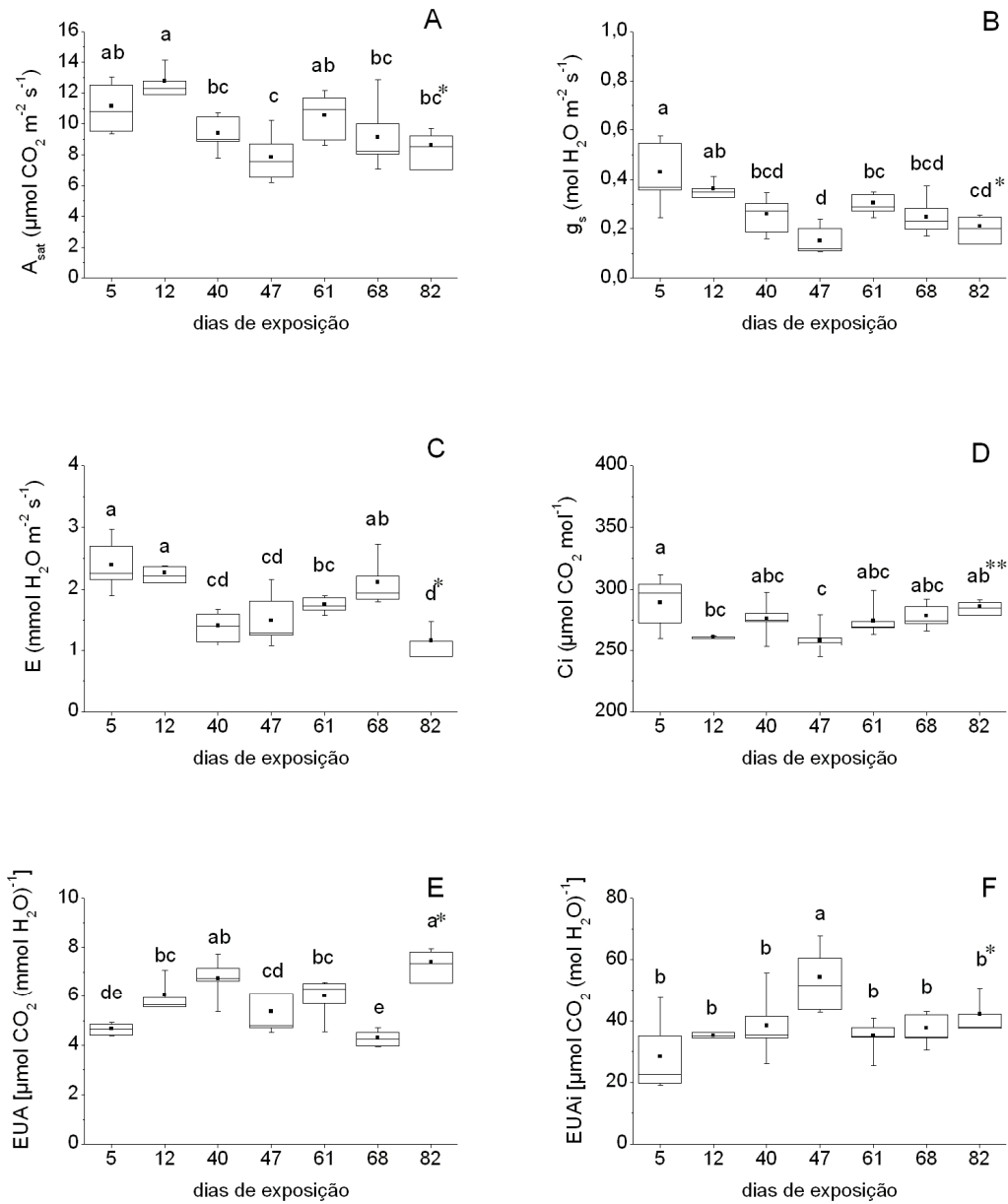


**Figura 37.** Verão 2008 – Gráfico box plot referente às folhas jovens. A - assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante (A<sub>sat</sub>, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); B - condutância estomática (g<sub>s</sub>, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); C - transpiração (E, mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); D - concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>, μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>); E - eficiência do uso da água (EUA, μmol CO<sub>2</sub> (mmol H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUA<sub>i</sub>, μmol CO<sub>2</sub> (mol H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de janeiro a abril de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (\*P < 0,001; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,03). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. (n = 6).

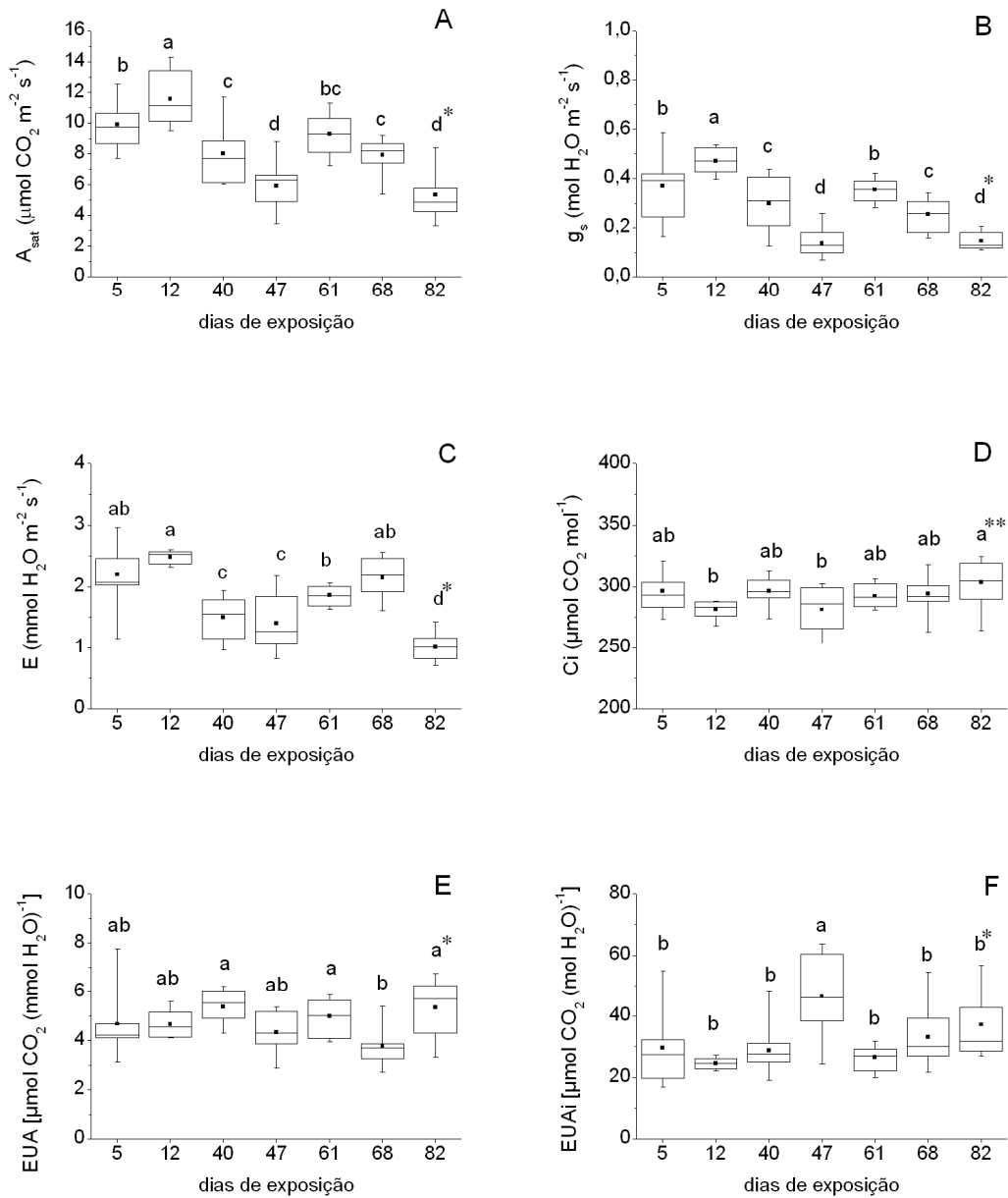




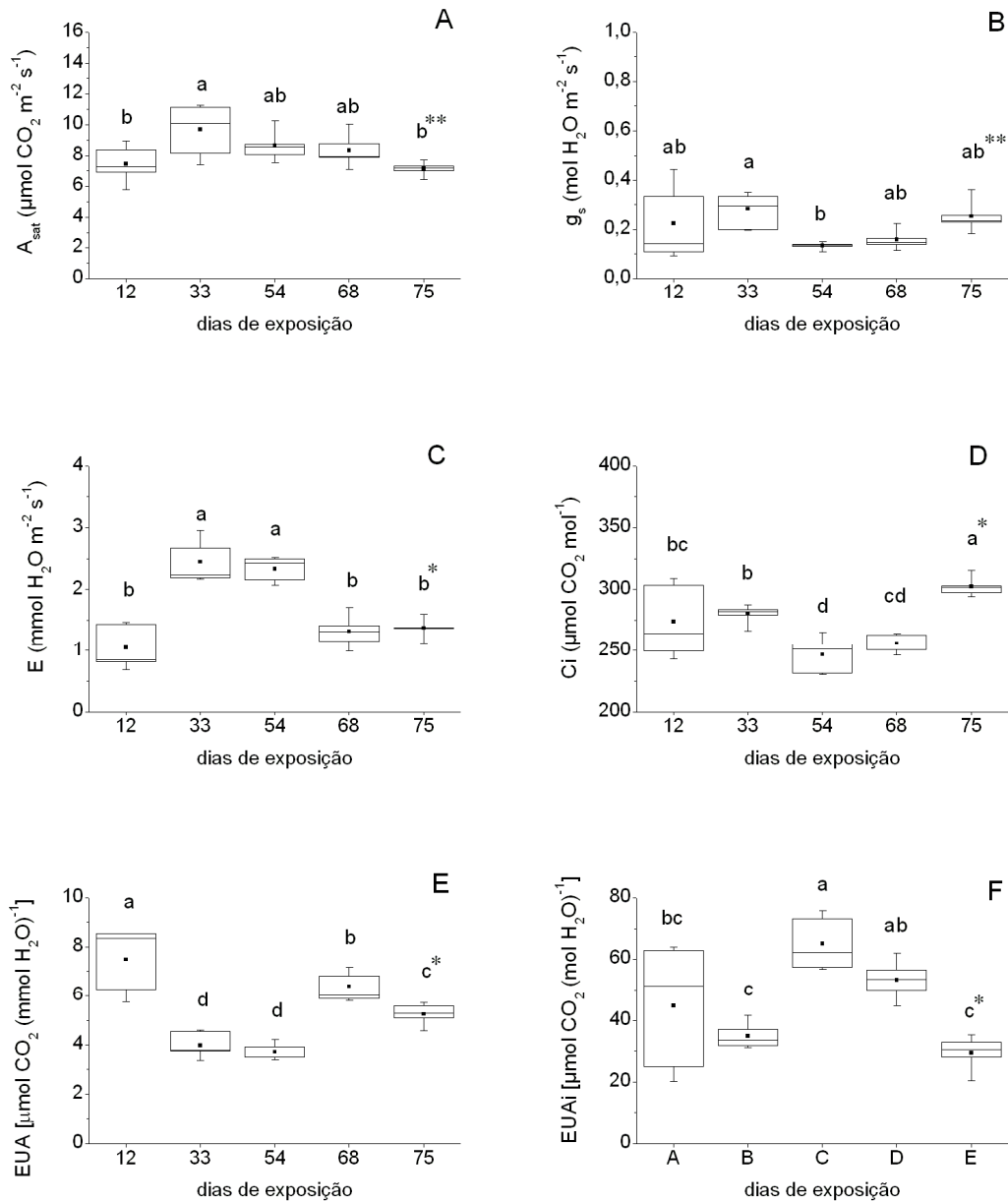
**Figura 38.** Verão 2008 – Gráfico box plot referente às folhas maduras. A - assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água ( $EUA$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água ( $EUAI$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de janeiro a abril de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).



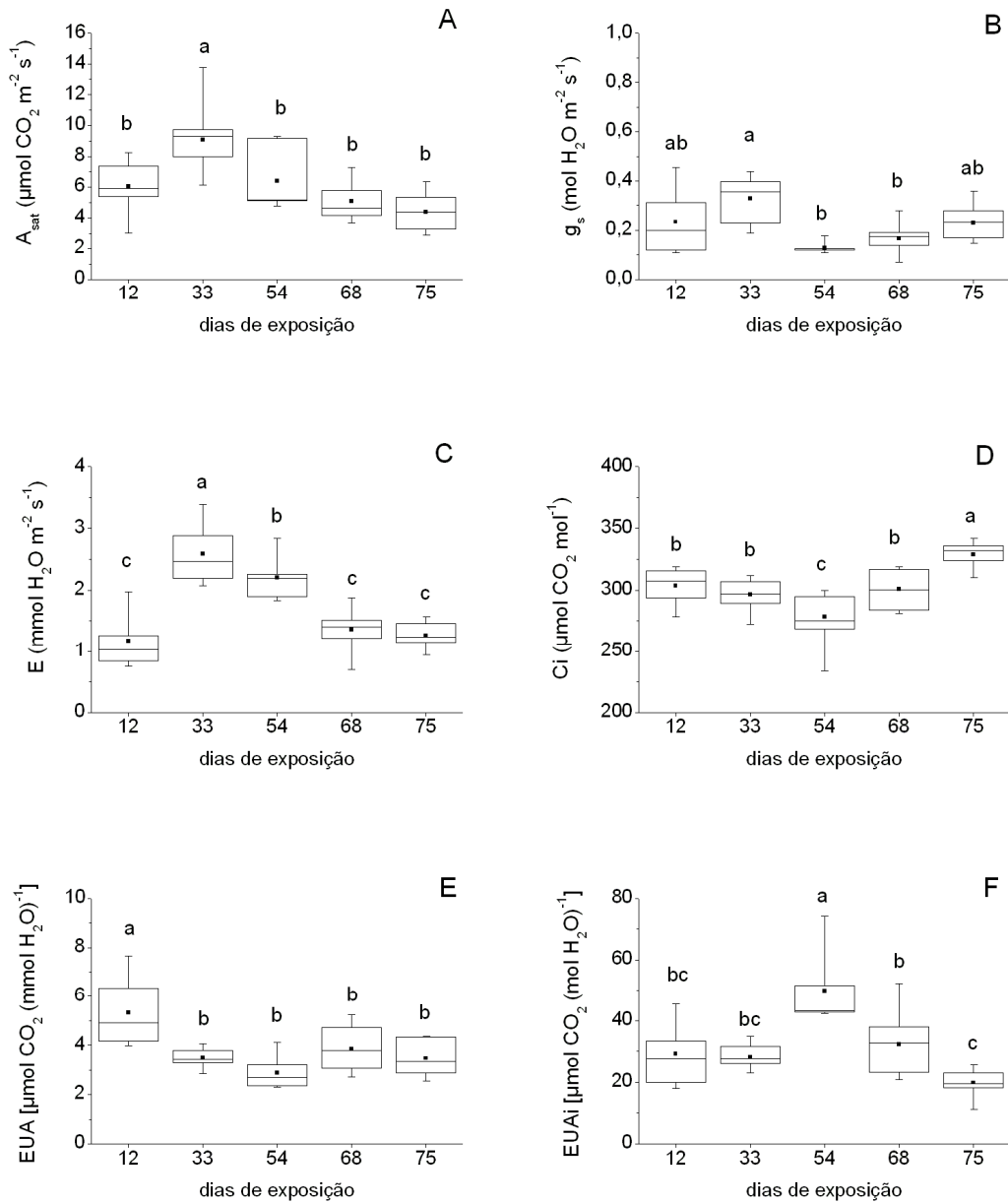
**Figura 39.** Outono 2008 – Gráfico box plot referente às folhas jovens. A - assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUA<sub>i</sub>,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de abril a junho de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).



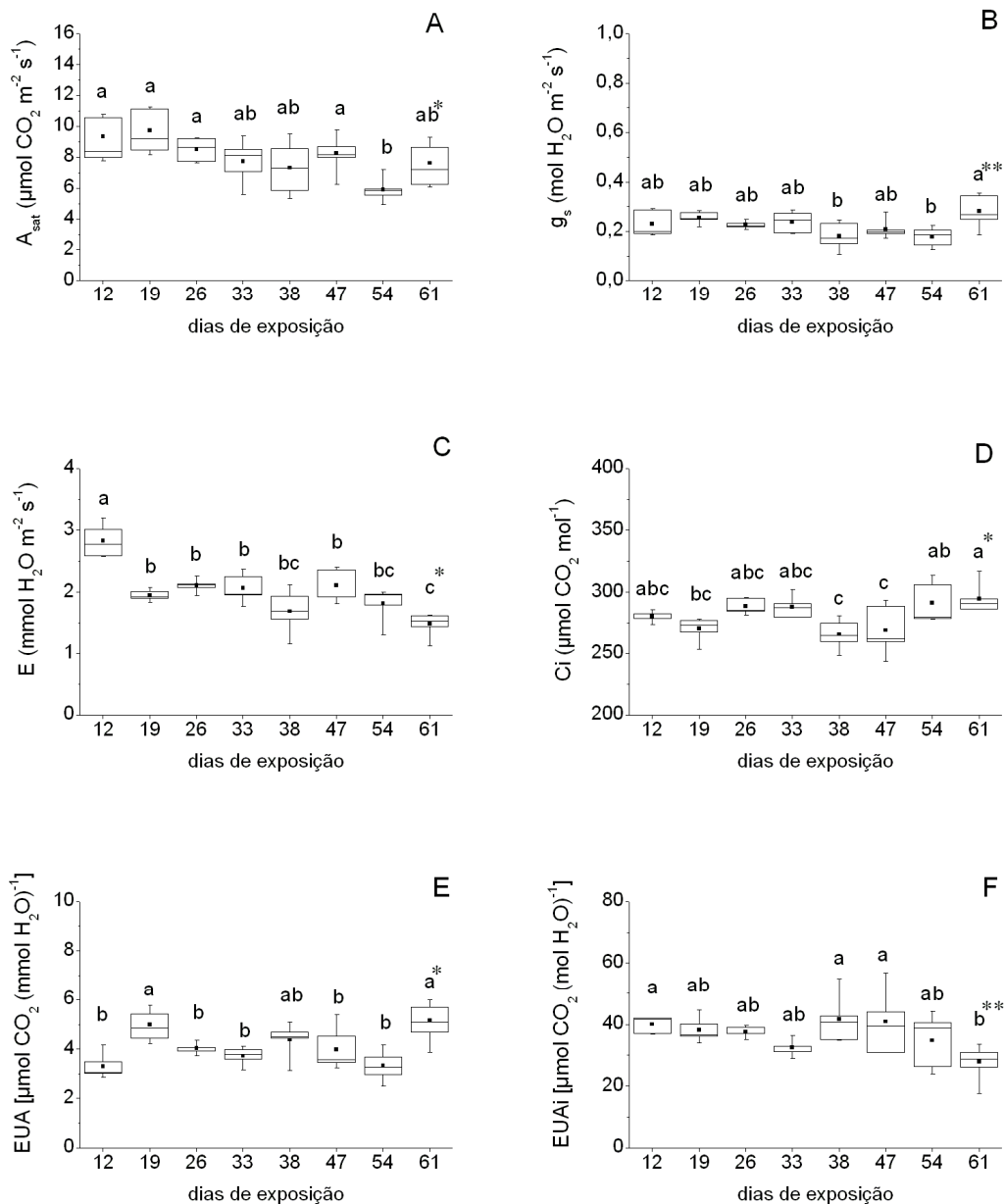
**Figura 40.** Outono 2008 – Gráfico box plot referente às folhas maduras. A - assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUAI,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de abril a junho de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).



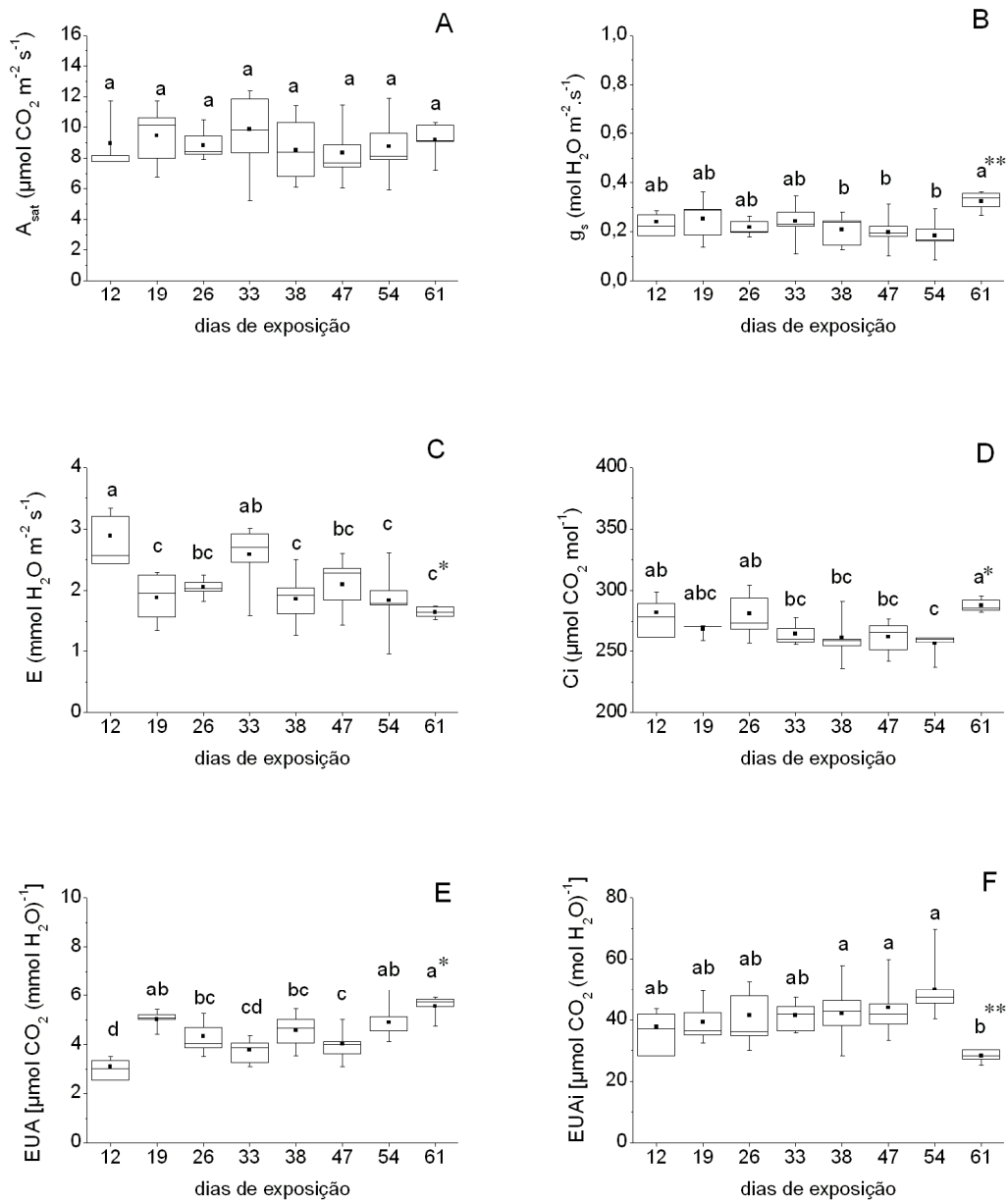
**Figura 41.** Inverno 2008 – Gráfico box plot referente às folhas jovens. A - assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUAi,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de julho a setembro de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,05$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).



**Figura 42.** Inverno 2008 – Gráfico box plot referente às folhas maduras. A - assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água ( $EUA$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água ( $EUA_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de julho a setembro de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).



**Figura 43.** Primavera 2008 – Gráfico box plot referente às folhas jovens. A - assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUA<sub>i</sub>,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de outubro a dezembro de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (\* $P < 0,001$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo ( $n = 6$ ).



**Figura 44.** Primavera 2008 – Gráfico box plot referente às folhas maduras. A - assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B - condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C - transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D - concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); E - eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ); F - eficiência intrínseca do uso da água (EUAI,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de outubro a dezembro de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. (\* $P < 0,001$ ; \*\* $P \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam os valores máximo e mínimo. ( $n = 6$ ).

#### 4.3.7. Síntese das trocas gasosas

Considerando os valores obtidos no início e no fim das exposições, observa-se, em ambas as folhas analisadas, que ora a assimilação de  $\text{CO}_2$  sob luz saturante, a condutância e a transpiração apresentaram uma redução significativa ao final do período, ora mostraram valores estatisticamente iguais (tabela 08). Em relação à  $A_{\text{sat}}$ , verifica-se que nas folhas jovens a redução final ocorreu somente na exposição de Primavera 2007, ao passo que nas folhas maduras tal redução ocorreu nas exposições de Outono 2007, Primavera 2007, Verão 2008, Outono 2008 (tabela 08).

A variação da  $g_s$  observada nas folhas jovens de 'Paluma' foi semelhante àquela apresentada pelas folhas maduras, ou seja: nas exposições de Outono 2007, Primavera 2007, Outono 2008 ambas as folhas mostraram ao final do período uma redução significativa na  $g_s$ , considerando os valores iniciais (tabela 08). Da mesma forma, a variação da transpiração foi similar nas folhas jovens e maduras que apresentaram ao fim das exposições de Primavera 2007, Verão 2008, Outono 2008 e Primavera 2008 uma redução significativa (tabela 08). Nas exposições onde não foram verificadas reduções na  $g_s$  ou na  $E$ , os valores finais foram sempre estatisticamente iguais aos iniciais (tabela 08).

Diferentemente, a concentração interna de  $\text{CO}_2$  obtida em 'Paluma' apresentou, ao final de algumas exposições, um aumento significativo, o qual ocorreu com maior frequência nas folhas maduras (em quatro exposições) do que nas folhas jovens (em uma exposição) (tabela 08). Na ausência de um aumento, a  $C_i$  inicial permaneceu estatisticamente igual à final (tabela 08).

A EUA e a EUAi, por sua vez, mostraram uma resposta mais variada, com aumentos, reduções ou ausência de diferenças significativas ao fim dos períodos de exposição (tabela 08).

A porcentagem de variação relativa dos parâmetros de trocas indicou que, quando ambas as folhas mostraram uma variação significativa entre os valores obtidos no início e no fim da exposição, os maiores valores de porcentagem foram encontrados nas folhas maduras (tabela 08). À exceção da condutância obtida no Outono 2007, da transpiração obtida na Primavera 2008 e da  $C_i$  obtida no Inverno 2008.

A análise de correlação entre os valores de  $A_{\text{sat}}$  e de  $g_s$  obtidos nas folhas jovens e maduras de 'Paluma' resultou, na maioria das exposições, em uma forte associação positiva (tabela 09).

Comparando os valores obtidos nas diferentes exposições após igual permanência em campo, observa-se a ocorrência de diferenças significativas entre os parâmetros de trocas ( $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $C_i$ , EUA e EUAi) (tabela 10).



**Tabela 08.** Indicação da ocorrência (< e >) ou ausência (=) de variação estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) (one way ANOVA) e porcentagem de variação relativa (%) da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração (E), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência intrínseca do uso da água (EUAI) obtidos nas folhas jovens (j) e folhas maduras (m) de indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' no início e no final das exposições de Outono 2007 (Out07), Primavera 2007 (Pri07), Verão 2008 (Ver08), Outono 2008 (Out08), Inverno 2008 (Inv08) e Primavera 2008 (Pri08), no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga ( $n = 6$ )

	$A_{sat}$		$g_s$		E		Ci		EUA		EUAI	
	j %	m %	j %	m %	j %	m %	j %	m %	j %	m %	j %	m %
<b>Out07</b>	=	< 47	< 49	< 36	=	=	=	=	=	< 41	=	=
<b>Pri07</b>	< 37	< 58	< 47	< 71	< 27	< 48	=	> 5	=	< 27	=	> 45
<b>Ver08</b>	=	< 51	=	=	< 52	< 53	=	> 11	> 51	=	=	< 43
<b>Out08</b>	=	< 46	< 51	< 60	< 51	< 54	=	=	> 59	=	=	=
<b>In/08</b>	=	=	=	=	=	=	> 10	> 8	< 30	< 35	=	=
<b>Pri/08</b>	=	=	=	=	< 47	< 43	=	=	> 56	> 78	< 30	=

**Tabela 09.** Coeficiente de correlação (Pearson) entre a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e a condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) obtidas em folhas jovens e maduras de indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga no período de abril a junho de 2007 (Out/07), outubro a dezembro de 2007 (Pri/07), janeiro a abril de 2008 (Ver/08), abril a junho de 2008 (Out/08), julho a setembro de 2008 (Inv/08), outubro a dezembro de 2008 (Pri/08) e abril a dezembro de 2008 (Pri/08) ( $P < 0,01$ ) ( $n = 51$ )

	Out/07	Pri/07	Ver/08	Out/08	Inv/08	Pri/08
<b>jovens</b>	0,78	0,73	0,69	0,77	0,49	0,56
<b>maduras</b>	0,51	0,88	0,66	0,82	0,67	0,74

**Tabela 10.** Valores médios da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante (A<sub>sat</sub>), da condutância estomática (g<sub>s</sub>), da transpiração (E), da concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci), da eficiência do uso da água (EUA) e da eficiência intrínseca do uso da água (EUAI) obtidos nas folhas jovens e nas folhas maduras de indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' nas exposições de Outono 2007 (Out/07), Primavera 2007 (Pri/07), Verão 2008 (Ver/08), Outono 2008 (Out/08), Inverno 2008 (Inv/08) e Primavera 2008 (Pri/08), após aproximadamente 12,35, 50 e 65 dias de campo. (n = 6). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre diferentes exposições (P < 0,05, one way ANOVA).

		A <sub>sat</sub>		g <sub>s</sub>		E		Ci		EUA		EUAI	
		jovens	maduras	jovens	maduras	jovens	maduras	jovens	maduras	jovens	maduras	jovens	maduras
<b>12 dias</b>	<b>Out/07</b>	10,2 <sup>ab</sup>	7,39 <sup>bc</sup>	0,41 <sup>a</sup>	0,28 <sup>cd</sup>	2,07 <sup>b</sup>	2,18 <sup>bc</sup>	292 <sup>a</sup>	293 <sup>bc</sup>	4,89 <sup>c</sup>	3,41 <sup>b</sup>	24,6 <sup>b</sup>	27,1 <sup>b</sup>
	<b>Pri/07</b>	12,4 <sup>a</sup>	11,99 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>	1,90 <sup>b</sup>	2,27 <sup>bc</sup>	294 <sup>a</sup>	308 <sup>a</sup>	6,48 <sup>b</sup>	5,43 <sup>b</sup>	27,8 <sup>ab</sup>	18,1 <sup>c</sup>
	<b>Ver/08</b>	10,5 <sup>ab</sup>	9,97 <sup>a</sup>	0,34 <sup>a</sup>	0,40 <sup>bc</sup>	1,85 <sup>b</sup>	2,05 <sup>c</sup>	279 <sup>ab</sup>	292 <sup>bc</sup>	5,43 <sup>bc</sup>	4,85 <sup>a</sup>	33,1 <sup>ab</sup>	25,2 <sup>b</sup>
	<b>Out/08</b>	12,78 <sup>a</sup>	11,58 <sup>a</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,47 <sup>b</sup>	2,27 <sup>b</sup>	2,48 <sup>b</sup>	262 <sup>b</sup>	281 <sup>c</sup>	6,05 <sup>bc</sup>	4,66 <sup>a</sup>	35,2 <sup>ab</sup>	24,5 <sup>b</sup>
	<b>Inv/08</b>	7,46 <sup>b</sup>	6,06 <sup>c</sup>	0,22 <sup>a</sup>	0,23 <sup>d</sup>	1,05 <sup>c</sup>	1,18 <sup>d</sup>	274 <sup>ab</sup>	304 <sup>ab</sup>	7,49 <sup>a</sup>	5,31 <sup>a</sup>	44,7 <sup>a</sup>	29,3 <sup>b</sup>
	<b>Pri/08</b>	9,34 <sup>b</sup>	8,96 <sup>ab</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,24 <sup>cd</sup>	2,83 <sup>a</sup>	2,89 <sup>a</sup>	280 <sup>ab</sup>	282 <sup>c</sup>	3,03 <sup>d</sup>	3,11 <sup>b</sup>	39,9 <sup>ab</sup>	37,8 <sup>a</sup>
<b>35 dias</b>	<b>Out/07</b>	9,49 <sup>a</sup>	5,13 <sup>b</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,35 <sup>a</sup>	2,21 <sup>a</sup>	1,97 <sup>bc</sup>	304 <sup>a</sup>	325 <sup>a</sup>	4,31 <sup>bc</sup>	2,62 <sup>c</sup>	24,0 <sup>b</sup>	15,4 <sup>c</sup>
	<b>Ver/08</b>	10,57 <sup>a</sup>	7,43 <sup>a</sup>	0,34 <sup>a</sup>	0,36 <sup>a</sup>	2,17 <sup>a</sup>	2,26 <sup>ab</sup>	286 <sup>b</sup>	314 <sup>b</sup>	4,88 <sup>b</sup>	3,29 <sup>b</sup>	31,3 <sup>ab</sup>	20,9 <sup>c</sup>
	<b>Out/08</b>	9,40 <sup>a</sup>	8,04 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a</sup>	1,41 <sup>b</sup>	1,51 <sup>c</sup>	276 <sup>b</sup>	296 <sup>c</sup>	6,74 <sup>a</sup>	5,37 <sup>a</sup>	38,3 <sup>a</sup>	28,7 <sup>b</sup>
	<b>Inv/08</b>	9,69 <sup>a</sup>	9,08 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,33 <sup>a</sup>	2,44 <sup>a</sup>	2,58 <sup>a</sup>	280 <sup>b</sup>	296 <sup>c</sup>	3,96 <sup>c</sup>	3,49 <sup>b</sup>	34,9 <sup>ab</sup>	28,1 <sup>b</sup>
	<b>Pri/08</b>	7,73 <sup>a</sup>	9,88 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	2,07 <sup>a</sup>	2,59 <sup>a</sup>	288 <sup>b</sup>	265 <sup>d</sup>	3,72 <sup>c</sup>	3,77 <sup>b</sup>	32,5 <sup>ab</sup>	41,5 <sup>a</sup>
<b>50 dias</b>	<b>Out/07</b>	9,03 <sup>a</sup>	4,99 <sup>b</sup>	0,33 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a</sup>	2,43 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>	292 <sup>a</sup>	325 <sup>a</sup>	3,77 <sup>b</sup>	2,15 <sup>d</sup>	29,4 <sup>c</sup>	17,5 <sup>b</sup>
	<b>Pri/07</b>	8,12 <sup>a</sup>	6,77 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,31 <sup>a</sup>	1,43 <sup>c</sup>	1,43 <sup>c</sup>	286 <sup>ab</sup>	311 <sup>a</sup>	5,67 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	36,8 <sup>c</sup>	23,5 <sup>b</sup>
	<b>Ver/08</b>	8,61 <sup>a</sup>	6,02 <sup>b</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,25 <sup>ab</sup>	1,82 <sup>b</sup>	1,80 <sup>bc</sup>	283 <sup>a</sup>	308 <sup>a</sup>	4,70 <sup>ab</sup>	3,34 <sup>c</sup>	36,8 <sup>c</sup>	27,4 <sup>b</sup>
	<b>Out/08</b>	7,85 <sup>a</sup>	5,92 <sup>b</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,14 <sup>c</sup>	1,50 <sup>c</sup>	1,4 <sup>c</sup>	259 <sup>cd</sup>	281 <sup>b</sup>	5,37 <sup>a</sup>	4,34 <sup>ab</sup>	54,4 <sup>b</sup>	46,4 <sup>a</sup>
	<b>Inv/08</b>	8,61 <sup>a</sup>	6,40 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,13 <sup>c</sup>	2,33 <sup>a</sup>	2,21 <sup>ab</sup>	247 <sup>d</sup>	278 <sup>b</sup>	3,70 <sup>b</sup>	2,88 <sup>cd</sup>	65,1 <sup>a</sup>	49,9 <sup>a</sup>
	<b>Pri/08</b>	8,25 <sup>a</sup>	8,34 <sup>a</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,20 <sup>bc</sup>	2,11 <sup>ab</sup>	2,10 <sup>ab</sup>	270 <sup>bc</sup>	262 <sup>c</sup>	3,96 <sup>b</sup>	4,02 <sup>b</sup>	40,8 <sup>c</sup>	44,0 <sup>a</sup>
<b>65 dias</b>	<b>Out/07</b>	7,89 <sup>ab</sup>	3,77 <sup>d</sup>	0,15 <sup>c</sup>	0,16 <sup>c</sup>	1,84 <sup>ab</sup>	1,82 <sup>abc</sup>	288 <sup>ab</sup>	340 <sup>a</sup>	4,31 <sup>b</sup>	2,11 <sup>c</sup>	53,1 <sup>a</sup>	26,9 <sup>ab</sup>
	<b>Pri/07</b>	6,47 <sup>b</sup>	5,43 <sup>bc</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,32 <sup>b</sup>	1,33 <sup>b</sup>	1,47 <sup>cd</sup>	294 <sup>a</sup>	309 <sup>b</sup>	4,88 <sup>b</sup>	3,92 <sup>b</sup>	25,1 <sup>c</sup>	18,4 <sup>bc</sup>
	<b>Ver/08</b>	9,52 <sup>a</sup>	6,48 <sup>b</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>	1,99 <sup>a</sup>	2,00 <sup>ab</sup>	304 <sup>a</sup>	328 <sup>a</sup>	4,77 <sup>b</sup>	3,22 <sup>b</sup>	24,0 <sup>c</sup>	15,7 <sup>c</sup>
	<b>Out/08</b>	9,15 <sup>a</sup>	7,93 <sup>a</sup>	0,25 <sup>ab</sup>	0,25 <sup>b</sup>	2,11 <sup>a</sup>	2,15 <sup>a</sup>	279 <sup>b</sup>	295 <sup>c</sup>	4,30 <sup>b</sup>	3,76 <sup>b</sup>	37,7 <sup>b</sup>	33,1 <sup>a</sup>
	<b>Inv/08</b>	8,32 <sup>a</sup>	5,09 <sup>c</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,17 <sup>c</sup>	1,32 <sup>b</sup>	1,36 <sup>d</sup>	256 <sup>c</sup>	301 <sup>bc</sup>	6,39 <sup>a</sup>	3,85 <sup>b</sup>	53,3 <sup>a</sup>	32,4 <sup>a</sup>
	<b>Pri/08</b>	7,62 <sup>ab</sup>	9,18 <sup>a</sup>	0,28 <sup>ab</sup>	0,33 <sup>b</sup>	1,49 <sup>b</sup>	1,65 <sup>bcd</sup>	295 <sup>a</sup>	288 <sup>c</sup>	5,14 <sup>b</sup>	5,52 <sup>a</sup>	27,8 <sup>c</sup>	28,3 <sup>ab</sup>

#### **4.4. Atividade Enzimática Antioxidativa**

##### **4.4.1. Primavera 2007**

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) verificada nas folhas de *Psidium guajava* 'Paluma' no final da Primavera 2007 foi estatisticamente igual àquela obtida no início da exposição (figura 45). Contudo, após 4 e 19 dias de exposição observa-se um aumento significativo na atividade da SOD e APX, respectivamente (figura 45).

A enzima glutationa redutase (GR) mostrou uma atividade estatisticamente igual nos diferentes dias análises da Primavera 2007 (figura 45).

##### **4.4.2. Verão 2008**

Verificou-se a ocorrência de diferenças significativas na atividade da enzima SOD, sendo que os maiores níveis de atividade foram observados no início do Verão 2008, após 11 dias, e os menores níveis no final da exposição, após 75 e 82 dias (figura 46).

As enzimas GR e APX apresentaram valores de atividade estatisticamente similares durante todas as análises realizadas no período de exposição (figura 46).

##### **4.4.3. Outono 2008**

As análises realizadas em 'Paluma' durante a exposição de Outono 2008 indicaram que as enzimas SOD, GR e APX apresentaram uma atividade estatisticamente igual na exposição de Outono 2008 (figura 47).

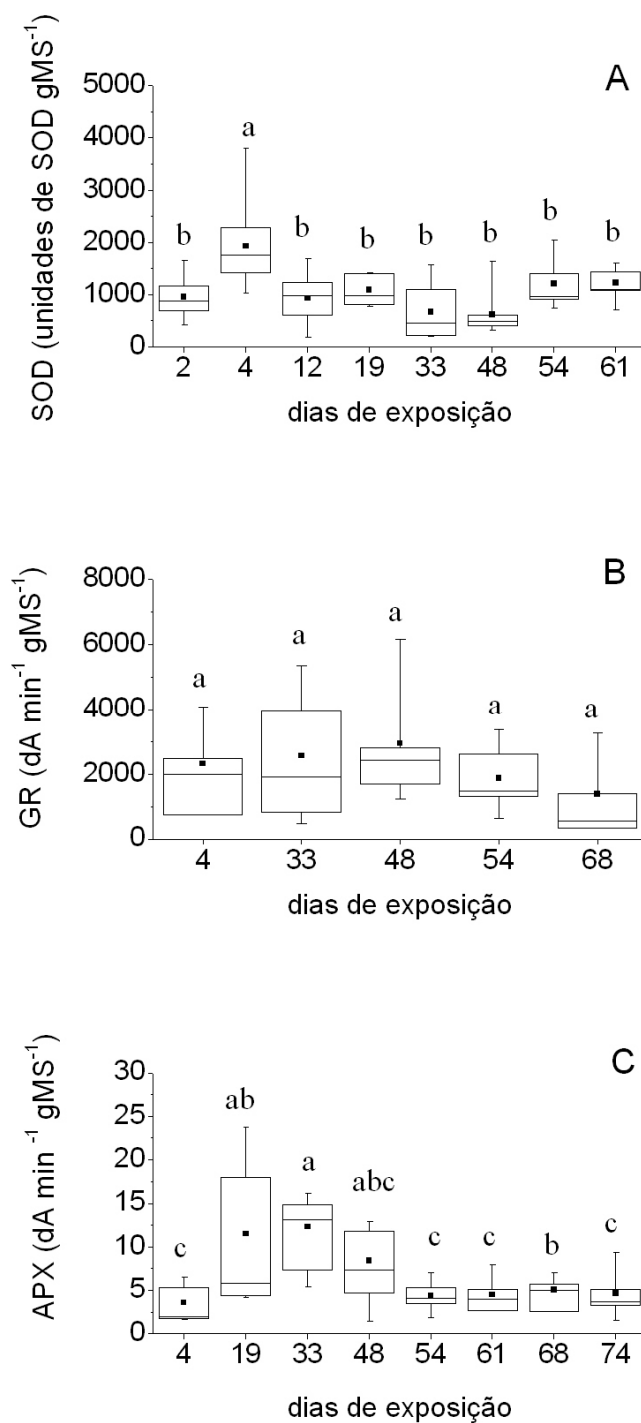
##### **4.4.4. Inverno 2008**

Observou-se maiores níveis de atividade das enzimas SOD e APX no final da exposição de Inverno 2008. Contudo, enquanto a atividade da enzima SOD verificada no início e no fim da exposição foi estatisticamente similar, a APX apresentou um aumento significativo (figura 48).

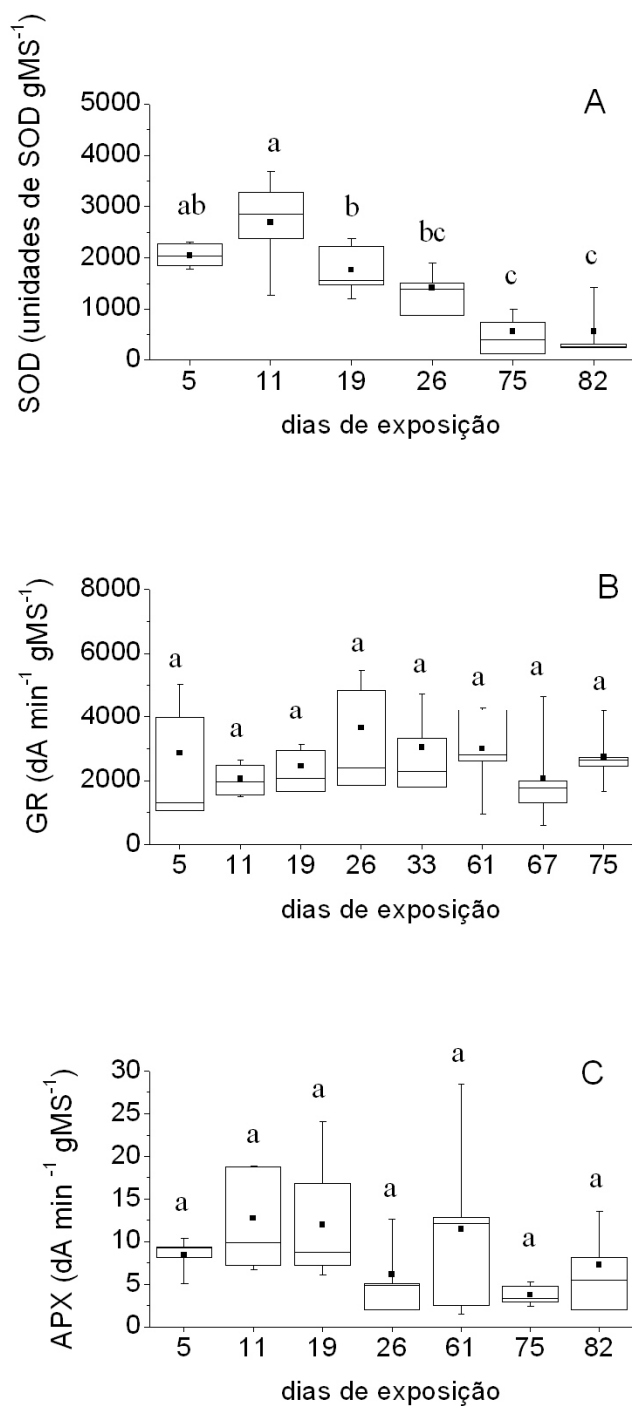
A enzima GR mostrou novamente uma atividade estatisticamente igual ao longo das análises (figura 48).

##### **4.4.5. Primavera 2008**

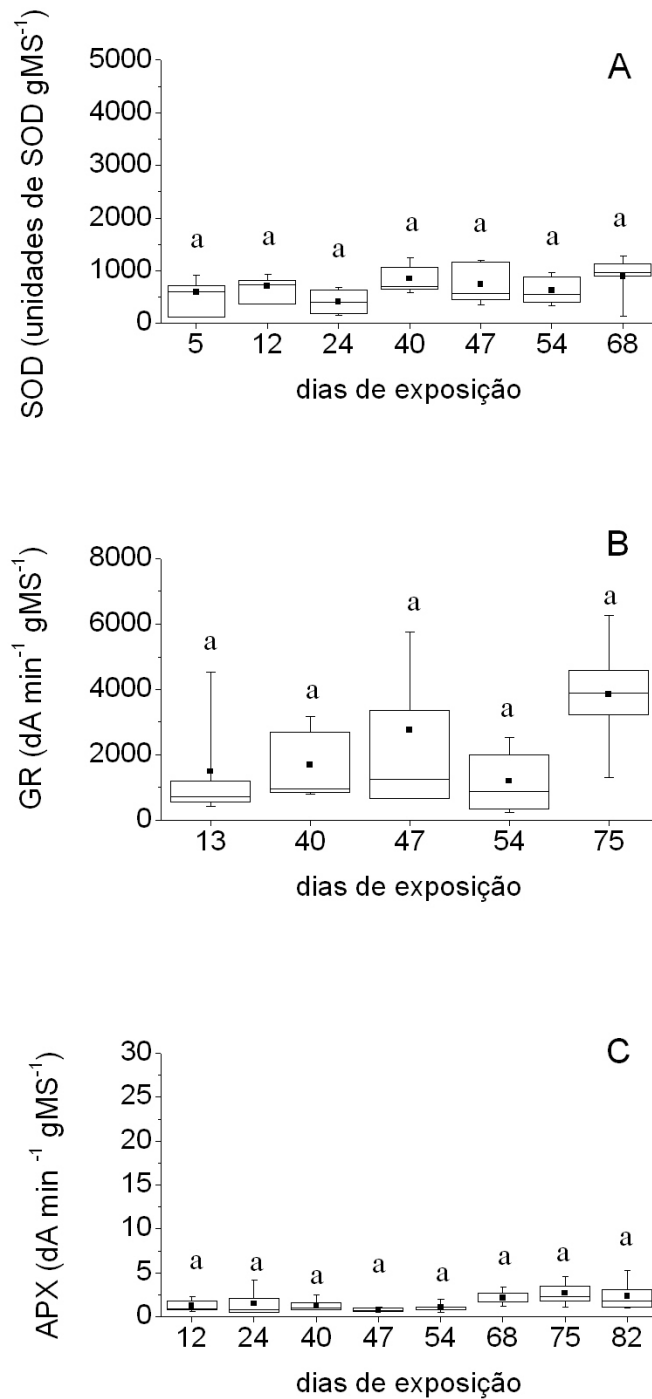
As análises realizadas na exposição de Primavera 2008 indicaram a existência de diferenças significativas na atividade da SOD, sendo que a maior atividade foi encontrada no início da exposição (figura 49). Em contrapartida, as enzimas GR e APX apresentaram uma atividade estatisticamente equivalente durante as análises (figura 49).



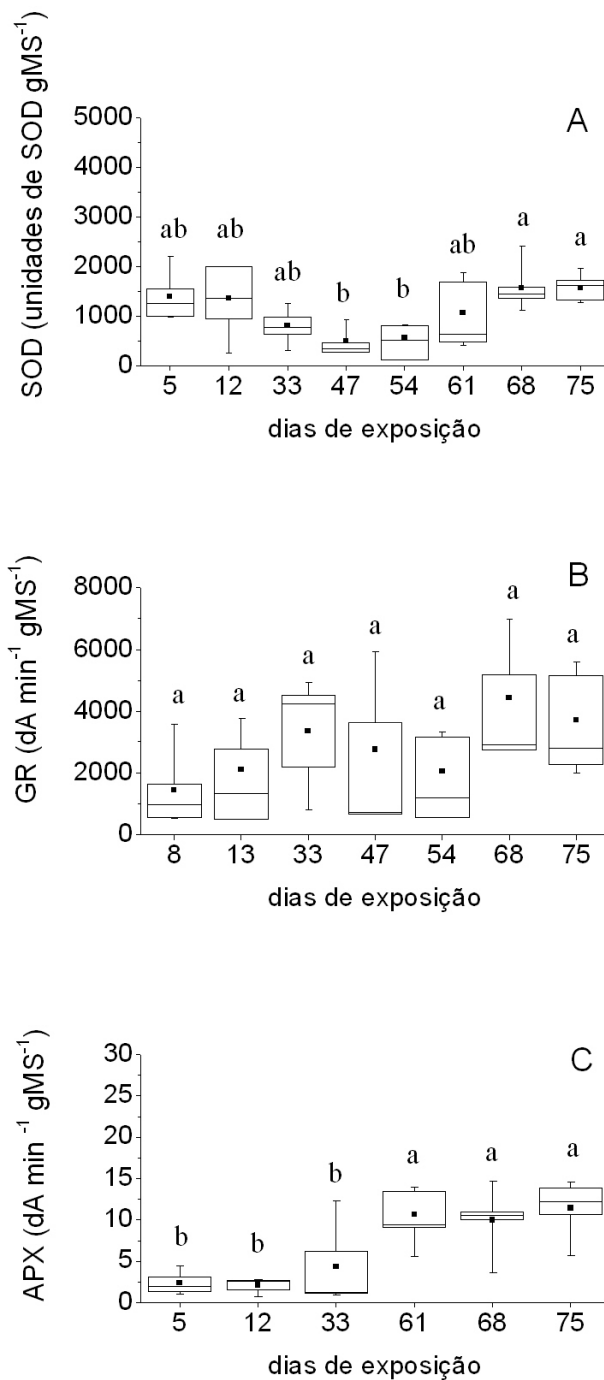
**Figura 45.** Primavera 2007. Gráfico box plot referente à A - atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD gMS<sup>-1</sup>); B - glutatona redutase (GR, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>); C - ascorbato peroxidase APX, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de outubro a dezembro de 2007. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Barras verticais indicam o 10<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> percentis. ( $n=6$ ).



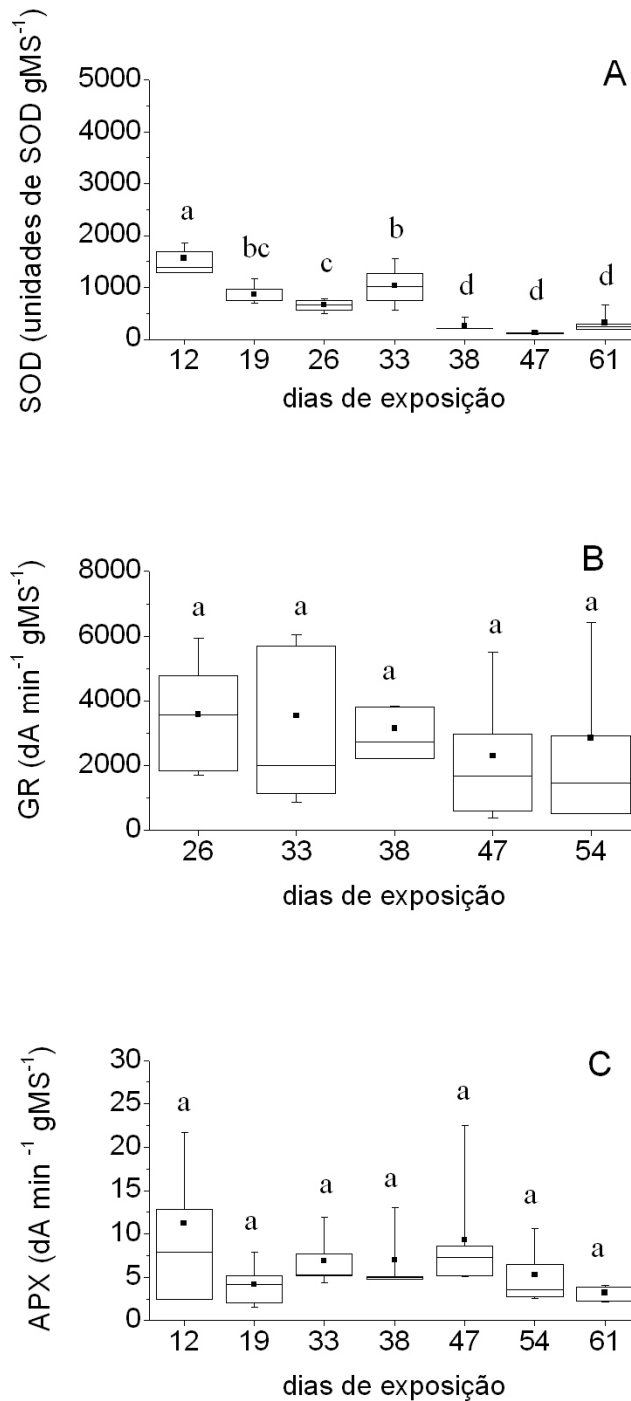
**Figura 46.** Verão 2008. Gráfico box plot referente à A - atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD gMS<sup>-1</sup>); B - glutatona redutase (GR, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>); C - ascorbato peroxidase APX, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de janeiro a abril de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Barras verticais indicam o 10<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> percentis. ( $n=6$ ).



**Figura 47.** Outono 2008. Gráfico box plot referente à A - atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD gMS<sup>-1</sup>); B - glutatona redutase (GR, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>); C - ascorbato peroxidase APX, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de abril a junho de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Barras verticais indicam o 10<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> percentis. ( $n=6$ ).



**Figura 48.** Inverno 2008. Gráfico box plot referente à A - atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD gMS<sup>-1</sup>); B - glutatona redutase (GR, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>); C - ascorbato peroxidase APX, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de julho a setembro de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,005$ ). Barras verticais indicam o 10<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> percentis. ( $n=6$ ).



**Figura 49.** Primavera 2008. Gráfico box plot referente à A - atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD gMS<sup>-1</sup>); B - glutatona redutase (GR, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>); C - ascorbato peroxidase APX, dA min<sup>-1</sup> gMS<sup>-1</sup>) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de outubro a dezembro de 2008. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Barras verticais indicam o 10<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> percentis. ( $n=6$ ).



#### 4.4.6. Síntese da atividade enzimática antioxidativa

Observa-se ao longo do experimento a ocorrência de poucas variações com diferenças significativas na atividade das enzimas SOD e da APX, sendo que os valores de atividade inicial e final foram semelhantes na maioria das exposições.

As poucas alterações finais significativas ocorreram na exposição de Verão 2008 (redução significativa SOD), Primavera 2008 (redução significativa SOD) e Inverno 2008 (aumento significativo APX) (figuras 46, 49 e 48, respectivamente). Já a enzima GR apresentou nível similar de atividade ao longo de todas as exposições (figuras 45, 46, 47, 48 e 49).

Ressalta-se, contudo, que a grande variação nos níveis de atividade da SOD, APX e GR verificado entre as amostras de um mesmo dia de análise (representada pelas barras verticais dos gráficos box plot) devem, em parte, ter mascarado possíveis alterações significativas.

A análise de variância unidirecional realizada entre os valores de atividade obtidos nas diferentes exposições, após igual permanência em campo, indicou a ocorrência de diferenças significativas, à exceção da GR (tabela 11). Desta comparação, destaca-se a exposição de Outono 2008, na qual foram obtidos baixos níveis de atividade enzimática quando comparados às outras exposições (tabela 11).

**Tabela 11.** Análise de variância unidirecional (one way ANOVA) entre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD  $\text{gMS}^{-1}$ ), glutathiona redutase (GR,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) e ascorbato peroxidase (APX,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' nas exposições de Primavera 2007, Verão 2008, Outono 2008, Inverno 2008 e Primavera 2008, após aproximadamente 30 e 55 dias de campo. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre diferentes exposições ( $n = 6$ ). ( $P < 0,05$ ).

	SOD		GR		APX	
	30 dias	55 dias	30 dias	55 dias	30 dias	55 dias
Primavera 2007	664 <sup>b</sup>	1212 <sup>a</sup>	2558 <sup>a</sup>	1866 <sup>a</sup>	12,3 <sup>a</sup>	4,3 <sup>ab</sup>
Verão 2008	1410 <sup>a</sup>	-	3032 <sup>a</sup>	2983 <sup>a</sup>	6,1 <sup>b</sup>	11,5 <sup>a</sup>
Outono 2008	411 <sup>b</sup>	622 <sup>b</sup>	1698 <sup>a</sup>	1201 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>	1,1 <sup>b</sup>
Inverno 2008	806 <sup>ab</sup>	569 <sup>b</sup>	3336 <sup>a</sup>	2044 <sup>a</sup>	4,3 <sup>b</sup>	10,6 <sup>a</sup>
Primavera 2008	1033 <sup>ab</sup>	319 <sup>b</sup>	3521 <sup>a</sup>	2829 <sup>a</sup>	6,8 <sup>b</sup>	5,3 <sup>ab</sup>

#### 4.5. Análise conjunta das variáveis bióticas e abióticas

Com o objetivo de avaliar as relações entre as variáveis bióticas e as variáveis abióticas, às quais os indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' foram expostos, foi empregada a ordenação das unidades amostrais por meio da Análise de Componentes Principais (ACP).

##### 4.5.1. Análise de componentes principais: trocas gasosas

As variáveis bióticas consideradas na ACP de trocas gasosas foram a assimilação de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ) e a transpiração (E). Como variáveis abióticas foram considerados a temperatura média (Temp), a umidade relativa média (UR), o DPV médio (DPV), a precipitação (ppt), a irradiação solar global acumulada (Irrad), a concentração acumulada de O<sub>3</sub> entre o período da 7h00 as 17h00 (O<sub>3</sub>) e o fotoperíodo (valverão), calculado como a distância dos dias de análise em relação ao solstício de inverno (21 de junho). Os dados de trocas gasosas obtidos nas folhas jovens e nas folhas maduras de 'Paluma' foram analisados separadamente.

A análise realizada com os valores de trocas das folhas jovens de 'Paluma' sintetizou 61 % da variabilidade total dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (figura 50 e tabela 12), ao passo que a ACP efetuada com os dados das folhas maduras resumiu 55 % da variabilidade total (figura 51 e tabela 13). Verifica-se que a disposição das variáveis, bem como a associação com os eixos multidimensionais, foram bastante similares nas duas análises.

Em ambas as ACP as variáveis que apresentaram maior correlação com o eixo 1 foram:  $A_{sat}$  ( $r = -0,82$  e  $r = -0,77$ , nas folhas jovens e maduras, respectivamente), condutância ( $r = -0,74$  e  $r = -0,62$ , nas folhas jovens e maduras, respectivamente), transpiração ( $r = -0,62$  e  $r = -0,61$ , nas folhas jovens e maduras, respectivamente), concentração de O<sub>3</sub> ( $r = 0,85$  e  $r = 0,89$ , nas folhas jovens e maduras, respectivamente) e Irrad ( $r = 0,86$  e  $r = 0,79$ , nas folhas jovens e maduras, respectivamente) (tabelas 12 e 13).

Observa-se no eixo 1 de ambos os gráficos uma nítida polarização entre os parâmetros de trocas gasosas ( $A_{sat}$ ,  $g_s$  e E) e a concentração de ozônio (figuras 50 e 51). Indicando, portanto, uma relação inversa em que uma maior exposição ozônio corresponde a menores valores de  $A_{sat}$ ,  $g_s$  e E (figuras 50 e 51). A irradiação, também correlacionada ao eixo 1, apresentou, nas duas análises, uma relação direta com o O<sub>3</sub> e uma relação inversa com os parâmetros de trocas (figuras 50 e 51).

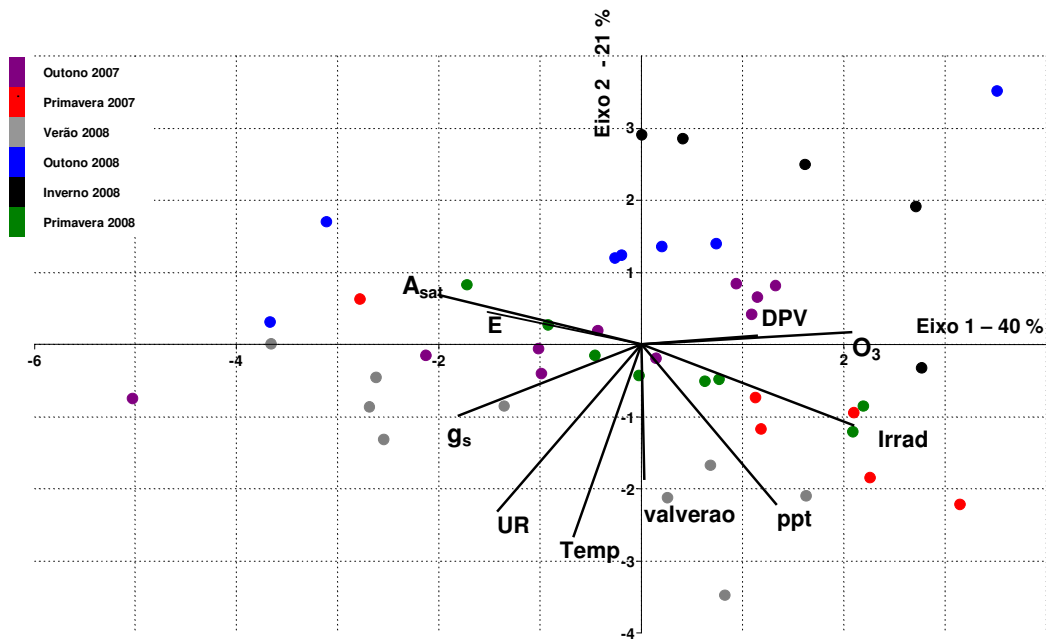
As principais variáveis associadas ao eixo 2 em ambas as ACP foram a umidade relativa ( $r = -0,69$  e  $r = -0,76$ , nas folhas jovens e maduras, respectivamente), a temperatura ( $r = -0,79$  e  $r = -0,50$ , nas folhas jovens e maduras, respectivamente), e a precipitação ( $r = -0,66$  e  $r = -0,75$ , nas folhas jovens e maduras, respectivamente) (tabelas 12 e 13). No que tange a ACP das folhas jovens, além das variáveis descritas acima, observa-se que o valverão também se correlacionou com o eixo 2 ( $r = -0,56$ ) (tabela 12).

A disposição das variáveis temperatura e umidade relativa no eixo 2 de ambos os gráficos indica a existência de uma relação direta entre elas (figuras 50 e 51). Em relação às folhas jovens, observa-se que essa associação é complementada pela variável valverão, a qual estaria refletindo as maiores temperaturas e umidades registradas normalmente nas estações de verão e primavera que apresentam um fotoperíodo maior (figura 50).

Uma característica particular à ACP das folhas maduras é a associação da variável temperatura tanto com eixo 2, como com o eixo 1 ( $r = 0,50$ ), estabelecendo, no último caso, uma relação direta com as trocas gasosas (figura 51). Tal relação evidencia a influência da temperatura nas trocas gasosas das folhas maduras, ao passo que as folhas jovens o efeito da temperatura seria menor.

A variável DPV se correlacionou com eixo 3 nas duas análises, sendo que na ACP das folhas maduras ela aparece em posição oposta ao valverão, indicando uma relação indireta (figura 51).

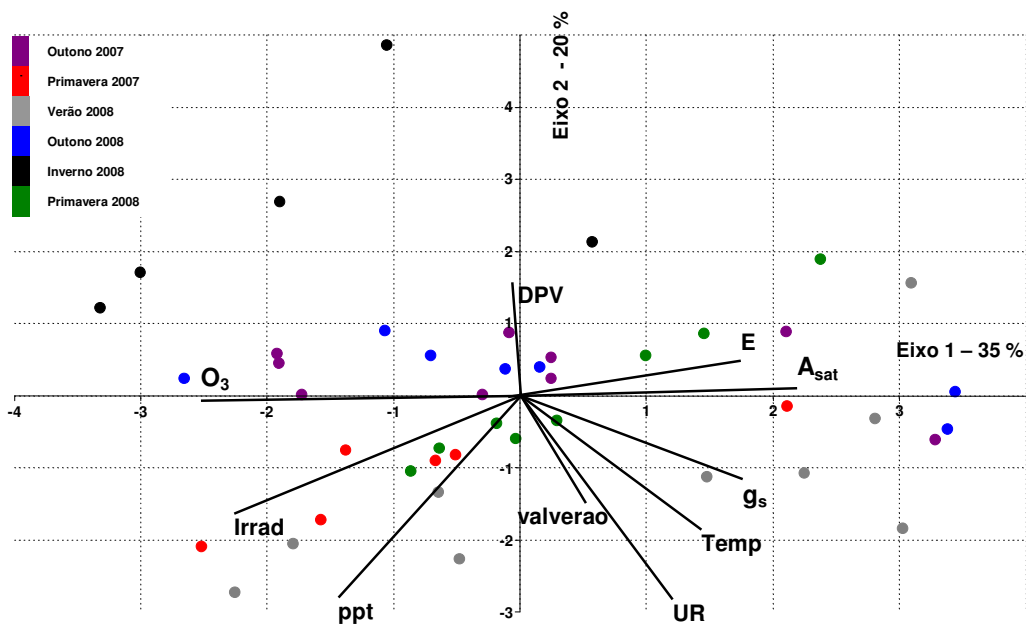
Foram feitas correlações (Pearson) entre os escores do eixo 1, resultantes da ACP das folhas maduras, e os parâmetros de sintomas foliares induzidos por ozônio. A correlação resultou em um coeficiente de  $-0,61$  com os dados de incidência, de  $-0,64$  com os dados de severidade e de  $-0,58$  com os dados do índice de injúria foliar ( $P < 0,001$ ). A correlação entre os escores do eixo 2 com os dados de sintomas não foi significativa.



**Figura 50.** Folhas jovens: Ordenação das unidades amostrais pelo método de Análise de Componentes Principais. Abreviatura das variáveis:  $A_{sat}$ : assimilação líquida de  $CO_2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante;  $g_s$ : condutância estomática; E: transpiração; valverao: comprimento do dia;  $O_3$ : concentração acumulada de  $O_3$  entre 7h00 e 17h00; Temp: temperatura média; UR: umidade relativa média; DPV: déficit de pressão de vapor do ar; ppt: precipitação acumulada; Irrad: irradiação solar global acumulada. Unidades amostrais: (dias de coleta de dados).

**Tabela 12.** Correlação (Pearson) das variáveis referentes às folhas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' com os componentes principais e porcentagem de variabilidade explicada pelos eixos (%) ( $n = 45$ ).

Variáveis	Abreviatura	Componentes Principais		
		1	2	3
Assimilação de $CO_2$	$A_{sat}$	<b>-0,82</b>	0,20	-0,18
Condutância estomática	$g_s$	<b>-0,74</b>	-0,29	-0,27
Transpiração	E	<b>-0,62</b>	0,13	-0,33
Comprimento do dia	valverao	0,01	<b>-0,56</b>	0,16
Ozônio	$O_3$	<b>0,85</b>	0,05	-0,20
Temperatura média	Temp	-0,27	<b>-0,79</b>	-0,46
Umidade relativa média	UR	-0,58	<b>-0,69</b>	0,25
Déficit de pressão de vapor	DPV	0,47	0,04	<b>-0,81</b>
Precipitação acumulada	ppt	0,54	<b>-0,66</b>	0,11
Irradiação solar	Irrad	<b>0,86</b>	-0,33	-0,05
<b>Variância explicada</b>		<b>40 %</b>	<b>21 %</b>	<b>12 %</b>



**Figura 51.** Folhas maduras: Ordenação das unidades amostrais pelo método de Análise de Componentes Principais. Abreviatura das variáveis:  $A_{sat}$ : assimilação líquida de  $CO_2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante;  $g_s$ : condutância estomática; E: transpiração; valverao: comprimento do dia;  $O_3$ : concentração acumulada de  $O_3$  entre 7h00 e 17h00; Temp: temperatura média; UR: umidade relativa média; DPV: déficit de pressão de vapor do ar; ppt: precipitação acumulada; Irrad: irradiação solar global acumulada. Unidades amostrais: (dias de coleta de dados).

**Tabela 13.** Correlação (Pearson) das variáveis referentes às folhas maduras de *Psidium guajava* 'Paluma' com os componentes principais e porcentagem de variabilidade explicada pelos eixos (%) ( $n = 44$ ).

Variáveis	Abreviatura	Componentes Principais		
		1	2	3
Assimilação de $CO_2$	$A_{sat}$	<b>0,77</b>	0,03	0,17
Condutância estomática	$g_s$	<b>0,62</b>	-0,30	-0,03
Transpiração	E	<b>0,61</b>	0,13	-0,12
Comprimento do dia	valverão	0,18	-0,40	<b>0,69</b>
Ozônio	$O_3$	<b>-0,89</b>	-0,02	-0,05
Temperatura média	Temp	<b>0,50</b>	<b>-0,50</b>	0,30
Umidade relativa média	UR	0,42	<b>-0,76</b>	-0,36
Déficit de pressão de vapor	DPV	-0,02	0,42	<b>0,80</b>
Precipitação acumulada	ppt	-0,51	<b>-0,75</b>	0,16
Irradiação solar	Irrad	<b>-0,79</b>	-0,44	0,14
<b>Variância explicada</b>		<b>35 %</b>	<b>20 %</b>	<b>14%</b>

#### 4.5.2. Análise de componentes principais: atividade enzimática antioxidativa

As variáveis bióticas consideradas na ACP da defesa antioxidativa foram a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), a atividade da enzima glutatona redutase (GR) e a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX). Como variáveis abióticas foram considerados a temperatura média (Temp), a umidade relativa média (UR), o DPV médio (DPV), a precipitação acumulada (ppt), a irradiação solar global acumulada (Irrad), a concentração acumulada de O<sub>3</sub> entre o período da 7h00 às 17h00 (O<sub>3</sub>) e o fotoperíodo (valverão), calculado como a distância dos dias de análise em relação ao solstício de inverno (21 de junho).

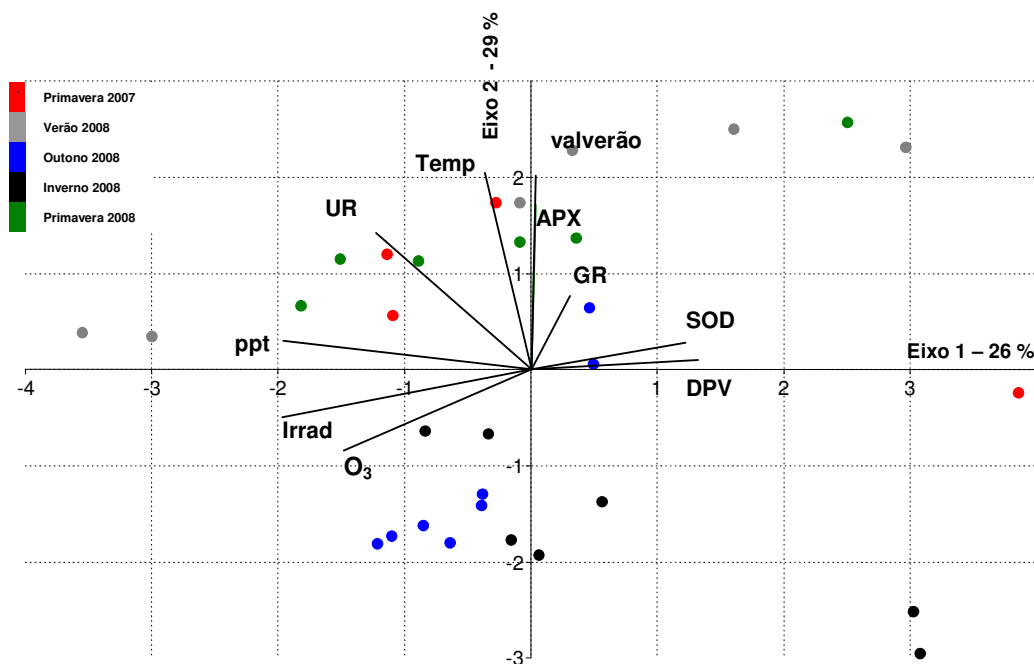
A análise resumiu 55 % da variabilidade total dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (figura 52 e tabela 14). As principais variáveis associadas ao eixo 1 foram a ppt ( $r = -0,87$ ), a Irrad ( $r = -0,87$ ), a concentração de O<sub>3</sub> ( $r = -0,66$ ), o DPV ( $r = 0,58$ ) e a SOD ( $r = 0,54$ ) (tabela 14). O eixo 2 apresentou como principais variáveis a temperatura ( $r = 0,86$ ) e a umidade relativa ( $r = 0,59$ ).

O eixo 1 da ACP apresentou a oposição das variáveis ozônio, irradiação e precipitação com as variáveis SOD e DPV (figura 52). O ozônio, a irradiação e a precipitação apresentaram uma relação direta entre si, a qual, no caso do O<sub>3</sub> e Irrad, já tinha sido observada na ACP de trocas. Do eixo 1 é possível destacar ainda a relação inversa entre a SOD e o O<sub>3</sub>, indicando que essa enzima respondeu à exposição ao poluente diminuindo sua atividade, e entre o DPV e a precipitação (figura 52).

O eixo 2 reflete a relação direta entre a umidade relativa, a temperatura, o valverão (relação também verificada na ACP de trocas) e a APX, retratando, possivelmente, a menor atividade que essa enzima apresentou na exposição de Outono 2008 e início do Inverno 2008 (figura 52).

Correlacionado com o eixo 3, que apresenta 18 % da variabilidade dos dados, estão a GR ( $r = 0,61$ ), a APX ( $r = 0,51$ ) o O<sub>3</sub> ( $r = 0,58$ ), a UR ( $r = -0,50$ ) e o DPV ( $r = 0,49$ ) (tabela 14). Embora apresentem o mesmo sentido, os autovetores da APX, GR e O<sub>3</sub> possuem orientações diferentes indicando que as variáveis APX e GR não possuem uma relação de proporcionalidade direta com o O<sub>3</sub>, ou seja, a exposição ao ozônio não influenciou diretamente na atividade das enzimas GR e APX.

A correlação entre os escores do eixo 1 e os parâmetros de sintomas foliares induzidos por ozônio resultaram em coeficientes de -0,62 com os dados de incidência, de -0,63 com os dados de severidade e de -0,59 com os dados do índice de injúria foliar ( $P < 0,001$ ). A correlação entre os escores do eixo 2 com os dados de sintomas não foi significativa.



**Figura 52.** Ordenação das unidades amostrais pelo método de Análise de Componentes Principais. Abreviatura das variáveis: SOD: superóxido dismutase; GR: glutaciona redutase; APX: ascorbato peroxidase; valverão: comprimento do dia; O<sub>3</sub>: concentração acumulada de O<sub>3</sub> entre 7h00 e 17h00; Temp: temperatura média; UR: umidade relativa média; DPV: déficit de pressão de vapor do ar; ppt: precipitação acumulada; Irrad: radiação solar global acumulada. Unidades amostrais: (dias de coleta de dados).

**Tabela 14.** Correlação (Pearson) das variáveis com os componentes principais e porcentagem de variabilidade explicada pelos eixos (%) ( $n = 31$ ).

Variáveis	Abreviatura	Componentes Principais		
		1	2	3
Superóxido dismutase	SOD	<b>0,54</b>	0,12	0,19
Glutaciona redutase	GR	0,13	0,32	<b>0,61</b>
Ascorbato peroxidase	APX	0,01	<b>0,71</b>	<b>0,51</b>
Comprimento dia	valverão	0,01	<b>0,84</b>	0,24
Ozônio	O <sub>3</sub>	<b>-0,66</b>	-0,36	<b>0,58</b>
Temperatura média	Temp	-0,16	<b>0,86</b>	-0,26
Umidade relativa média	UR	<b>-0,54</b>	<b>0,59</b>	<b>-0,50</b>
Déficit de pressão de vapor	DPV	<b>0,58</b>	0,04	<b>0,49</b>
Precipitação acumulada	ppt	<b>-0,87</b>	0,12	0,08
Irradiação solar	Irrad	<b>-0,87</b>	-0,21	0,40
<b>Variância explicada</b>		29 %	26 %	18%

#### 4.5.3. Análise conjunta das variáveis bióticas e abióticas

A análise de componentes principais conjunta considerou como variáveis bióticas e abióticas aquelas integrantes da ACP de trocas gasosas das folhas maduras e da ACP da atividade das enzimas antioxidativas, à exceção da variável valverão.

A ACP conjunta reuniu 55 % da variabilidade total dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (figura 53 e tabela 15). As principais variáveis associadas ao eixo 1 foram:  $O_3$  ( $r = 0,90$ ),  $A_{sat}$  ( $r = 0,89$ ), Irrad ( $r = 0,88$ ),  $g_s$  ( $r = 0,71$ ), E ( $r = 0,60$ ) e Temp ( $r = 0,57$ ). O eixo 2 apresentou como principais variáveis associadas a umidade ( $r = 0,77$ ), o DPV ( $r = 0,70$ ), a precipitação ( $r = 0,64$ ), as enzimas GR ( $r = 0,59$ ) e SOD ( $r = 0,45$ ). E no eixo 3, somente a APX ( $r = 0,79$ ) (tabela 15).

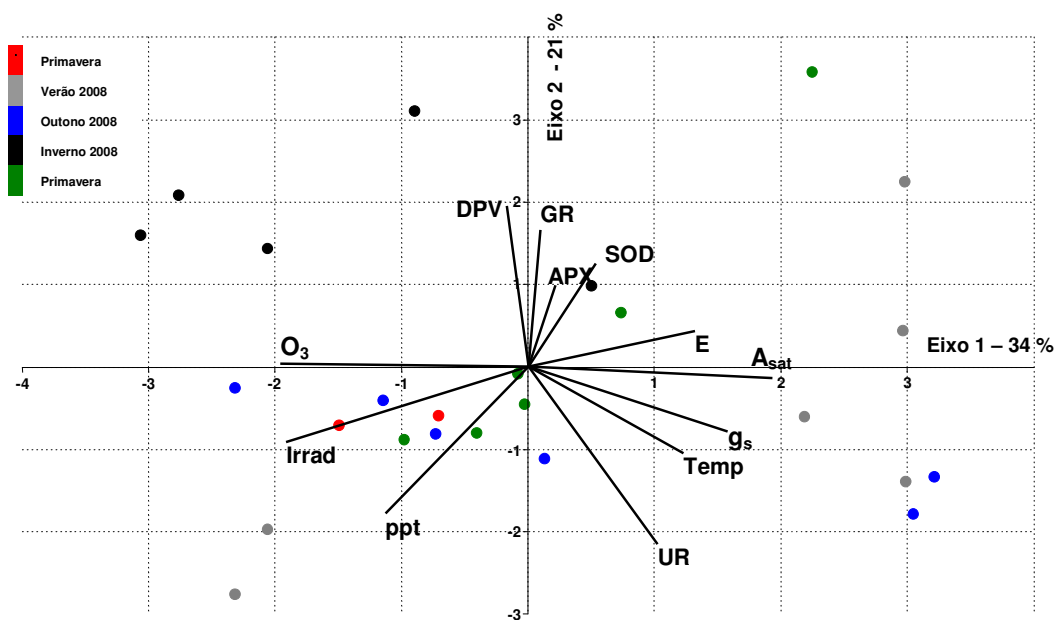
Assim como obtido na ACP de trocas, o eixo 1 mostrou um claro antagonismo entre o  $O_3$  e as variáveis de trocas gasosas, em especial a  $A_{sat}$  (figura 53). Ainda em relação ao eixo 1 verifica-se a relação direta entre o ozônio e a irradiação em oposição aos parâmetros de trocas (também observada nas análises anteriores), e entre as variáveis de trocas e temperatura (observada na ACP de trocas das folhas maduras) (figura 53).

Diferentemente da disposição apresentada na análise da atividade enzimática, não foi observada a oposição da SOD com o  $O_3$ . Essa enzima, junto à GR, ficaram associadas com o eixo 2, o qual ainda indica uma relação indireta entre o DPV e as variáveis precipitação e umidade (figura 53).

O eixo 3 mostrou a relação entre as enzimas GR e APX, associadas com a temperatura.

As correlações entre os escores do eixo 1 e os parâmetros de sintomas foliares induzidos por ozônio resultaram em coeficientes de -0,65 com os dados de incidência, de -0,67 com os dados de severidade e de -0,64 com os dados IIF ( $P < 0,001$ ). A correlação entre os escores do eixo 2 com os dados de sintomas não foi significativa.





**Figura 53.** Ordenação das unidades amostrais pelo método de Análise de Componentes Principais. Abreviatura das variáveis:  $A_{sat}$ : assimilação líquida de  $CO_2$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante;  $g_s$ : condutância estomática; E: transpiração; SOD: superóxido dismutase; GR: glutaciona redutase; APX: ascorbato peroxidase;  $O_3$ : concentração acumulada de  $O_3$  entre 7h00 e 17h00; Temp: temperatura média; UR: umidade relativa média; DPV: déficit de pressão de vapor do ar; ppt: precipitação acumulada; Irrad: irradiação solar global acumulada. Unidades amostrais: (dias de coleta de dados).

**Tabela 15.** Correlação (Pearson) das variáveis com os componentes principais e porcentagem de variabilidade explicada pelos eixos (%) ( $n = 25$ ).

Variáveis	Abreviatura	Componentes Principais		
		1	2	3
Assimilação de $CO_2$	$A_{sat}$	<b>0,89</b>	-0,05	0,11
Condutância estomática	$g_s$	<b>0,71</b>	-0,28	-0,09
Transpiração	E	<b>0,60</b>	0,16	-0,01
Superóxido dismutase	SOD	0,25	<b>0,45</b>	-0,25
Glutaciona redutase	GR	0,04	<b>0,59</b>	<b>-0,48</b>
Ascorbato peroxidase	APX	0,09	0,36	<b>-0,79</b>
Ozônio	$O_3$	<b>-0,90</b>	0,01	-0,09
Temperatura média	Temp	<b>0,57</b>	-0,38	<b>-0,52</b>
Umidade relativa média	UR	0,47	<b>-0,77</b>	-0,29
Déficit de pressão de vapor	DPV	-0,07	<b>0,70</b>	-0,18
Precipitação acumulada	ppt	-0,52	<b>-0,64</b>	-0,43
Irradiação solar	Irrad	<b>-0,88</b>	-0,33	-0,28
<b>Variância explicada</b>		<b>34 %</b>	<b>21 %</b>	<b>13 %</b>

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Condições meteorológicas e qualidade do ar

Uma característica marcante observada nas manifestações climáticas durante o período de estudo foi a ocorrência de grandes oscilações na temperatura e na umidade relativa em uma mesma estação, como se verifica nas figuras 15 e 16, evidenciando uma fraca sazonalidade. Contudo, a variação na quantidade de precipitação entre as estações permite uma diferenciação em épocas de período mais secos e mais chuvosos (figura 17).

É característico dos meses de outono e inverno apresentar grande estabilidade atmosférica, maior frequência de inversões térmicas e baixa precipitação, condições que dificultam a dispersão dos poluentes primários causando seu confinamento na baixa atmosfera (CETESB 2009). Supõe-se que tais condições meteorológicas possam ter colaborado para as altas concentrações de  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}$  verificadas no período de estudo durante as exposições de Inverno 2008 e Outono 2008. Em conformidade, o Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo (CETESB 2009) relata que no ano de 2008, a maioria dos dias desfavoráveis à dispersão de poluentes na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) ocorreu nos meses de maio, julho e agosto.

A WHO (2000) e a UN/ECE (2004) estabelecem um nível crítico de  $75 \mu\text{g m}^{-3}$  de  $\text{NO}_x$  (soma das concentrações médias diárias de  $\text{NO}$  e  $\text{NO}_2$ ) para a ocorrência de efeitos adversos à vegetação nativa de regiões com clima temperado, valor ultrapassado na exposição de Inverno 2008 (média de  $54 \mu\text{g m}^{-3}$  de  $\text{NO}_2$  e  $38 \mu\text{g m}^{-3}$  de  $\text{NO}$ ). Contudo, são considerados como 'adversos' desde o estímulo no crescimento até a ocorrência de efeitos tóxicos (UN/ECE 2004). Uma vez que o nitrogênio é um macronutriente especialmente importante às plantas, seus óxidos se tornam fitotóxicos somente quando sua concentração no ar é consideravelmente alta (Mansfield 2003).

Wellburn (1993), em uma revisão sobre os efeitos do  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}$  em plantas, cita estudo que identifica uma concentração mínima de cerca de  $1.080 \mu\text{g m}^{-3}$  de  $\text{NO}_2$  e de  $720 \mu\text{g m}^{-3}$  de  $\text{NO}$ , por 90 minutos, para ocorrência de inibição na fotossíntese em *Avena sativa* e *Medicago sativa*. Dado que o período mais crítico no presente estudo, em relação às concentrações de  $\text{NO}_x$ , foi durante as exposições de Outono 2008 e Inverno 2008, cuja concentração média de  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}$  foi de  $51 \mu\text{g m}^{-3}$  e  $25 \mu\text{g m}^{-3}$  e máxima horária de  $401 \mu\text{g m}^{-3}$  e  $407 \mu\text{g m}^{-3}$ , é possível concluir que as concentrações de  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}$  registradas no PEFI não foram tóxicas a *Psidium guajava* 'Paluma', mesmo considerando-se que a sensibilidade da espécie a esses poluentes não é conhecida.

Devido à maior intensidade de irradiação solar e temperaturas mais elevadas, espera-se que a maior frequência de episódios de altas concentrações de O<sub>3</sub> ocorra nas estações de primavera e verão (setembro a março) (CETESB 2009). Contudo, comparada às demais exposições, a Primavera 2007 e o Verão 2008 apresentaram as menores concentrações médias de O<sub>3</sub> e baixos valores para os índices de exposição acumulada (EAO<sub>F</sub> e EAO<sub>10h</sub>). De acordo com os dados do Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo (CETESB 2009), no período de setembro de 2007 a março de 2008 houve muitos dias de precipitação e maior nebulosidade na RMSP, resultando em uma menor quantidade de episódios com altas concentrações de O<sub>3</sub> comparado aos anos anteriores.

Diferentemente das regiões de clima temperado, que apresentam episódios de altas concentrações de O<sub>3</sub> tipicamente restritos ao verão, dados da CETESB (2009) obtidos entre 1999 e 2008 mostram que a ocorrência de períodos com altas concentrações de ozônio em São Paulo é um evento comum a todas as estações (CETESB 2009), conforme constatado neste estudo onde se verificou altas concentrações médias do poluente nas estações de outono de 2007 e de inverno de 2008.

A variação no perfil diário da concentração de ozônio (figura 20) reflete a influência da radiação na formação do poluente. De acordo com Massambani & Andrade (1994), o característico pico noturno observado nos perfis de concentração de O<sub>3</sub>, inclusive no perfil obtido no PEFI, se deve à circulação atmosférica e, portanto, a um aporte de ozônio.

A correlação entre as concentrações horárias de ozônio e os valores horários do DPV indicou que altas concentrações de O<sub>3</sub> ocorreram, na maior parte das vezes, junto a altos valores de DPV. Muramoto *et al.* (2003) constataram que a maior parte das ultrapassagens do padrão de qualidade do ar para o ozônio na RMSP ocorre com umidade relativa inferior a 60% e em dias com irradiação solar acima de 600 W m<sup>2</sup>, condições que contribuiriam para um DPV mais alto.

Com base nas concentrações de O<sub>3</sub> pode-se dizer que prevaleceram no período de estudo exposições do tipo crônico, com o predomínio de concentrações horárias baixas e episódios de altas concentrações restritos a poucos dias durante as exposições (Bray *et al.* 2000).

No entanto, ao contrário do esperado para uma área com as características do PEFI, ou seja, afastada de fontes emissoras de poluentes primários e rodeada por fragmentos florestais, ocorreram poucos episódios de altas concentrações de ozônio e concentrações consideráveis de NO<sub>2</sub> e, especialmente, de NO, sendo que este último pode ter influenciado nas baixas concentrações visto que este óxido reage com o ozônio (Jacob 1999). Mas, ainda assim, as concentrações de O<sub>3</sub> obtidas ao longo do dia no PEFI foram suficientes para a ocorrência do

estresse oxidativo em *Psidium guajava* 'Paluma' e para a manifestação de sintomas foliares visíveis induzidos por O<sub>3</sub>.

## 5.2 Sintomas foliares visíveis

A manifestação de sintomas foliares visíveis induzidos por O<sub>3</sub> em *Psidium guajava* 'Paluma' durante todas as exposições evidenciou a ocorrência de concentrações fitotóxicas desse poluente no PEFI. Tais sintomas, que se caracterizavam por pontuações avermelhadas na superfície adaxial, foram similares aos já descritos por Furlan *et al.* (2007) e Pina & Moraes (2007) para esta cultivar e estavam em conformidade com o padrão estabelecido na literatura (Sanz *et al.* 2002, Novak *et al.* 2003).

A manifestação de pontuações vermelho-amarronzadas, denominadas de pigmentação ou bronzeamento, constitui uma forma de injúria crônica resultante da formação e acúmulo, dentro da célula viva, de pigmentos fenólicos, como a antocianina, quinonas polimerizadas ou proteínas (Krupa & Manning 1988, Heath *et al.* 2009).

Rezende & Furlan (2009) verificaram que a intensificação dos sintomas foliares visíveis em indivíduos jovens de 'Paluma', expostos à variadas concentrações de ozônio, esteve associada ao aumento nos níveis de antocianina e de taninos totais. As autoras concluíram que provavelmente as antocianinas são responsáveis pelo aspecto avermelhado dos sintomas foliares visíveis em 'Paluma'.

As antocianinas podem atuar tanto na fotoproteção das folhas, dissipando o excesso de luz que provocaria danos, como na destoxificação de espécies reativas de oxigênio (Yamasaki *et al.* 1997, Gould *et al.* 2002, Neill & Gould 2003, Hughes *et al.* 2005).

Koukol & Dugger (1967) constataram que a coloração avermelhada nas folhas de *Rumex crispus* em resposta ao ozônio foi consequência da formação e acúmulo de antocianina (cianidina glicosídeo) e que este fenômeno não esteve acompanhado da perda de clorofila endógena. Silva & Moraes (dados não publicados), em estudo conduzido no âmbito do projeto que este estudo integra, determinaram a concentração de clorofila em folhas das mesmas plantas aqui analisadas e verificaram que a concentração de clorofila manteve-se constante. Desse modo, pode-se concluir que a manifestação de pontuações avermelhadas em 'Paluma' após exposição ao ozônio, muito provavelmente decorre do aumento da produção e acúmulo de antocianina e não é acompanhada pela degradação da clorofila.

Enquanto alguns autores diferenciam a manifestação de cloroses e necroses foliares induzidas por ozônio (injúria foliar) da pigmentação (sintoma foliar) (De Temmerman *et al.* 2004, Dizengremel *et al.* 2008), outros autores classificam todos esses três tipos de manifestação como injúria visível (Krupa & Manning 1988, Heath *et al.* 2009).

Em estudo com *Virbunum lantana*, *Prunus avium* e *Fraxinus excelsior*, espécies de clima temperado sensíveis ao ozônio, Gravano *et al.* (2004) verificaram que as alterações anatômicas e ultraestruturais nas folhas de *Fraxinus excelsior* (cujo sintoma visível se caracteriza por pontuações necróticas) são indicativos de uma resposta hipersensível, dada a ocorrência de células colapsadas e de caloses nas paredes celulares; ao passo que nas folhas de *V. lantana* e *P. avium* (cujo sintomas foliares visíveis se caracterizam como pontuações avermelhadas decorrente do acúmulo de antocianina) não ocorre esse tipo de resposta, dada a ausência de células colapsadas e de um padrão na distribuição das caloses. Os autores concluem que o acúmulo de antocianina induzido por ozônio nas folhas de *V. lantana* e de *P. avium* não indicaria uma injúria ou dano, mas evidenciaria o desencadeamento de um mecanismo de defesa. Da mesma forma, o acúmulo de antocianina induzido por ozônio nas folhas de *Psidium guajava* 'Paluma' seria mais bem caracterizado como um sintoma foliar do que como uma injúria. Contudo, embora não haja perda de clorofila ou morte celular, a longo prazo os processos bioquímicos desencadeados pelo ozônio em 'Paluma' implicariam em um custo metabólico. Nesse sentido, Saleem *et al.* (2001) observaram que o aumento do conteúdo fenólico nas folhas de *Betula pendula* sob exposição ao ozônio, correlacionou-se com a redução no crescimento, indicando que a alocação de carbono foi alterada em direção à formação de compostos de defesa em detrimento de outros processos fisiológicos.

A variação na EAO<sub>F</sub> (exposição acumulada de ozônio) e no número de dias que antecederam a manifestação de sintomas foliares visíveis em 'Paluma', observada nas diferentes exposições (tabela 06), também foi constatada por Pina & Moraes (2007) e Pina & Moraes (Pina & Moraes 2010) em experimento sob condições ambientais no Parque Municipal do Ibirapuera. As autoras verificaram a manifestação de sintomas foliares em 'Paluma' após EAO<sub>F</sub> de 341 µg m<sup>-3</sup> e 40 dias de exposição, 1.156 µg m<sup>-3</sup> e 13 dias de exposição e 1.495 µg m<sup>-3</sup> e 7 dias de exposição durante, respectivamente, as estações de inverno, primavera e verão de 2006 (Pina & Moraes 2007) e após EAO<sub>F</sub> de 1.186 µg m<sup>-3</sup> e 48 dias de exposição, 2.790 µg m<sup>-3</sup> e 75 dias de exposição e 487 µg m<sup>-3</sup> e 13 dias de exposição durante, respectivamente, as estações de verão, outono, inverno de 2007 (Pina & Moraes 2010).

Tal variação também foi observada em outros estudos, como o de Peñuelas *et al.* (1999) que verificaram uma grande variação na EAO<sub>F</sub> (de 196 µg m<sup>-3</sup> a 2.940 µg m<sup>-3</sup> de O<sub>3</sub>) que antecedeu a manifestação de injúrias foliares visíveis induzidas por ozônio em *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' em exposição sob diferentes condições ambientais.

A condição *sine qua non* para a manifestação de sintomas foliares induzidos por ozônio é que, além da ocorrência de O<sub>3</sub> na troposfera, este poluente seja absorvido pelas

plantas por meio dos estômatos, desencadeando processos fisiológicos, os quais poderão resultar na manifestação de sintomas foliares visíveis. Por conseguinte, fatores ambientais como a umidade do ar, temperatura, DPV, umidade do solo, velocidade dos ventos, irradiância; e fatores biológicos como a variabilidade genética e estágio de desenvolvimento, ao intervirem na condutância estomática, acabam por determinar uma maior ou menor absorção do O<sub>3</sub> pelas plantas e, conseqüentemente, interferem na manifestação dos sintomas foliares visíveis (Peñuelas *et al.* 1999, Schaub *et al.* 2003, Manning 2003, EPA 2006, Klumpp *et al.* 2006, Heath *et al.* 2009).

Entre os fatores citados acima, o DPV é uma reconhecida fonte de variação na manifestação dos sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio, uma vez que altos valores de DPV pressupõem condições climáticas sob as quais as plantas manteriam seus estômatos fechados e, portanto, não absorveriam o poluente (Balls *et al.* 1996, Emberson *et al.* 2000, Piikki *et al.* 2008, Then *et al.* 2009). Desse modo, procurou-se relacionar os valores de DPV e as concentrações de O<sub>3</sub> registradas no período que antecederam a manifestação de sintomas foliares em 'Paluma', visando identificar uma possível causa para as diferenças (figuras 29, 30 e 31). Contudo, embora os gráficos mostrem que períodos com baixo DPV e altas concentrações de O<sub>3</sub> antecederam a manifestação, não foi encontrada uma clara relação entre essas variáveis indicando a provável influência de outros fatores, tal como a precipitação. Pina & Moraes (2007) relatam que indivíduos de 'Paluma' que haviam passado por um período de chuva que durou algumas semanas e que, portanto, estavam bem irrigados e expostos a condições ambientais sem ozônio, apresentaram uma rápida manifestação de sintomas foliares após uma baixa EAO<sub>F</sub>. Na exposição de Verão 2008 os sintomas foliares visíveis induzidos por O<sub>3</sub> apareceram após EAO<sub>F</sub> de 2 µg m<sup>-3</sup>, um valor muito baixo, contudo essa exposição registrou a maior quantidade de precipitação (figura 17), o que pode ter acarretado na absorção efetiva das baixas concentrações de O<sub>3</sub> presentes no ambiente com a conseqüente manifestação de sintomas foliares.

Observa-se, portanto, que não há um limiar fixo, no que se refere à EAO<sub>F</sub> e derivações para a manifestação de sintomas foliares em 'Paluma', haja vista a influência de fatores climáticos, como o DPV e a precipitação, nesse processo.

Embora os exemplares de 'Paluma' das exposições de Outono 2007 e de Verão 2008 tenham apresentado sintomas foliares mais rapidamente (após 9 e 19 dias de exposição), os maiores valores de severidade, incidência e IIF foram encontrados na exposição de Primavera 2007 (manifestação inicial de sintomas aos 33 dias). Calatayud *et al.* (2007) também verificaram resultado semelhante em quatro espécies do gênero *Acer* e discutem que uma rápida manifestação de sintomas foliares não implica em uma maior porcentagem de folhas

afetadas na planta ao final do período de exposição. Orendovici *et al.* (2003) verificaram em estudo que avaliou a manifestação de sintomas foliares induzidos por ozônio em espécies nativas da Espanha e dos EUA sob exposição controlada, que enquanto alguns indivíduos de uma mesma espécie apresentaram uma alta sensibilidade, outros mostraram-se assintomáticos. Chappelka *et al.* (2003) e Davison *et al.* (2003), em estudo com *Rudbeckia laciniata*, espécie sensível ao ozônio que ocorre naturalmente no Parque Nacional Great Smoky Mountains (EUA), concluíram que a variação no desenvolvimento de sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em duas populações dessa espécie provavelmente seria devido às diferenças nas condições ambientais e à variabilidade genética. De maneira similar, os fatores ambientais podem ter colaborado para as diferenças nos valores da incidência, severidade e IIF em 'Paluma'.

A associação entre o desenvolvimento dos sintomas foliares visíveis em *Psidium guajava* 'Paluma' e a EAO<sub>F</sub> obtidos no experimento em tela foi mais fraca ( $r^2 = 0,15$  com IIF;  $p < 0,05$ , tabela 07) que a obtida por Furlan *et al.* (2007) com a mesma cultivar ( $r^2 = 0,91$  com IIF;  $p < 0,05$ ) em condições controladas (exposição em câmara de topo aberto). No entanto, encontra-se mais próxima à associação obtida por Pina & Moraes (2007) em estudo com 'Paluma' sob condições ambientais na cidade de São Paulo ( $r^2 = 0,38$  com IIF;  $p < 0,05$ ).

A regressão linear entre sintomas foliares e ozônio, muito útil em estudos realizados sob condições controladas (concentração constante de O<sub>3</sub> e condições micrometeorológicas estáveis), tem pouca aplicabilidade em estudos como este, realizado em condições de campo. Neste caso, essa técnica que considera a interação de apenas duas variáveis, é limitada por conta da diversidade de interações que podem simultaneamente agir sobre a resposta da planta (Ashmore 2005, Ferreti *et al.* 2007). Dessa forma, era esperado uma fraca associação entre as concentrações de O<sub>3</sub> e os sintomas foliares obtidos em 'Paluma' expostas no PEFI. Adicionalmente, partindo-se do pressuposto que normalmente demora algum tempo para que os sintomas foliares induzidos por O<sub>3</sub> se desenvolvam, a exposição acumulada de ozônio considerada no cálculo da regressão não necessariamente é aquela responsável pelo desenvolvimento do sintoma foliar (Klumpp *et al.* 2006).

Heath *et al.* (2009) discutem que a não-linearidade entre a concentração de O<sub>3</sub> e a resposta induzida nas plantas é uma condição esperada dada a existência de fatores intrínsecos à planta (variação na atividade do sistema antioxidativo e absorção de ozônio) e fatores ambientais que irão interferir na dose efetiva de O<sub>3</sub>. Nesse sentido, Krupa *et al.* (1993), após experimento com *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' no qual verificou-se uma baixa associação entre injúrias foliares e ozônio ( $r^2 = 0,30$ ), assumem que a cultivar pode ser utilizada como indicador qualitativo da exposição ao O<sub>3</sub>, mas não como indicador quantitativo. Igualmente, a

manifestação e progressão de sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em 'Paluma' verificados durante o período de estudo corroboram sua sensibilidade ao ozônio (Furlan *et al.* 2007, Pina & Moraes 2007), apresentando, no entanto, como esperado, uma resposta qualitativa, ou seja, não linear.

### 5.3 Trocas Gasosas

A análise de componentes principais evidenciou um forte antagonismo entre o O<sub>3</sub> e os parâmetros de trocas gasosas obtidos em *Psidium guajava* 'Paluma', indicando que a exposição acumulada de ozônio pode ter influenciado o declínio da assimilação de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante (A<sub>sat</sub>), da condutância estomática (g<sub>s</sub>) e da transpiração (E). Ressalva-se que tal relação foi verificada tanto na análise das folhas maduras quanto na análise das folhas jovens (figuras 50 e 51) indicando, dessa maneira, que ainda que possa haver algum efeito do envelhecimento nos resultados obtidos nas folhas maduras de 'Paluma', esse efeito foi intensificado pela exposição ao ozônio.

Alterações nas trocas gasosas decorrentes do estresse oxidativo induzido por O<sub>3</sub> nas plantas foram relatadas em diversos estudos (EPA 2006). Dessas alterações destacam-se a redução na assimilação de CO<sub>2</sub> e a redução na condutância estomática (Schaub *et al.* 2003, Novak *et al.* 2005, Moraes *et al.* 2006, Witting *et al.* 2007). Contudo, a seqüência de eventos no aparato fotossintético ainda não está clara. Enquanto algumas pesquisas averiguaram que inicialmente ocorre uma redução na condutância com a conseqüente redução na assimilação (Plazek *et al.* 2000, Nali *et al.* 2004, Kitao *et al.* 2009), outras indicam que a assimilação de CO<sub>2</sub> é inicialmente afetada seguindo-se da redução na condutância (Farage *et al.* 1991, Noormets *et al.* 2001, Bagard *et al.* 2008).

Em geral, e na maior parte das modelagens fisiológicas, assume-se que a abertura estomática é fortemente acompanhada pela fotossíntese e governada pela concentração interna de gás carbônico (Grulke *et al.* 2007). Guidi *et al.* (2001), em experimento com *Populus x euramericana*, verificaram, após exposição ao ozônio, que a concentração interna de CO<sub>2</sub> não variou, ao contrário da fotossíntese e da condutância que apresentaram uma redução significativa. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a redução na taxa fotossintética não foi somente devido à redução na g<sub>s</sub>, mas também devido a uma menor capacidade de assimilação das células do mesófilo, uma vez que a C<sub>i</sub> não variou.

Nesse sentido, Kitao *et al.* (2009) concluíram que a redução na A<sub>sat</sub> verificada em indivíduos adultos da espécie *Fagus sylvatica*, após dose crônica de O<sub>3</sub>, foi principalmente devido à uma limitação estomática, visto que houve uma redução na C<sub>i</sub>. Outros estudos,



também se basearam nas alterações na  $C_i$  para concluir sobre a seqüência de eventos desencadeada pelo ozônio na fotossíntese (Calatayud *et al.* 2003, Calatayud *et al.* 2007).

Os resultados obtidos nas folhas de 'Paluma' mostram, ao final dos períodos de exposição, a ocorrência de redução em  $A_{sat}$ , na condutância estomática, na transpiração e aumento na concentração interna de  $CO_2$ . Embora essas alterações não tenham sido concomitantes e nem mesmo uma constante ao longo das exposições (em algumas exposições não foram verificadas diferenças significativas), pode-se concluir que, no presente estudo, a diminuição na condutância estomática não seria a causa principal de redução na  $A_{sat}$ . Em acréscimo, a correlação positiva entre os dados de  $A_{sat}$  e de  $g_s$  obtidas nas folhas de 'Paluma' em todas as exposições (tabela 09) indica que não houve desacoplamento entre a  $A_{sat}$  e  $g_s$  e que, portanto, não houve danos aos estômatos ou perda de controle estomático (Bortier *et al.* 2000, Paoletti & Grulke 2005).

Segundo alguns autores (Volin *et al.* 1993, Tjoelker *et al.* 1993, Wei *et al.* 2004, Orendovinci-Best *et al.* 2008), a razão  $A_{sat}/g_s$ , ou seja a EUAi, está fortemente relacionada a quantidade de sintomas foliares induzidos por  $O_3$ , dado que altas taxas de fotossíntese podem contrabalancear a ação do  $O_3$  ao fornecer maior quantidade de poder redutor (NAD(P)H e ATP) para os processos de defesa e reparo. No entanto, os dados de EUAi obtidos em 'Paluma' não permitem concluir sobre essa relação visto que os mesmos não, necessariamente, foram obtidos em indivíduos que apresentavam sintomas foliares. Contudo, verifica-se que as exposições com manifestação de sintomas foliares mais intensos (Primavera 2007 e Outono 2007) apresentaram baixa EUAi quando comparada às demais (tabela 10).

Embora os parâmetros de trocas gasosas nas folhas com diferentes idades tenham sido afetados pela exposição ao ozônio, quando se considera os valores obtidos no início e no fim do período das diferentes exposições, verifica-se que as folhas maduras apresentaram a maior quantidade de diferenças significativas e maior porcentagem de variação relativa (tabela 08). Esse resultado era esperado dado que as folhas maduras das espécies arbóreas são mais suscetíveis ao ozônio do que as folhas mais novas, recém expandidas (Pääkkönen *et al.* 1995, Wei *et al.* 2004). Segundo Pell *et al.* (1994), ao aumentar a degradação da Rubisco e reduzir sua síntese (perda do RNAm das subunidades da Rubisco), o ozônio causaria uma maior carga de distúrbios nas folhas maduras, pois estas naturalmente apresentam uma menor síntese protéica.

Novak *et al.* (2005) em estudo com indivíduos jovens de *Viburnum lantana*, *Fraxinus excelsior* e *Populus nigra* sob exposição ao ozônio, verificaram que as maiores reduções na  $A_{sat}$  corresponderam ao início da manifestação de sintomas foliares visíveis. Calatayud *et al.* (2007) observaram a redução da  $A_{sat}$  e da  $g_s$  em folhas sintomáticas e assintomáticas,

enquanto que Moraes *et al.* (2006), em estudo com *Caesalpinia echinata* observaram redução na  $A_{\text{sat}}$  e na  $g_s$  na ausência de sintomas foliares induzidos por  $O_3$ . No presente estudo, as análises de trocas gasosas em 'Paluma' ocorreram na maioria das vezes em folhas assintomáticas, mas pertencentes a indivíduos que possuíam folhas com sintomas foliares, geralmente, no 1° e 2° nós, condição que permite concluir que a manifestação de sintomas foliares visíveis em 'Paluma' é precedida de alterações nas trocas gasosas.

Adicionalmente, a correlação significativa obtida entre os parâmetros dos sintomas foliares e os escores oriundos da análise de componentes principais aplicada aos dados resultantes das medidas de trocas gasosas indicou que o desenvolvimento de sintomas foliares em 'Paluma', além de estar diretamente relacionado a uma maior exposição ao  $O_3$ , está relacionado a uma menor capacidade de assimilação. Exposições crônicas ao  $O_3$ , como a verificada no PEFI durante o período de estudo, afetam inicialmente os processos metabólicos, como a fotossíntese, não provocando ou provocando mais tardiamente a manifestação de injúrias foliares visíveis (Bray *et al.* 2000, EPA 2006, Gielen *et al.* 2007, Overmyer *et al.* 2009). Ressalva-se, no entanto, que conforme discutido anteriormente, para 'Paluma' os sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio estariam atuando mais como uma forma de proteção do que como injúria.

Na análise de componentes principais referente às trocas gasosas das folhas jovens e maduras, a irradiância global mostrou forte associação com o  $O_3$  e forte antagonismo com a  $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$  e E. Disposição que pode retratar tanto o processo fotoquímico de formação do ozônio, quanto a ocorrência de fotoinibição, uma vez que as plantas permaneceram expostas diretamente sob luz solar. A fotoinibição decorre da exposição a níveis de energia luminosa que excedem a capacidade de utilização pela fotossíntese levando à inativação dos centros de reação do fotossistema II (FSII), ao aumento na dissipação de energia térmica, à produção de oxigênio singlete e de radicais superóxido e, em último caso, danificando o aparato fotossintético (Demmig-Adams & Adams III 1992, Taiz & Zeiger 2009).

Altos níveis de  $O_3$  e de energia luminosa são dois fatores de estresse que geralmente ocorrem simultaneamente dado que uma alta intensidade de radiação é condição essencial para a formação de ozônio na troposfera. Uma vez que o ozônio afeta a atividade da Rubisco, reduzindo a eficiência de carboxilação das folhas, há o acúmulo de energia de excitação, o qual pode suplantar os mecanismos de dissipação de energia existentes no cloroplasto levando à fotoinibição (Dann & Pell 1989, Guidi *et al.* 2002). Além disso, sob condições ambientais estressantes, tais como a presença de  $O_3$ , mesmo níveis moderados de radiação podem promover a fotoinibição (Powles 1984). Dessa forma, se houve fotoinibição em 'Paluma' essa foi intensificada pela exposição ao  $O_3$  e pela redução na assimilação de  $CO_2$ .

Corroborando esta hipótese, Guidi *et al.* (2002) observaram que indivíduos jovens de *Phaseolus vulgaris* 'Pinto' expostos concomitantemente aos tratamentos de fumigação com ozônio e alta intensidade luminosa apresentaram maior redução na assimilação de CO<sub>2</sub> do que aqueles indivíduos que permaneceram expostos aos tratamentos separadamente. Ademais, uma vez que o FSII é suscetível ao estresse oxidativo induzido por ozônio (Sane *et al.* 1996), a ocorrência de alterações nessa estrutura podem *per se* terem colaborado para o declínio na A<sub>sat</sub> em 'Paluma', contudo, dado que não foram realizadas análises de fluorescência, não foi possível verificar tal hipótese.

Ainda em relação à ACP, observa-se que na análise das folhas maduras, a temperatura esteve positivamente associada com os parâmetros de trocas, embora com uma correlação mais fraca que a estabelecida pelo O<sub>3</sub> e pela irradiação. O efeito da temperatura sobre as trocas gasosas é bastante conhecido (Larcher 2000) e era esperado como constatado no início da exposição de Inverno 2008.

Embora ainda sejam necessárias mais estudos com a avaliação de outros parâmetros, como curvas de resposta à luz, curvas de resposta ao CO<sub>2</sub> e medidas de fluorescência da clorofila a, assume-se que provavelmente a diminuição na A<sub>sat</sub> verificada em *Psidium guajava* 'Paluma' exposta às condições ambientais no PEFI seja consequência de distúrbios causados indiretamente pelo O<sub>3</sub> na etapa de carboxilação e/ou na etapa fotoquímica e intensificados pela radiação. A redução na condutância seria uma resposta ao aumento das concentrações internas de CO<sub>2</sub>. Todavia, mesmo como um efeito secundário ao ozônio, uma menor g<sub>s</sub> contribui para limitar a assimilação de carbono (Bortier *et al.* 2000).

#### **5.4 Atividade Enzimática Antioxidativa**

Diferentemente dos parâmetros de trocas gasosas, a resposta da atividade enzimática antioxidativa ao ozônio em 'Paluma' foi menos evidente.

De acordo com a análise de componentes principais, as variáveis que apresentaram relação mais forte com o eixo 1 foram a atividade da SOD, precipitação, irradiação, exposição ao ozônio, UR e DPV (figura 52). A relação inversa da SOD com essas variáveis, à exceção do DPV, indica que a atividade da SOD mostrou um aspecto sazonal, sendo menor nos períodos com precipitação e irradiação mais altas, como verificado na exposição de Primavera e Verão de 2008. Períodos com essas características correspondem também aos de maiores concentrações de ozônio, conforme evidenciado na ACP onde a terceira maior correlação com o eixo 1 foi estabelecida com o O<sub>3</sub>. A ACP também indicou que a atividade da enzima aumentou junto com um maior DPV, o que retrataria a relação inversa estabelecida pela SOD com a precipitação (atividade da SOD diminui com o aumento da precipitação, a qual é menor

nas estações de inverno e outono, épocas mais secas). Por outro lado, a redução na atividade da SOD verificada nas exposições de Verão 2008 e Primavera 2008 também pode estar associada ao processo de senescência das folhas maduras (Polle *et al.* 1989, Bowler *et al.* 1992). Tresmondi (dados não publicados), realizou estudo ultraestrutural nas folhas maduras de 'Paluma' utilizadas neste estudo e constatou a ocorrência de senescência celular acelerada, confirmando a ocorrência do estresse oxidativo induzido por ozônio.

A resposta da SOD aos poluentes atmosféricos não é específica (Li 2003). Enquanto alguns estudos relatam uma maior atividade da enzima nas folhas de plantas expostas ao ozônio (Gupta *et al.* 1991, Li 2003, Nali *et al.* 2004, Bulbovas *et al.* 2007, Esposito *et al.* 2009), outros estudos não observaram nenhuma variação na atividade (Nali *et al.* 2004, Moraes *et al.* 2006).

Sheng *et al.* (1993) não encontraram alterações na atividade da SOD nas folhas de três cultivares de soja ("Essex", "Willian82" e "Dare"), mesmo após uma exposição aguda ao O<sub>3</sub> (392 µg m<sup>-3</sup> por 4 horas). Já Keutgen & Pawelzik (2008) verificaram uma redução significativa na atividade da SOD apoplástica nas folhas de *Fragaria x ananassa* 'El Santa' (morangueiro) após exposição ao ozônio (155 µg m<sup>-3</sup> de O<sub>3</sub> por 8 horas durante exposição de sete dias e de dois meses conduzidas por dois anos consecutivos) e em comparação aos exemplares que permaneceram sob ar filtrado. Tanto Sheng *et al.* (1993), quanto Keutgen & Pawelzik (2008) concluíram que nas plantas estudadas a SOD não estaria diretamente envolvida no sistema de destoxificação de efeitos induzidos pelo ozônio. De fato, a ausência de uma resposta da SOD ao ozônio em *Psidium guajava* 'Paluma' também foi observada por Dias *et al.* (2007) e Pina & Moraes (2010) que em condições experimentais e ambientais próximas às do caso em tela chegaram a conclusão similar àqueles de Sheng *et al.* (1993) e Keutgen & Pawelzik (2008).

Embora também tenham verificado uma redução na atividade da SOD em folhas de *Lycopersicon esculentum* 'Tiny Tim' devido à exposição ao ozônio, Calatayud & Barreno (2001) concluíram que a redução pode ser consequência de uma alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, desencadeada pelo O<sub>3</sub>, o qual inibiria a atividade da SOD. No entanto, é pouco provável que tal condição tenha ocorrido em 'Paluma', visto que a EAO<sub>F</sub> no experimento de Calatayud e Barreno (2001) (200.000 µg m<sup>-3</sup> por 100 dias) foi muito maior que a observada no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (382 µg m<sup>-3</sup> e 983 µg m<sup>-3</sup> por 80 dias).

Em relação às enzimas APX e GR, verificou-se uma atividade constante, no caso da GR, ou praticamente constante, no caso da APX. A análise de componentes principais retratou a ausência de influência direta da exposição ao ozônio na atividade dessas enzimas. Resultado semelhante foi obtido por Calatayud & Barreno (2001) que verificaram que a

atividade da GR e da APX em *Lycopersicon esculentum* 'Tiny Tim' expostos ao ozônio não diferenciou daqueles expostos ao ar filtrado. Contrariamente Woo *et al.* (2007), observaram uma maior atividade das enzimas GR e APX nos exemplares de *Erythrina orientalis* que permaneceram em áreas poluídas (SO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub>) em comparação com áreas não poluídas. Já Pasqualini *et al.* (2001), observaram que, 60 horas depois do término da exposição ao O<sub>3</sub> (294 µg m<sup>-3</sup> de O<sub>3</sub> por 5 horas), a atividade da GR nas folhas maduras e velhas das cultivares *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' e *Nicotiana tabacum* 'Bel B' era igual à atividade encontrada nas mudas da área controle (ar filtrado); em compensação, a APX apresentou uma atividade mais variada, com maior nível nas folhas maduras de 'Bel B' e menor nível nas demais folhas analisadas (folhas maduras e velhas de 'Bel-W3' e folhas velhas de 'Bel B').

Em síntese, os resultados obtidos aqui corroboram os de Dias *et al.* (2007) e Pina e Moraes (2010), sendo possível que em 'Paluma' SOD, GR e APX não constituam a principal linha de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelo ozônio, ao menos em concentrações deste poluente semelhantes às verificadas nestes estudos. Portanto, caso tenha ocorrido fotoinibição, com a conseqüente produção de ERO, essa não foi tão intensa a ponto de suscitar uma resposta nas enzimas estudadas. Ademais, a presença de antocianina com cor em 'Paluma', ao absorver radiação que de outra forma atingiria os cloroplastos, pode ter proporcionado uma menor fotoinibição.

No entanto, é importante notar que as enzimas antioxidantes possuem diferentes isoformas e estão localizadas em vários compartimentos celulares, logo a análise enzimática bruta, ou seja, de todo o tecido foliar, não permite indicar com clareza o mecanismo de ação do O<sub>3</sub> e dificulta a elucidação do papel enzimático na tolerância ao poluente (Benes *et al.* 1995, Calatayud & Barreno 2001, EPA 2006) e aos fatores abióticos de estresse aos quais as plantas podem ter sido expostas.

Por outro lado, Dias *et al.* (2007) verificaram um aumento na concentração do antioxidante ácido ascórbico nas folhas de 'Paluma' expostas em local poluído por ozônio em comparação com exemplares que permaneceram em local com ar filtrado. Nesse sentido, sabe-se que as folhas de *Psidium guajava* apresentam altos níveis endógenos de compostos fenólicos, os quais podem atuar como antioxidantes (Quian & Nihorimbere 2004, Gutiérrez *et al.* 2008). Consequentemente, pode-se supor que, em 'Paluma', outros antioxidantes, como o ácido ascórbico e os compostos fenólicos, atuariam combatendo o estresse oxidativo induzido por O<sub>3</sub>.

Da mesma forma, conforme discutido anteriormente, as antocianinas também poderiam participar da destoxificação de espécies reativas de oxigênio em 'Paluma', dado que esta molécula apresenta uma alta capacidade antioxidativa (Wang *et al.* 1997), que sua

produção em 'Paluma' é provavelmente intensificada pela exposição ao ozônio (Rezende & Furlan, 2009) e que na ausência de outros compostos doadores de elétrons pode ser regenerada pelo ácido ascórbico (Yamasaki *et al.* 1997, Neil & Gould 2003), antioxidante que em 'Paluma' apresenta maiores níveis após exposição ao O<sub>3</sub> (Dias *et al.* 2007). Gould *et al.* (2002) e Neil & Gould (2003) relatam que a antocianina colorida e sem cor ("colourless") existente no citoplasma atuam diretamente na destoxificação das ERO oriundas do cloroplasto ou de outras organelas; ao passo que a antocianina alocada dentro dos vacúolos atua como uma linha de defesa secundária destoxificando os radicais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que vierem a ultrapassar o tonoplasto. Dessa maneira, estudos que analisem as variações nos níveis de ácido ascórbico e de antocianina discriminando sua localização celular em 'Paluma', após exposição ao ozônio, forneceriam um melhor retrato dos processos de defesa antioxidativo nesta cultivar.

### **5.5 *Psidium guajava* 'Paluma' como bioindicadora da poluição por ozônio**

O presente estudo procurou avaliar a manifestação de sintomas foliares visíveis e a ocorrência de alterações nas trocas gasosas e na atividade enzimática antioxidativa de *Psidium guajava* 'Paluma' expostas às condições ambientais a fim de caracterizar seu desempenho como espécie bioindicadora de O<sub>3</sub>. Uma vez que as concentrações experimentadas no PEFI durante o período de estudo foram menores que as documentadas na maioria dos estudos existente na literatura, tanto em condições controladas, quanto em condições ambientais, era esperada uma resposta menos evidente ao que tange à atividade das enzimas antioxidantes e às trocas gasosas, contudo ainda assim houve manifestação de sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio.

Os resultados obtidos nas análises de componentes principais foram coerentes com os fatos e evidências existentes na literatura acerca dos efeitos induzidos pelo ozônio em plantas, bem como acerca da influência das variáveis climáticas, conforme discutido acima.

Dada a complexidade das relações existentes em um contexto ecológico, optou-se por não incluir nas ACP os dados de sintomas foliares induzidos por ozônio (incidência, severidade e índice de injúria foliar), visto que outras variáveis não contempladas nas ACP poderiam estar interferindo na manifestação desses sintomas, mas sim correlacioná-los com os escores das amostras resultantes das análises. As correlações resultaram em coeficientes significativos somente com os escores do eixo 1 indicando que quanto maior a exposição ao ozônio maior a manifestação de sintomas foliares, menor a capacidade de trocas gasosas, principalmente de assimilação de carbono, e que as enzimas APX, GR e SOD seriam coadjuvantes nos processos de defesa antioxidativo. Embora, a irradiação tenha colaborado

para a redução nas trocas gasosas, possivelmente não deve ter sido fator preponderante na manifestação de sintomas foliares induzidos por ozônio em 'Paluma', uma vez que indivíduos jovens expostos em câmaras de fumigação sob luz artificial, com níveis de irradiação abaixo daquele encontrado nas condições ambientais, continuaram apresentando sintomas foliares avermelhados tais como os aqui estudados (Viola & Moraes, dados não publicados). Além disso, o acúmulo de antocianina quando não associado ao estresse induzido pelo O<sub>3</sub>, ocorre preferencialmente em folhas jovens, ao passo que os sintomas derivados do O<sub>3</sub> ocorrem nas mais velhas.

A variação no valor da EAO<sub>F</sub> e no valor da EAO<sub>10h</sub> precedentes à manifestação dos sintomas foliares verificada nas diferentes exposições indica que existe uma influência dos fatores meteorológicos na manifestação de sintomas foliares induzidos por ozônio em 'Paluma', em especial da precipitação e do déficit de pressão de vapor e, indiretamente, da irradiação conforme discutido no parágrafo anterior.

Atualmente, admite-se que os índices de exposição acumulada, como a EAO<sub>F</sub> e a EAO<sub>10h</sub> entre outros, por não considerarem as variáveis ambientais e biológicas não são adequados para avaliação do impacto causado pelo O<sub>3</sub> uma vez que os danos estariam mais relacionados com a absorção do poluente pelas plantas do que com as concentrações externas do O<sub>3</sub> (Musselman & Massaman 1999, Manning 2003, Gerosa *et al.* 2008, Klumpp *et al.* 2006). Além da condutância estomática, um índice que se proponha mais realístico deve considerar os mecanismos de destoxificação das ERO e a temporalidade intrínseca desses eventos (condutância estomática, atividade enzimática antioxidativa e a concentrações de ozônio) (Fiscus *et al.* 2005, Ashmore *et al.* 2005, Musselman *et al.* 2006, Tausz *et al.* 2007 Heath *et al.* 2009). Contudo, a idéia de um índice baseado na dose (absorção do ozônio) ou na dose efetiva (balanço entre a absorção do ozônio e a atividade antioxidativa) até o presente momento só foi instituída para algumas espécies (batata, trigo, bétula e faia), não sendo possível a extrapolação desses índices para outras espécies (Karlsson *et al.* 2007, Lorenz *et al.* 2008). Dessa forma, a EAO<sub>F</sub> ainda é utilizada como índice para proteção da vegetação pelos órgãos ambientais, inclusive pela CETESB que utiliza uma EAO<sub>F</sub> trimestral de 6000 µg m<sup>-3</sup> de O<sub>3</sub> como valor de referência para proteção da produtividade agrícola.

De acordo com De Temmerman *et al.* (2004) e Burger & Gochfeld (2004), um bioindicador eficiente deve apresentar relevância biológica, metodológica e social. Ou seja, deve exibir uma resposta após contanto com o estresse de interesse, mas não deve ser tão sensível a ponto de que a resposta ocorra quando não há causas para afetar; deve reagir claramente a mudanças que ocorrem no ambiente de forma mensurável e de acordo com um modelo pré-estabelecido; e deve ter clara aceção e sensibilizar legisladores e população.

Além de apresentar essas características, é interessante que o bioindicador detecte o estresse crônico por baixos níveis de poluente e que a resposta bioindicadora integre fatores externos e endógenos à planta (Klumpp 2001).

Conforme verificado no presente estudo, a resposta bioindicadora de 'Paluma' integra fatores endógenos e ambientais, é desencadeada pela exposição ao O<sub>3</sub>, inclusive por exposições crônicas, é mensurável e pode ser trabalhada junto aos órgãos ambientais visando sua utilização como ferramenta para proteção da vegetação nativa. Além disso, Klumpp *et al.* (2006) ressaltam que embora os sintomas induzidos pelo ozônio em plantas bioindicadoras não possam ser diretamente traduzidos em impactos na vegetação nativa ou em culturas agrícolas, a sensibilidade do bioindicador é um indicativo de potencial danos à vegetação sob determinada exposição ao poluente e determinadas condições climáticas.

Dessa forma, é possível admitir que a utilização de 'Paluma' como bioindicador de ozônio na cidade de São Paulo é viável e apresenta significado biológico para a vegetação nativa.



## 6. CONCLUSÃO

As análises realizadas permitem concluir que:

A manifestação e o desenvolvimento de sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio sofrem influência de fatores climáticos tais como a precipitação e o DPV.

Antecedendo a manifestação de sintomas foliares ocorrem alterações na trocas gasosas como redução na assimilação de CO<sub>2</sub> sob radiação saturante, na condutância estomática e na transpiração e no aumento na concentração interna de CO<sub>2</sub>. A redução na A<sub>sat</sub> é consequência de danos na etapa de carboxilação antes que devido à uma redução na condutância.

A atividade antioxidativa da SOD, APX e GR provavelmente não constitui a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelo ozônio em 'Paluma'. Contudo, é possível que outras moléculas e enzimas antioxidantes tenham uma resposta mais ativa nos processos de defesa tais como o ácido ascórbico e os compostos fenólicos, como a antocianina, os quais naturalmente ocorrem em altos níveis endógenos em 'Paluma'.

Com base nas considerações listadas acima, verifica-se que as hipóteses levantadas inicialmente foram confirmadas, à exceção da hipótese de que ocorreriam alterações na atividade das enzimas antioxidativas, apesar da SOD ter apresentado uma menor atividade em algumas exposições.

Não obstante, o presente estudo demonstrou que *Psidium guajava* 'Paluma' responde ao estresse oxidativo induzido por ozônio de maneira qualitativa por meio da manifestação de sintomas foliares visíveis e de alterações nas trocas gasosas, podendo ser efetivamente utilizada no biomonitoramento da poluição por ozônio. Os resultados obtidos aqui em conjunto com os de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' e *Ipomoea nil* 'Scarlett O'Hara', que integram o projeto mais amplo sobre espécies bioindicadoras sensíveis ao ozônio, possibilitarão uma maior contribuição para o estabelecimento de protocolo padronizado para o biomonitoramento da poluição por O<sub>3</sub> em São Paulo.

## RESUMO

Emissões atmosféricas decorrentes principalmente da queima de combustíveis fósseis têm contribuído para um aumento significativo nas concentrações de ozônio troposférico ( $O_3$ ), que passou a atuar como poluente afetando a saúde humana, a vegetação e os materiais. A fitotoxicidade do  $O_3$  advém de seu caráter altamente oxidante. Após ser absorvido pelas folhas, é capaz de interferir na homeostase celular desencadeando um estresse oxidativo que pode promover alterações adversas em processos fisiológicos. Espécies sensíveis, ou seja, aquelas que manifestam sintomas foliares visíveis após exposição ao ozônio, podem ser utilizadas como bioindicadores, permitindo identificar a ocorrência de concentrações fitotóxicas do poluente no ambiente. Contudo, a resposta bioindicadora sofre interferência dos fatores ambientais aos quais as plantas estão expostas e de fatores biológicos, entre eles, a taxa de trocas gasosas e a atividade do sistema antioxidativo. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre as condições meteorológicas e a exposição ao ozônio na manifestação de sintomas foliares visíveis, nas trocas gasosas e na atividade de enzimas antioxidantes em *Psidium guajava* 'Paluma', um potencial bioindicador tropical da poluição por  $O_3$ . Foram realizadas seis exposições no período de abril de 2007 a dezembro de 2008, coincidentes com as estações do ano, em que indivíduos jovens de 'Paluma' permaneceram expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, que apresenta concentrações elevadas de  $O_3$ . As plantas foram analisadas periodicamente e avaliados quanto à manifestação e progressão de sintomas foliares visíveis, às trocas gasosas de  $CO_2$  e  $H_2O$  sob radiação fotossinteticamente ativa saturante e à atividade antioxidativa das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR). Durante o experimento, observou-se que as condições ambientais, em especial a irradiação global, o déficit de pressão de vapor e a precipitação, influenciaram na manifestação de sintomas foliares em 'Paluma', que foi acompanhada por alterações significativas nas trocas gasosas (redução de assimilação de carbono, condutância estomática e transpiração e aumento da concentração interna de  $CO_2$ ). Contrariamente ao esperado, a atividade de APX e GR não foi diretamente relacionada à exposição ao  $O_3$ , ao passo que a enzima SOD apresentou, em algumas exposições, uma menor atividade. A análise multivariada dos dados de clima, concentração de ozônio e variáveis biológicas, realizada por meio de análise de componentes principais, indicou que a exposição ao ozônio e a irradiação apresentaram uma relação inversamente proporcional com as trocas gasosas, ao passo que a atividade da SOD, APX e GR responderam mais aos fatores climáticos do que ao ozônio. A análise evidenciou também que os sintomas foliares visíveis foram associados diretamente com o aumento da exposição

ao ozônio e à irradiação global e inversamente com a assimilação líquida de carbono. Com base nos resultados, conclui-se que 'Paluma' apresenta grande potencial como espécie bioindicadora tropical sensível ao ozônio, mostrando uma resposta qualitativa. Sugere-se a realização de estudos com diferentes regimes de interceptação de luz, a fim de reduzir a importância da irradiação global na indução do estresse oxidativo em 'Paluma', visando à obtenção de uma resposta bioindicadora mais fortemente relacionado ao ozônio.

## ABSTRACT

Air emissions mainly from the fossil fuel burning have contributed to a significant increase in ozone tropospheric concentrations ( $O_3$ ), which became to act as pollutant affecting human health, vegetation and materials. Ozone phytotoxicity comes from its highly oxidative capacity. After being absorbed by leaves, it can interfere with cell homeostasis triggering an oxidative stress that may promote adverse changes in physiological processes. Sensitive species, i.e., species that show visible leaf symptoms after ozone exposure, can be used as bioindicators, allowing to identify the occurrence of phytotoxic concentration of the pollutant in the environment. However, the bioindicator response is influenced by environmental factors which plants are exposed to and by biological factors, among them gas exchange rates and antioxidative system activity. Therefore, the aim of this study was to assess the relationship between environmental conditions and ozone exposure in the manifestation of visible foliar symptoms, gas exchange and antioxidant enzymatic activity in *Psidium guajava* 'Paluma', a tropical bioindicator of  $O_3$ . It was done six expositions from April 2007 to December 2008, coinciding with the seasons, in which saplings of 'Paluma' were exposed in the Fontes do Ipiranga State Park, which has high ozone concentrations. Plants were sampled periodically and examined in relation to manifestation and progression of visible foliar symptoms, gas exchange of  $CO_2$  and  $H_2O$  under saturating photosynthetically active radiation and antioxidative activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR). During the experiment, it was observed that environmental conditions, especially global radiation, vapour pressure deficit and precipitation, influences the expression of foliar symptoms in 'Paluma', which was accompanied by significant changes in gas exchange (reduced of carbon assimilation, stomatal conductance and transpiration and increased concentration of  $CO_2$ ). Unlike from what it was expected, APX and GR activity was not directly related to ozone exposure, while SOD has shown, in some exposure, a reduced in his activity. The multivariate analysis of climate, ozone and biological data, performed by principal components analysis, indicated that ozone exposure and irradiation have shown an inverse relationship with the gas exchange, whereas SOD, APX e GR activity responded more to the climate factors than ozone exposure. The analysis also showed that the visible foliar symptoms were directly associated with increased exposure to ozone and global irradiation and inversely with the net assimilation of carbon. Based on these results, it is concluded that 'Paluma' has a great potential as a tropical bioindicator species sensitive to ozone, showing a qualitative response. It is suggested perform studies with different light

interception regimes, in order to reduce the influence of global irradiation in the oxidative stress in 'Paluma', to obtain a bioindicator response more associated with ozone.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADC.** 2006. LCPro+ portable system instruction manual. ADC BioScientific Limited, Hertfordshire, pp.1-101.
- Andersen, C.P.** 2003. Source-sink balance and carbon allocation below ground in plants exposed to ozone. *New Phytologist* 157: 213-228.
- Apel, K. & Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Arndt, U. & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *In:* H. Ellenberg, U. Arndt, B. Bretthauer, B. Ruthsatz, L. Steubing (eds.). *Biological monitoring: signals from the environment*. Vieweg & Sons, Eschborn, pp. 199-260.
- Asada, K.** 1984. Assay of ascorbate-specific peroxidase. *Methods Enzymological*, 105:427-429.
- Asada, K.** 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235-241.
- Ashmore, M.R.** 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment* 28: 949-964.
- Bagard, M., Thiec, D.L., Delacote, E., Hasenfratz-Sauder, M-P., Banvoy, J., Gérard J., Dizengremel, P. & Jolivet, Y.** 2008. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiologia Plantarum* 134: 559-574.
- Balls, G.R., Palmer-Brown, D. & Sanders, G.E.** 1996. Investigating microclimatic influences on ozone injury in clover (*Trifolium subterraneum*) using artificial neural networks. *New Phytologist* 132: 271-280.
- Beauchamp, C.O. & Fridovich, I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Benes, S.E., Murphy, T.M., Anderson, P.D. & Houppis, J.L.J.** 1995. Relationship of antioxidant enzymes to ozone tolerance in branches of mature ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) trees exposed to long-term, low concentration, ozone fumigation and acid precipitation. *Physiologia Plantarum* 94: 124-134.

- Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt.** 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
- Bortier, K., Ceulemans, R. & De Temmerman, L.** 2000. Effects of ozone exposure on growth and photosynthesis of beech seedlings (*Fagus sylvatica*). *New Phytologist* 146: 271-280.
- Bowler, C., Van Montagu, M. & Inzé, D.** 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.
- Bray, E.A., Bailey-Senes, J. & Weretilny, K.E.** 2000. Responses in abiotic stress. *In*: B.B. Buchanan, W. Gruissen & R.L. Jones (eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologist, New York, pp. 1158-1203.
- Brendley, B.W & Pell, E.** 1998. Ozone-induced changes in biosynthesis of Rubisco and associated compensation to stress in foliage of hybrid poplar. *Tree Physiology* 18: 81-90.
- Bulbovas, P., Souza, S.R., Moraes, R.M., Luizão, F. & Artaxo, P.** 2007. Plântulas de soja 'Tracajá' expostas ao ozônio sob condições controladas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 641-646.
- Burger, J. & Gochfeld, M.** 2004. Bioindicators for assessing human and ecological health. *In*: G.B. Wiersma. (ed.). *Environmental Monitoring*. CRC Press, Boca Raton. pp. 541-566.
- Calatayud, A. & Barreno, E.** 2001. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. *Environmental Pollution* 115: 283-289.
- Calatayud, A., Iglesias, D.J., Talón, M. & Barreno, E.** 2003. Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 839-845.
- Calatayud, V., Cerveró, J. & Sanz, J.M.** 2007. Foliar, Physiological and growth responses of four maple species exposed to ozone. *Water, Air and Soil Pollution* 185: 293-254.
- Carignan, V. & Villard, M-A.** 2004. Biological indicators in environmental monitoring programs: can we increase their effectiveness. *In*: G.B. Wiersma. (ed.). *Environmental Monitoring*. CRC Press, Boca Raton, pp. 541-566.
- Castagna, A., Nali, C., Ciompi, S., Lorenzini, G., Soldatni, G.F. & Ranieri, A.** 2001. Ozone exposure affects photosynthesis of pumpkin (*Cucurbita pepo*) plants. *New Phytologist* 152: 223-229.

- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2009. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2008. Governo de Estado de São Paulo, SP. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.asp>.
- Chappelka, A., Renfro, J., Somers, G. & Nash, B.** 1997. Evaluation of ozone injury on foliage of blackcherry (*Prunus serotina*) and tall milkweed (*Asclepias exalata*) in Great Smoky Mountains National Park. *Environmental Pollution* 95: 3-18.
- Chappelka, A.H., Neufeld, H.S., Davison, A.W., Somers, G.L., Renfre, J.R.** 2003. Ozone injury on cutleaf coneflower (*Rudbeckia laciniata*) and crown-beard (*Verbesina occidentalis*) in Great Smoky Mountais National Park. *Environmental Pollution* 125: 53-59.
- Crutzen, P.J. & Ramanathan, V.** 2002. The ascent of atmospheric sciences. *In*: I, Amato (ed.). *Science, Pathways of Discovery*. Jonh Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 175-188.
- Dann, M.S. & Pell, E.J.** 1989. Decline of activity and quantity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and net photosynthesis in ozone-treated potato foliage. *Plant Physiology* 91: 427-432.
- Davison, A.W., Neufeld, H.S., Chapelka, A.H., Wolff, K. & Finkelstein, P.L.** 2003. Interpreting spatial variation in ozone symptoms shown by cutleaf cone flower, *Rudbeckia laciniata* L. *Environmental Pollution* 125: 61-70.
- De Temmerman, L., Nigel, J., Bell, B., Garrec, J.P., Klumpp, A., Krause, G.H.M. & Tonneijck, A.E.G.** 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. *In*: A. Klumpp, W. Ansel & G. Klumpp, G. (eds.). *Urban air pollution, bioindication and environmental awareness*. Curvillier Verlag, Göttingen, pp. 337-373.
- Decreto Estadual 8.468/1976**, de 08/09/1976, aprova regulamento que disciplina a execução da Lei estadual 997, de 31/05/1976, que dispõe sobre controle da poluição do meio ambiente. Disponível em [www.alesp.sp.gov.br](http://www.alesp.sp.gov.br).
- Demmig-Adams, B. & Adams III, W.W.** 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599-626.
- Dias, A.P.S., Rinaldi, M.C.S. & Moraes, R.M.** 2007. Alterações bioquímicas associadas a injúrias foliares visíveis em plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' mantidas em ambiente contaminado por ozônio. *Hoehnea* 34: 231-238.



- Dittmar, C., Pfaffelmoser, K., Rotzer, T. & Elling, W.** 2005. Quantifying ozone uptake and its effects on the stand level of common beech (*Fagus sylvatica* L.) in southern Germany. *Environmental Pollution* 134: 1-4.
- Dizengremel, P.** 2001. Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant, Physiology and Biochemistry* 39: 729-742.
- Dizengremel, P., Le Thies, D., Bagard, M. & Jolivet, Y.** 2008. Ozone risk assessment for plants: central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution* 156: 11-15.
- Domingos M., Bourotte C., Klumpp A., Klumpp G. & Forti M.C.** 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. *In: D.C. Bicudo, M.C. Forti, C.E.M. Bicudo (Eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo. Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 221-249.*
- Eckardt, N.A. & Pell, E.** 1994. O<sub>3</sub>-induced degradation of Rubisco protein and loss of Rubisco mRNA in relation to leaf age in *Solanum tuberosum* L. *New Phytologist* 127: 741-748.
- El-Khatib, A.A.** 2003. The response of some common Egyptian plants to ozone and their use as biomonitors. *Environmental Pollution* 124: 419-428.
- Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Cambridge, H.M., Simpson, D. & Tuovinen, J.-P.** 2000. Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environmental Pollution* 109: 403-413.
- EPA – Environmental Protection Agency.** 2006. Air Quality Criteria for Ozone and Related Photochemical Oxidants (2006 Final). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-05/004aF-cF.
- Esposito, M.P., Ferreira, M.L., Sant'Anna, S.M.R., Domingos, M. & Souza, S.R.** 2009. Relationship between leaf antioxidant and ozone injury in *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' under environmental conditions in São Paulo, SE – Brazil. *Atmospheric Environment* 43: 619-623.
- Farage, P.K. & Long, S.P.** 1999. The effects of ozone fumigation during leaf development on photosynthesis of wheat and pea: an *in vivo* analysis. *Photosynthesis Research* 59: 1-7.

- Farage, P.K., Long, S.P., Lechner, E.G. & Baker, N.R.** 1991. The sequence of change within the photosynthetic apparatus of wheat following short-term exposure to ozone. *Plant Physiology* 95: 529-535.
- Farrel, A.E.** 2005. Learning to see the invisible: discovery and measurement of ozone. *Environmental Monitoring and Assessment*. 106: 59-80.
- Ferreti, M., Fagnano, M., Amoriello, T., Badiani, M., Ballarin-Denti, A., Buffoni, A., Castagna, A., Cieslik, S., Costantini, A., De Marco, A., Gerosa, G., Lorenzini, G., Manes, F., Merola, G., Nali, C., Paoletti, E., Petriccione, B., Racalbuto, S., Rana, G., Ranieri, A., Tagliaferri, A., Vialetto, G. & Vitale, M.** 2007. Measuring modeling and testing ozone exposure, flux and effects on vegetation in southern European conditions – What does not work? A Review from Italy. *Environmental Pollution* 146: 648-658.
- Fiscus, E.L., Booker, F.L. & Burkey, K.O.** 2005. Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell and Environment* 28: 997-1011.
- Forster, P., Ramanaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D.W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M. & Van Dorland, R.** 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. *In: S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor & H.L. Miller (eds.). Climate Change 2007. The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 129-234.*
- Foyer, C.H. & Noctor, G.** 2005. Oxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 28: 1056-1071.
- Freedman, B.** 1995. *Environmental ecology: the ecological effects of pollution, disturbance and other stresses.* Academic Press, San Diego.
- Fuhrer, J., Skärby, L. & Ashmore, M.R.** 1997. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution* 97: 91-106.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Salatino, A. & Sanz, M.J.** 2007. *Psidium guajava* 'Paluma' (the guava plant) as new bio-indicator of ozone in the tropics. *Environmental Pollution* 147: 361-365.
- Gerosa, G., Marzuoli, R., Desotgiu, R., Bussotti, F. & Ballarin-Denti.** 2008. Visible leaf injury in young trees of *Fagus sylvatica* L. and *Quercus robur* L. in relation to ozone

- uptake and ozone exposure. An open top chambers experiment in south alpine environmental conditions. *Environmental Pollution* 152: 274-284.
- Gielen, B., Löw, M., Deckmyn, G., Metzger, U., Franck, F., Heerdt, C., Maytssek, R., Valcke, R. & Ceulemans, R.** 2007. Chronic ozone exposure affects leaf senescence of adult beech trees: a chlorophyll fluorescence approach. *Journal of Experimental Botany* 58: 785-795.
- GoogleEarth.** 2009. <http://earth.google.com/intl/pt/>. (acesso em 20.10.2009).
- Gould, K.S., Mckelvie, J. & Markham, K.R.** 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell and Environment* 25: 1261-1269.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P. & Azevedo, R.A.** 2005. Making the life of heavy metal-stressed plant a little easier. *Functional Plant Biology* 32: 481-494.
- Gravano, E., Bussotti, F., Stasser, R.J., Schaub, M., Novak, K., Skelly, J. & Tani, C.** 2004. Ozone symptoms in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. *Physiologia Plantarum* 121: 620-633.
- Grulke, N.E., Neufeld, H.S., Davison, A.W., Roberts, M. & Chapelka, A.H.** 2007. Stomatal behavior of ozone-sensitive and -insensitive coneflowers (*Rudbeckia laciniata* var. *digitata*) in Great Smoky Mountains Park. *New Phytologist* 173: 100-109.
- Guidi, L., Cagno, R. & Soldatini, G.F.** 2000. Screening of bean cultivars for their response to ozone as evaluated by visible injury and leaf chlorophylls fluorescence. *Environmental Pollution* 107: 349-355.
- Guidi, L., Nali, C., Lorenzini, G., Filippi, F. & Soldatini, G.F.** 2001. Effect of chronic ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity. *Environmental Pollution* 113: 245-254.
- Guidi, L., Degle'Innocenti, E. & Soldatini, G.F.** 2002. Assimilation of CO<sub>2</sub>, enzyme activation and photosynthetic electron transport in beans leaves, as affected by high light and ozone. *New Phytologist* 156: 377-388.
- Gupta, A.S., Alscher, R.G. & McCune, D.** 1991. Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiology* 96: 650-655.
- Gutiérrez, R.M.P., Mitchell, S. & Solis, R.V.** 2008. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethno-Pharmacology* 117: 1-27.
- Halliwell, B.** 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.

- Halliwell, B. & Gutteridge & J.M.C.** 2007. Free radicals in biology and medicine. 4ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D.** 2009. Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 4: 9.
- Heath, R.L., Lefohn, A.S. & Musselman, R.C.** 2009. Temporal processes that contribute to nonlinearity in vegetation responses to ozone exposure and dose. *Atmospheric Environment* 43: 2919-2928.
- Heggestad, H.E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264-291.
- Hughes, N.M., Neufeld, H.S. & Burkey, K.O.** 2005. Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*. *New Phytologist* 168: 575-587.
- IAG/USP – Instituto de Astronomia e Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo.** 2009. Boletim Climatológico Anual da Estação Meteorológica do IAG/USP -2008. Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em <http://www.estacao.iag.usp.br/boletim.php>.
- ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos.** 1988. Goiaba, cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2 ed. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas.
- Jacob, D.J.** 1999. Introduction to Atmospheric Chemistry. 1ed. Princeton University Press, New Jersey.
- Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inês, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S. & Panneerselvam, R.** 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiology Plant* 31: 427-436.
- Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. & Karjalainen, R.** 1994. Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* 17: 783-794.
- Karlsson, P.E., Braun, S., Broadmeadow, M., Elvira, S., Emberson, L., Gimeno, B.S., Le Thiec, D., Novak, K., Oksanen, E., Schaub, M., Uddling, J. & Wilkinson, M.** 2007. Risk assessments for forest trees: the performance of the ozone flux versus the AOT concepts. *Environmental Pollution* 146: 608-616.

- Keutgen, A.J. & Pawelzik, E.** 2008. Apoplastic antioxidative system responses to ozone stress in strawberry leaves. *Journal of Plant Physiology* 165: 868-875.
- Kitao, M., Löw, M., Heerdt, C., Grams, T.E.E., Häberle, K-H. & Matyssek, R.** 2009. Effects of chronic elevated ozone exposure on gas exchange responses of adult beech trees (*Fagus sylvatica*) as related to the within-canopy light gradient. *Environmental Pollution* 157: 537-544.
- Klumpp, A.** 2001. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. *In: Maia, N.B., Martos, H.L. & Barreia, W (eds). Indicadores ambientais: conceitos e aplicações. EDUC-SP, São Paulo, pp. 77- 94.*
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas, A., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P., & Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone induced plant injury and its relationship with descriptor of ozone pollution. *Atmospheric Environment* 40: 7437-7448.
- Koukol, J. & Dugger, W.M.** 1967. Anthocyanin formation as a response to ozone and smog treatment in *Rumex crispus* L. *Plant Physiology* 42: 1023-1024.
- Kouterick, K.B., Skelly, J.M., Fredericksen, T.S., Steiner, K.C., Kolb, T.E. & Ferdinand, J.** 2000. Foliar injury, leaf gas exchange and biomass responses of *Prunus serotini* Ehrh. to ozone exposure. *Environmental Pollution* 107: 117-126.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.
- Krupa, S.V., Manning, W.J. & Nosal, M.** 1993. Use of tobacco cultivars as biological indicators of ambient ozone pollution: an analysis of exposure-response relationships. *Environmental Pollution* 81: 137-146.
- 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 Diseases*. 85: 4-12.
- Laisk, A, Kull, O., Moldau, H.** 1989. Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology* 90: 1163-1167.
- Larcher, W.** 2000. O balanço de carbono das plantas. *In: Larcher, W (ed). Ecofisiologia Vegetal. RiMa Artes e Textos, São Carlos, pp. 69-226.*

- Leitão, L., Dizengremel, P. & Biolley, J.P.** 2008. Foliar CO<sub>2</sub> in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to elevated ozone: distinct changes in Rubisco and PEPc activities in relation to pigment content. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69: 531-540.
- Levine, A.** 1999. Oxidative stress as a regulator of environmental responses in plants. In: Lerner, H.R. (ed). *Plant Responses to Environmental Stress*. Dekker Inc., New York, pp. 247-264.
- Li, M-H.** 2003. Peroxidase and superoxide dismutase activities in fig leaves in response to ambient air pollution in a subtropical city. *Environmental Contamination and Toxicology* 45: 168-176.
- Long, S.P. & Naidu, S.L.** 2002. Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone. In: J.N.B. Bell & M. Treshow (eds.). *Air Pollution and Plant Life*. 2ed. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, pp. 69-118.
- Lorenz, M., Fischer, R., Becher, G., Granke, O., Seidling, W., Ferretti, M., Schaub, M., Calatayud, V., Bacaro, G., Gerosa, G., Rocchini, D. & Sanz, M.** 2008. Forest condition in Europe 2008. Technical report of ICP forests. International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests (ICP Forests). Disponível em <http://www.icp-forests.org/RepTech.htm>.
- Manning, W.J.** 2003. Detecting plant effects is necessary to give biological significance to ambient ozone monitoring data and predictive ozone standards. *Environmental Pollution*, 126: 375-379.
- Mansfield, T.A.** 2003. Nitrogen oxides: old problems and new challenges. In: Bell, J.N.B. & M. Treshow (eds.). *Air Pollution and Plant Life*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, pp. 119-134.
- Massambani, O. & Andrade, F.** 1994. Seasonal behavior of tropospheric ozone in the São Paulo (Brazil) metropolitan area. *Atmospheric Environment* 28: 3165-3169.
- Massman W.J.** 2004. Toward an ozone standard to protect vegetation based on effective dose: a review of deposition resistances and a possible metric. *Atmospheric Environment* 38: 2323-2337.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Molina, M.J. & Molina, L.T.** 2004. Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association* 54: 644-680.

- Moraes, R.M., Furlan, C.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Meirelles, S.T., Delitti, W.B.C., Salatino, A. & Sanz, M.J.** 2004. Photosynthetic responses of tropical trees to short-term exposure to ozone. *Photosynthetica* 42: 291-293.
- Moraes, R.M., Bulbovas, P., Furlan, C.M., Domingos, M., Meirelles, S.T., Delitti, W.B.C. & Sanz, M.J.** 2006. Physiological responses of saplings of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, under ozone fumigation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 306-312.
- Mudd, J.B.** 1996. Biochemical basis for the toxicity of ozone. *In*: M. Yunus & M. Iqbal (eds.). *Plant Response to Air Pollution*. John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 267-283.
- Munné-Bosh, S.** 2005. The role of  $\alpha$ -tocopherol in plants stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 162: 743-748.
- Muramoto, C.A., Lopes, C.F.F. & Lacava, C.I.V.** 2003. Study of tropospheric ozone in São Paulo Metropolitan Region. [www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.asp)
- Musselman, R.C. & Massaman, W.J.** 1999. Ozone flux to vegetation and its relationship to plant response and ambient air quality standards. *Atmospheric Environment* 33: 65-73.
- Musselman, R.C., Lefohn, A.S., Massman, W.J. & Heath, R.L.** 2006. A critical review and analysis of the use of exposure-and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmospheric Environment* 40: 1869-1888.
- Nali, C., Paoletti, E., Marabottini, R., Della Rocca, G., Lorenzini, G., Paolacci, A.R., Ciaffi, M. & Badiani, M.** 2004. Ecophysiological and biochemical strategies of response to ozone in Mediterranean evergreen broadleaf species. *Atmospheric Environment* 38: 2247-2257.
- Neil, S.O. & Gould, K.S.** 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* 30: 865-873.
- Niemi, G.J. & MacDonald, M.E.** 2004. Application of ecological indicators. *Annual Review Ecology Evolution and Systematics* 35: 89-111.
- Noctor, G. & Foyer, C.H.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Noormets, A., Sôber, A., Pell, E.J., Dickson, R.E., Podila, G.K., Sôber, J., Isebrands, J.G. & Karnosky, D.F.** 2001. Stomatal and non-stomatal limitation to photosynthesis in two trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones exposed to elevated CO<sub>2</sub> and/or O<sub>3</sub>. *Plant, Cell and Environment* 24: 327-336.

- Novak, K., Skelly, J.M., Schaub, M., Kräuchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P.** 2003. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environmental Pollution* 125: 41-52.
- Novak, K., Schaub, M., Fuhrer, J., Skelly, J.M., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P., Kräuchi, N.** 2005. Seasonal trends in reduced leaf gas exchange and ozone-induced foliar injury in three ozone sensitive woody plant species. *Environmental Pollution* 136: 33-45.
- Orendovici, T., Skelly, J.M., Ferdinand, J.A., Savage, J.E., Sanz, M.-J. & Smith, G.C.** 2003. Response of native plants of northeastern United States and southern to ozone exposures; determining exposure/response relationship. *Environmental Pollution* 125: 31-40.
- Orendovici-Best, T., Skelly, J.M., Davis, D.D., Ferdinand, J.A., Savage, J.E. & Stevenson, R.E.** 2008. Ozone uptake (flux) as it relates to ozone-induced foliar symptoms of *Prunus serotina* and *Populus maximowiczii* x *trichocarpa*. *Environmental Pollution* 151: 79-92.
- Osswald, W. F., Kraus, R., Hippeli, S., Benz, B., Volpert, R. & Elstner, E. F.** 1992. Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). *Journal of Plant Physiology*. 139: 742-748.
- Overmyer, K., Wrzaczek, M. & Kangasjärvi, J.** 2009. Reactive oxygen species in ozone toxicity. *In*: L.A. Río & A. Pugno (eds.). *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*. Springer-Verlag, Berlin, pp.191-208.
- Pääkkönen, E., Metsärinne, S., Holopainen, T. & Kärenlampi, L.** 1995. The ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) in relation to the developmental stage of leaves. *New Phytologist* 132: 145-154.
- Paoletti, E. & Grulke, N.E.** 2005. Does living in elevated CO<sub>2</sub> ameliorate tree response to ozone? A review on stomatal responses. *Environmental Pollution* 137: 483-493.
- Pasqualini, S., Batini, P., Ederli, L., Porceddu, A., Piccioni, C., Marchis, F. & Antonielli, M.** 2001. Effects of short-term ozone fumigation on tobacco plants: response of the scavenging system and expression of the glutathione reductase. *Plant, Cell and Environment* 24: 245-252.
- Pell, E.J., Eckardt, N.A. & Glick, R.E.** 1994. Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosynthetic Research* 39: 453-462.



- Pell, E.J., Schlagnhauser, D. & Arteca, R.** 1997. Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100: 264-273.
- Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B.S. & Filella, I.** 1999. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (N.E. Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* 56: 221-224.
- Piikki, K., De Temmerman, L., Högy, P. & Pleijel, H.** 2008. The open-top chamber impact on vapour pressure deficit and its consequences for stomatal ozone uptake. *Atmospheric Environment* 42: 6513-6522.
- Pina, J.M. & Moraes, R.M.** 2007. Ozone-induced foliar injury in saplings of *Psidium guajava* 'Paluma' in São Paulo, Brazil. *Chemosphere* 66: 1310-1314.
- Pina, J.M. & Moraes, R.M.** 2010. Gas exchange, antioxidants and foliar injuries in saplings of a tropical woody species exposed to ozone. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 685-691.
- Plazec, A., Rapacz, M. & Skoczowski, A.** 2000. Effects of ozone fumigation on photosynthesis and membrane permeability in leaves of spring barley, meadow fescue, and winter rape. *Photosynthetica* 38: 409-413.
- Polle, A., Krings, B. & Rennenberg, H.** 1989. Superoxide dismutase activity in needles of norwegian spruce trees (*Picea abies* L.). *Plant Physiology* 90: 1310-1315.
- Powles, S.B.** 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 15-44.
- Quian, H. & Nihorimbere, V.** 2004. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Zhejiang University* 5: 676-683.
- Ramachandra Reddy, A., Chaitanya, K. V., Jutur, P. P. & Sumithra, K.** 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*. 52: 33-42.
- Reich, P.B.** 1987. Quantifying plant response to ozone: a unifying theory. *Tree Physiology* 3: 63-91.
- 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. & Furlan, C.M.** 2009. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. *Chemosphere* 76:1445-1450.

- Saleem, A., Loponen, J., Pihlaja, K. & Oksanen, E.** 2001. Effects of long term open-field ozone exposure on leaf phenolics of European silver birch (*Betula pendula* Roth.). *Journal of Chemical Ecology* 27: 1049-1062.
- Sane, P.V., Yunus, M. & Tripathi, R.D.** 1996. Impact of ozone on carbon metabolism in plants. *In: M. Yunus & M. Iqbal (eds.). Plant Response to Air Pollution.* John Wiley and Sons Ltd., New York, pp.295-318.
- Sant'Anna, S.M.R.** 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Sanz, M.J. Sanchez, G., Calatayud, V., Gallego, M.T. & Cervero, J.** 2002. La contaminación atmosférica de los bosques: Guía para la identificación de los daños visibles causados por ozono. 1 ed. Ministerio del Medio Ambiente, Madrid.
- Schaub, M., Jacob, P., Bernhard, L., Innes, J.L., Skelly, S.M., Kräuchi, N.** 2002. Ozone injury database. <http://www.ozone.wsl.ch>. (acesso em 02.02.2010).
- Schaub, M., Skelly, J.M., Steiner, K.C., Davis, D.D., Pennypacker, S.P., Zhang, J., Ferdinand, J.A., Savage, J.E. & Stevenson, R.E.** 2003. Physiological and foliar injury responses of *Prunus serotina*, *Fraxinus americana*, and *Acer rubrum* seedlings to varying soil moisture and ozone. *Environmental Pollution* 124: 307-320.
- Sheng, W.S., Chevone, B.I. & Hess, J.L.** 1993. Photosynthetic inhibition and superoxide dismutase activity in soybean cultivars exposed to short-term ozone fumigations. *Environmental Pollution* 80: 45-52.
- Sitch, S., Cox, P.M., Collins, W.J. & Huntingford, C.** 2007. Indirect radiative forcing of climate change through ozone effects on the land-carbon sink. *Nature* 448: 791-794.
- Smith, G., Coulston, J., Jepsen, E. & Prichard, T.** 2003. A national ozone biomonitoring program – results from field surveys of ozone sensitive plants in northeastern forests (1994-2000). *Environmental Monitoring and Assessment* 87: 271-291.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2009. *Fisiologia Vegetal*. 4 ed. Artmed Editora S.A, São Paulo.
- Tausz, M., Grulke, N.E. & Wieser, G.** 2007. Defense and avoidance of ozone under global change. *Environmental Pollution* 147: 525-531.
- Then, Ch., Herbinger, K., Luis, V.C., Heerdt, C., Matyssek, R. & Wieser, G.** 2009. Photosynthesis, chloroplast pigments, and antioxidants in *Pinus canariensis* under free-air ozone fumigation. *Environmental Pollution* 157: 392-395.

- Tjoelker, M.G., Volin, J.C., Oleksyn, J. & Reich, P.B.** 1993. Light environment alters response to ozone stress in seedlings of *Acer saccharum* Marsh. and hybrid *Populus* L. in situ net photosynthesis, dark respiration and growth. *New Phytologist* 124: 627-636.
- Torsenthaugen, G., Pell, E. & Assmann, S.M.** 1999. Ozone inhibits guard cell K<sup>+</sup> channels implicated in stomatal opening. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13577-13582.
- UN/ECE - United Nations Economic Commission for Europe.** 1988. Critical levels for forest, crops and material Workshop in Bad Harzburg, Germany (final report). Disponível em: <http://www.unece.org/env/lrtap/workinggroups/wge/documents.htm>.
- UN/ECE - United Nations Economic Commission for Europe Convention on Long-range Transboundary Air Pollution.** 2004. Mapping manual 2004 - Manual on methodologies and criteria for modeling and mapping critical loads e levels and air pollution effects, risks and trends. Disponível em: <http://icpmapping.org>.
- Vingarzan, R.** 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment*. 38: 3431-3442.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure.** 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1, Beuth, Berlin.
- Veljovic-Jovanovic, S.** 1998. Active oxygen species and photosynthesis: Mehler and ascorbate peroxidase reactions. *Iugoslav Physiol. Pharmacol. Acta* 34: 503-522.
- Volin, J.C., Tjoelker, M.G., Oleksyn, J. & Reich, P.B.** 1993. Light environment alters response to ozone stress in seedlings of *Acer saccharum* Marsh. and hybrid *Populus* L. II. Diagnostic gas exchange and leaf chemistry. *New Phytologist* 124: 637-646.
- Vranová, E., Inzé, D. & Breusegem, F.V.** 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 1227-1236.
- Wang, H., Cao, G. & Prior, R.L.** 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45: 304-309.
- Wei, C., Skelly, J.M., Pennypacker, S.P., Ferdinand, J.A., Savage, J.E., Stevenson, R.E. & Davis, D.D.** 2004. Influence of light fleck and low light on foliar injury and physiological responses of two hybrid poplar clones to ozone. *Environmental Pollution* 130: 215-227.

- Wellburn, A.R.** 1993. Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers ? *New Phytologist* 115: 395-429.
- Witting, V.E., Ainsworth, E.A. & Long, S.P.** 2007. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant, Cell and Environment* 30: 1150-1162.
- WHO – World Health Organization.** 2000. Air Quality Guidelines for Europe. 2.ed. WHO Regional Publications European Series. Disponível em <http://www.euro.who.int/document/e71922.pdf>
- Woo, S.Y., Lee, D.K. & Lee, Y.K.** 2007. Net photosynthetic rate, ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities of *Erythrina orientalis* in polluted and non-polluted areas. *Photosynthetica* 45: 293-295.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. & Ikehara, N.** 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifications mechanism of plant cell against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiology* 115: 1405-1412.
- Youn, H., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C. & Kang, S.O.** 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces spp.* *Biochemical Journal* 318: 889-896.

# ANEXO I

Fórmula utilizada para cálculo do Déficit de Pressão de Vapor (DPV) (em kPa)

DPV = pressão de saturação do vapor d'água ( $e_s$ ) – pressão parcial do vapor d'água ( $e_a$ )

$$e_s = 0,6108 \exp (17,27 \text{ Temp}) / (237,3 + \text{Temp})$$

$$e_a = (\text{umidade} \times e_s) / 100$$

## ANEXO II

Fórmula utilizada para transformação dos dados de NO<sub>2</sub>, NO e O<sub>3</sub> (ppb em µg/m<sup>3</sup>)

$$\text{ppb} = \frac{(\mu\text{g}/\text{m}^3 \times 22,4136) (T \text{ }^\circ\text{C} + 273,15) \text{ pressão ]}}{(\text{massa molecular} \times 273,15 \times \text{pressão})}$$

(Observação: 1 ppm = 1.000 ppb)

## ANEXO III

**Tabela 16.** Incidência (%), severidade (%) e índice de injúria foliar (IIF, %) verificados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, durante os meses de abril a junho de 2007 (Outono 2007), outubro a dezembro de 2007 (Primavera 2007), janeiro a abril de 2008 (Verão 2008), abril a junho de 2008 (Outono 2008), julho a setembro de 2008 (Inverno 2008) e outubro a dezembro de 2008 (Primavera 2008)

<b>Outono 2007</b>										
dias de exposição	9	23	29	37	42	48	58	68	78	
Incidência	33	66	86	93	93	93	93	93	93	
Severidade	10,5	8,5	11,7	13,0	14,2	15,7	18,5	16,3	19,1	
IIF	2,1	2,9	4	5,2	5,2	5,9	8,9	8,1	7,5	
<b>Primavera 2007</b>										
dias de exposição	33	38	48	54	61	68	74			
Incidência	2,3	11	36	83	83	83	100			
Severidade	14	10,1	11,5	17	15,7	16,1	20,2			
IIF	4,2	2,2	3,1	4,6	5,4	6,5	8,7			
<b>Verão 2008</b>										
dias de exposição	19	25	33	40	47	54	61	67	75	82
Incidência	1,6	7	12,5	16	27	46	66	66,7	100	100
Severidade	11,1	8,1	8,1	14,7	12,4	10,2	12,3	8,3	8,6	11,2
IIF	2,2	2,4	2,2	4,0	3,5	3,0	3,9	2,6	3,2	4,0
<b>Outono 2008</b>										
dias de exposição	40	68	75	82						
Incidência	2,3	16	16,6	16,6						
Severidade	5,8	5,1	7,8	9,5						
IIF	2,3	1,0	2,6	2,8						
<b>Inverno 2008</b>										
dias de exposição	33	41	47	54	61	68	75			
Incidência	13,9	13,3	20,0	12,5	16,7	50	100			
Severidade	5,3	6,6	8,5	8,3	9,4	13,0	13			
IIF	1,3	1,6	2,4	3	3,44	4,3	5,0			
<b>Primavera 2008</b>										
Dias de exposição	26	33	38	47	54	61				
Incidência	2,8	13,3	8,3	22,2	16,7	0,0				
Severidade	12,5	12,5	9,3	6,9	10,3	0,0				
IIF	5,0	5,0	3,3	1,7	3,4	0,0				

**Tabela 17.** Valores médios da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{\text{sat}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), eficiência do uso da água (EUA, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ]), eficiência intrínseca do uso da água (EUAI, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ]) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após 2, 10, 23, 29, 37, 49, 59 71 e 78 dias de exposição no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de abril a junho de 2007 (Outono 2007). (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Outono 2007 - Folhas jovens</b>									
dias	2	10	23	29	37	49	59	71	78
$A_{\text{sat}}$	10,89 $\pm$ 0,66	10,2 $\pm$ 0,73	9,56 $\pm$ 0,71	8,75 $\pm$ 0,43	9,49 $\pm$ 0,69	9,03 $\pm$ 0,63	7,89 $\pm$ 0,132	9,84 $\pm$ 1,0	8,9 $\pm$ 0,35
$g_s$	0,68 $\pm$ 0,062	0,41 $\pm$ 0,029	0,37 $\pm$ 0,076	0,35 $\pm$ 0,032	0,44 $\pm$ 0,109	0,33 $\pm$ 0,051	0,15 $\pm$ 0,013	0,27 $\pm$ 0,056	0,35 $\pm$ 0,037
$E$	2,83 $\pm$ 0,066	2,07 $\pm$ 0,098	1,64 $\pm$ 0,12	1,21 0,116	2,21 0,175	2,43 0,202	1,84 0,080	2,11 0,284	2,50 0,133
$C_i$	303 $\pm$ 3,73	292 $\pm$ 2,56	328 $\pm$ 4,05	312 $\pm$ 2,28	304 $\pm$ 4,82	292 $\pm$ 5,17	288 $\pm$ 5,21	315 $\pm$ 8,38	297 $\pm$ 5,93
EUA	3,84 $\pm$ 0,187	4,89 $\pm$ 0,182	5,82 $\pm$ 0,163	7,41 $\pm$ 0,469	4,32 $\pm$ 0,103	3,77 $\pm$ 0,267	4,31 $\pm$ 0,225	4,75 $\pm$ 0,225	3,59 $\pm$ 0,233
EUAI	16,34 $\pm$ 1,12	24,64 $\pm$ 0,88	27,69 $\pm$ 2,89	25,23 $\pm$ 1,58	24,04 $\pm$ 3,91	29,40 $\pm$ 3,26	53,06 $\pm$ 4,11	31,82 $\pm$ 5,94	26,67 $\pm$ 2,73

<b>Outono 2007 - Folhas maduras</b>									
dias	2	10	23	29	37	49	59	71	78
$A_{\text{sat}}$	7,36 $\pm$ 0,73	7,39 $\pm$ 0,345	5,19 $\pm$ 0,55	5,66 $\pm$ 0,35	5,13 $\pm$ 0,44	4,99 $\pm$ 0,13	3,77 $\pm$ 0,40	4,38 $\pm$ 0,39	3,88 $\pm$ 0,53
$g_s$	0,45 $\pm$ 0,060	0,28 $\pm$ 0,022	0,16 $\pm$ 0,020	0,20 $\pm$ 0,011	0,35 $\pm$ 0,046	0,32 $\pm$ 0,053	0,16 $\pm$ 0,031	0,25 $\pm$ 0,036	0,28 $\pm$ 0,022
$E$	2,47 $\pm$ 0,172	2,18 $\pm$ 0,119	1,77 $\pm$ 0,097	1,63 $\pm$ 0,092	1,97 $\pm$ 0,108	2,38 $\pm$ 0,203	1,82 $\pm$ 0,204	1,85 $\pm$ 0,133	2,28 $\pm$ 0,089
$C_i$	313 $\pm$ 2,388	293 $\pm$ 2,171	299 $\pm$ 6,751	322 $\pm$ 3,49	325 $\pm$ 3,84	325 $\pm$ 4,497	340 $\pm$ 9,98	354 $\pm$ 8,09	334 $\pm$ 5,64
EUA	2,93 $\pm$ 0,181	3,41 $\pm$ 0,112	2,92 $\pm$ 0,259	3,48 $\pm$ 0,119	2,62 $\pm$ 0,22	2,15 $\pm$ 0,148	2,11 $\pm$ 0,203	2,43 $\pm$ 0,291	1,72 $\pm$ 0,258
EUAI	16,74 $\pm$ 0,94	27,14 $\pm$ 1,59	31,79 $\pm$ 3,53	28,23 $\pm$ 1,57	15,43 $\pm$ 1,94	17,54 $\pm$ 2,53	26,97 $\pm$ 4,82	18,99 $\pm$ 3,68	13,75 $\pm$ 2,16

**Tabela 18.** Valores meios da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{\text{sat}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), eficiência do uso da água (EUA, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ]), eficiência intrínseca do uso da água (EUAI, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ]) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após 12, 48, 54, 60, 68 e 74 dias de exposição no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de outubro a dezembro de 2007 (Primavera 2007). (n= 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Primavera 2007 - Folhas jovens</b>						
dias	12	48	54	60	68	74
$A_{\text{sat}}$	12,40 $\pm$ 0,76	8,12 $\pm$ 0,46	6,84 $\pm$ 0,27	8,32 $\pm$ 0,82	6,47 $\pm$ 0,42	7,84 $\pm$ 0,36
$g_s$	0,43 $\pm$ 0,026	0,22 $\pm$ 0,011	0,192 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,018	0,26 $\pm$ 0,003	0,23 $\pm$ 0,014
$E$	1,90 $\pm$ 0,046	1,43 $\pm$ 0,039	1,16 $\pm$ 0,051	1,58 $\pm$ 0,043	1,33 $\pm$ 0,014	1,38 $\pm$ 0,052
$C_i$	294 $\pm$ 4,37	286 $\pm$ 4,46	277 $\pm$ 7,22	296 $\pm$ 7,56	294 $\pm$ 3,76	300 $\pm$ 2,08
EUA	6,48 $\pm$ 0,300	5,67 $\pm$ 0,289	5,96 $\pm$ 0,472	5,28 $\pm$ 0,578	4,89 $\pm$ 0,352	5,67 $\pm$ 0,138
EUAI	27,80 $\pm$ 2,16	36,77 $\pm$ 2,25	36,91 $\pm$ 4,20	31,45 $\pm$ 3,64	25,09 $\pm$ 1,53	34,41 $\pm$ 0,97

<b>Primavera 2007 - Folhas maduras</b>						
dias	12	48	54	60	68	74
$A_{\text{sat}}$	11,99 $\pm$ 0,69	6,77 $\pm$ 0,34	6,06 $\pm$ 0,36	7,04 $\pm$ 0,71	5,43 $\pm$ 0,25	4,99 $\pm$ 0,56
$g_s$	0,70 $\pm$ 0,062	0,31 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,017	0,34 $\pm$ 0,031	0,32 $\pm$ 0,028	0,20 $\pm$ 0,03
$E$	2,27 $\pm$ 0,055	1,43 $\pm$ 0,064	1,86 $\pm$ 0,043	1,79 $\pm$ 0,049	1,47 $\pm$ 0,063	1,17 $\pm$ 0,117
$C_i$	308 $\pm$ 1,81	311 $\pm$ 3,14	291 $\pm$ 2,67	319 $\pm$ 4,12	309 $\pm$ 2,51	325 $\pm$ 3,79
EUA	5,44 $\pm$ 0,205	4,80 $\pm$ 0,244	5,09 $\pm$ 0,171	3,91 $\pm$ 0,351	3,80 $\pm$ 0,180	3,95 $\pm$ 0,154
EUAI	18,09 $\pm$ 1,23	23,52 $\pm$ 1,73	30,34 $\pm$ 1,44	20,75 $\pm$ 1,39	18,37 $\pm$ 1,35	26,17 $\pm$ 1,56



**Tabela 19.** Valores médios da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{\text{sat}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), eficiência do uso da água (EUA, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ]), eficiência intrínseca do uso da água (EUAI, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ]) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após 5, 11, 19, 26, 33, 54, 67, 75 e 82 dias de exposição no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de janeiro a abril de 2008 (Verão 2008). (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Verão 2008 - Folhas jovens</b>									
dias	5	11	19	26	33	54	67	75	82
$A_{\text{sat}}$	11,73 $\pm$ 0,87	10,05 $\pm$ 0,91	10,11 $\pm$ 1,12	10,54 $\pm$ 0,88	10,57 $\pm$ 0,69	8,61 $\pm$ 0,88	9,52 $\pm$ 0,52	7,65 $\pm$ 0,63	8,54 $\pm$ 0,51
$g_s$	0,41 $\pm$ 0,023	0,34 $\pm$ 0,058	0,38 $\pm$ 0,062	0,539 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,038	0,24 $\pm$ 0,035	0,40 $\pm$ 0,023	0,27 $\pm$ 0,042	0,43 $\pm$ 0,051
$E$	2,46 $\pm$ 0,106	1,85 $\pm$ 0,146	2,17 $\pm$ 0,223	1,81 $\pm$ 0,142	2,17 $\pm$ 0,16	1,82 $\pm$ 0,079	1,99 $\pm$ 0,098	1,81 $\pm$ 0,177	1,18 $\pm$ 0,039
$C_i$	276 $\pm$ 5,18	279 $\pm$ 8,44	294 $\pm$ 5,04	299 $\pm$ 4,06	286 $\pm$ 2,74	283 $\pm$ 4,63	304 $\pm$ 3,29	282 $\pm$ 3,15	295 $\pm$ 2,93
EUA	4,77 $\pm$ 0,289	5,43 $\pm$ 0,188	4,69 $\pm$ 0,38	5,85 $\pm$ 0,266	4,88 $\pm$ 0,099	4,70 $\pm$ 0,409	4,77 $\pm$ 0,155	4,29 $\pm$ 0,297	7,19 $\pm$ 0,297
EUAI	28,44 $\pm$ 1,82	33,09 $\pm$ 4,61	27,72 $\pm$ 2,12	22,09 $\pm$ 3,40	31,29 $\pm$ 1,66	36,8 $\pm$ 2,50	24,05 $\pm$ 1,36	30,80 $\pm$ 2,92	20,72 $\pm$ 1,38

<b>Verão 2008 - Folhas maduras</b>									
dias	5	11	19	26	33	54	67	75	82
$A_{\text{sat}}$	9,76 $\pm$ 0,66	9,97 $\pm$ 0,67	8,29 $\pm$ 0,60	9,86 $\pm$ 0,64	7,43 $\pm$ 0,32	6,02 $\pm$ 0,46	6,48 $\pm$ 0,68	4,83 $\pm$ 0,33	4,8 $\pm$ 0,49
$g_s$	0,38 $\pm$ 0,028	0,40 $\pm$ 0,031	0,37 $\pm$ 0,024	0,68 $\pm$ 0,043	0,36 $\pm$ 0,014	0,25 $\pm$ 0,037	0,43 $\pm$ 0,031	0,21 $\pm$ 0,027	0,35 $\pm$ 0,032
$E$	2,37 $\pm$ 0,086	2,05 $\pm$ 0,080	2,20 $\pm$ 0,108	2,04 $\pm$ 0,047	2,26 $\pm$ 0,044	1,80 $\pm$ 0,085	2,00 $\pm$ 0,076	1,85 $\pm$ 0,126	1,11 $\pm$ 0,028
$C_i$	287 $\pm$ 2,70	292 $\pm$ 3,81	308 $\pm$ 3,65	313 $\pm$ 2,82	314 $\pm$ 3,29	308 $\pm$ 5,70	328 $\pm$ 5,38	298 $\pm$ 5,05	318 $\pm$ 3,54
EUA	4,09 $\pm$ 0,189	4,85 $\pm$ 0,267	3,78 $\pm$ 0,264	4,83 $\pm$ 0,265	3,29 $\pm$ 0,138	3,34 $\pm$ 0,222	3,22 $\pm$ 0,283	2,86 $\pm$ 0,322	4,67 $\pm$ 0,359
EUAI	25,85 $\pm$ 1,03	25,18 $\pm$ 1,56	22,09 $\pm$ 0,83	14,74 $\pm$ 0,98	20,98 $\pm$ 1,45	27,42 $\pm$ 3,31	15,72 $\pm$ 2,00	26,22 $\pm$ 3,36	14,69 $\pm$ 1,70

**Tabela 20.** Valores médios da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{\text{sat}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), eficiência do uso da água (EUA, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ]), eficiência intrínseca do uso da água (EUAI, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ]) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após 5, 12, 40, 47, 61, 68 e 82 dias de exposição no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de abril a junho de 2008 (Outono 2008). (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Outono 2008 - Folhas jovens</b>							
dias	5	12	40	47	61	68	82
$A_{\text{sat}}$	11,16 $\pm$ 0,62	12,78 $\pm$ 0,48	9,40 $\pm$ 0,45	7,85 $\pm$ 0,60	10,57 $\pm$ 0,59	9,15 $\pm$ 0,84	8,62 $\pm$ 0,59
$g_s$	0,43 $\pm$ 0,522	0,36 $\pm$ 0,017	0,26 $\pm$ 0,029	0,15 $\pm$ 0,022	0,30 $\pm$ 0,017	0,25 $\pm$ 0,029	0,21 $\pm$ 0,027
$E$	2,4 $\pm$ 0,157	2,27 $\pm$ 0,064	1,41 $\pm$ 0,101	1,50 $\pm$ 0,167	1,76 $\pm$ 0,052	2,11 $\pm$ 0,141	1,18 $\pm$ 0,119
$C_i$	289 $\pm$ 9,77	262 $\pm$ 0,41	276 $\pm$ 5,86	259 $\pm$ 4,66	277 $\pm$ 5,71	279 $\pm$ 3,82	286 $\pm$ 2,84
EUA	4,67 $\pm$ 0,095	6,05 $\pm$ 0,348	6,74 $\pm$ 0,320	5,37 $\pm$ 0,311	6,00 $\pm$ 0,319	4,30 $\pm$ 0,123	7,42 $\pm$ 0,316
EUAI	28,39 $\pm$ 4,53	35,23 $\pm$ 0,54	38,34 $\pm$ 4,02	54,42 $\pm$ 4,16	35,02 $\pm$ 2,11	37,66 $\pm$ 2,07	42,12 $\pm$ 3,05

<b>Outono 2008 - Folhas maduras</b>							
dias	5	12	40	47	61	68	82
$A_{\text{sat}}$	9,91 $\pm$ 0,44	11,58 $\pm$ 0,65	8,04 $\pm$ 0,59	5,92 $\pm$ 0,44	9,28 $\pm$ 0,39	7,93 $\pm$ 0,31	5,34 $\pm$ 0,48
$g_s$	0,37 $\pm$ 0,034	0,47 $\pm$ 0,019	0,32 $\pm$ 0,036	0,14 $\pm$ 0,016	0,35 $\pm$ 0,013	0,25 $\pm$ 0,018	0,14 $\pm$ 0,011
$E$	2,20 $\pm$ 0,165	2,48 $\pm$ 0,040	1,51 $\pm$ 0,101	1,4 $\pm$ 0,128	1,86 $\pm$ 0,47	2,15 $\pm$ 0,094	1,01 $\pm$ 0,69
$C_i$	297 $\pm$ 4,14	281 $\pm$ 2,73	296 $\pm$ 3,24	281 $\pm$ 5,12	292 $\pm$ 2,82	295 $\pm$ 4,63	304 $\pm$ 6,06
EUA	4,67 $\pm$ 0,409	4,66 $\pm$ 0,203	5,37 $\pm$ 0,197	4,34 $\pm$ 0,227	4,99 $\pm$ 0,212	3,76 $\pm$ 0,238	5,36 $\pm$ 0,395
EUAI	29,59 $\pm$ 3,08	24,53 $\pm$ 0,66	28,74 $\pm$ 2,87	46,44 $\pm$ 3,58	26,45 $\pm$ 1,21	33,10 $\pm$ 3,12	37,19 $\pm$ 3,02

**Tabela 21.** Valores médios da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), eficiência do uso da água (EUA, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ]), eficiência intrínseca do uso da água (EUAI, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ]) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após 12, 33, 54, 68 e 75 dias de exposição no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de julho a setembro de 2008 (Inverno 2008). (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Inverno 2008 - Folhas jovens</b>					
<b>dias</b>	<b>12</b>	<b>33</b>	<b>54</b>	<b>68</b>	<b>75</b>
<b>A<sub>sat</sub></b>	7,46 $\pm$ 0,56	9,69 $\pm$ 0,65	8,61 $\pm$ 0,45	8,32 $\pm$ 0,41	7,14 $\pm$ 0,21
<b>g<sub>s</sub></b>	0,22 $\pm$ 0,070	0,28 $\pm$ 0,028	0,13 $\pm$ 0,066	0,16 $\pm$ 0,015	0,25 $\pm$ 0,030
<b>E</b>	1,05 $\pm$ 0,164	2,44 $\pm$ 0,129	2,33 $\pm$ 0,092	1,32 $\pm$ 0,099	1,37 $\pm$ 0,074
<b>Ci</b>	274 $\pm$ 13,7	280 $\pm$ 3,07	247 $\pm$ 6,74	256 $\pm$ 2,73	302 $\pm$ 3,68
<b>EUA</b>	7,49 $\pm$ 0,614	3,97 $\pm$ 0,201	3,70 $\pm$ 0,158	6,39 $\pm$ 0,233	5,25 $\pm$ 0,199
<b>EUAI</b>	5,32 $\pm$ 0,39	3,49 $\pm$ 0,14	2,88 $\pm$ 0,24	3,85 $\pm$ 0,27	3,47 $\pm$ 0,27

<b>Inverno 2008 - Folhas maduras</b>					
<b>dias</b>	<b>12</b>	<b>33</b>	<b>54</b>	<b>68</b>	<b>75</b>
<b>A<sub>sat</sub></b>	6,06 $\pm$ 0,55	9,08 $\pm$ 0,76	6,40 $\pm$ 0,75	5,09 $\pm$ 0,37	4,39 $\pm$ 0,45
<b>g<sub>s</sub></b>	0,23 $\pm$ 0,039	0,33 $\pm$ 0,031	0,13 $\pm$ 0,009	0,17 $\pm$ 0,016	0,23 $\pm$ 0,028
<b>E</b>	1,18 $\pm$ 0,133	2,58 $\pm$ 0,157	2,21 $\pm$ 0,124	1,36 $\pm$ 0,089	1,26 $\pm$ 0,079
<b>Ci</b>	304 $\pm$ 4,75	296 $\pm$ 4,51	278 $\pm$ 7,74	301 $\pm$ 4,22	329 $\pm$ 3,87
<b>EUA</b>	5,32 $\pm$ 0,397	3,49 $\pm$ 0,137	2,87 $\pm$ 0,206	3,85 $\pm$ 0,267	3,47 $\pm$ 0,267
<b>EUAI</b>	29,29 $\pm$ 2,89	28,15 $\pm$ 1,36	49,87 $\pm$ 4,34	32,38 $\pm$ 2,75	19,89 $\pm$ 1,79

**Tabela 22.** Valores médios da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> sob radiação fotossinteticamente ativa saturante ( $A_{sat}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), eficiência do uso da água (EUA, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ]), eficiência intrínseca do uso da água (EUAI, [ $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1}$ ]) observados em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após 12, 19, 26, 33, 38, 47, 54 e 61 dias de exposição no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de outubro a dezembro de 2008 (Primavera 2008). (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Primavera 2008 - Folhas jovens</b>								
<b>dias</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>26</b>	<b>33</b>	<b>38</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>61</b>
<b>A<sub>sat</sub></b>	9,34 $\pm$ 0,58	9,74 $\pm$ 0,54	8,49 $\pm$ 0,35	7,73 $\pm$ 0,66	7,31 $\pm$ 0,79	8,25 $\pm$ 0,48	5,90 $\pm$ 0,38	7,62 $\pm$ 0,54
<b>g<sub>s</sub></b>	0,23 $\pm$ 0,024	0,26 $\pm$ 0,009	0,23 $\pm$ 0,007	0,24 $\pm$ 0,020	0,18 $\pm$ 0,026	0,21 $\pm$ 0,015	0,18 $\pm$ 0,019	0,28 $\pm$ 0,026
<b>E</b>	2,83 $\pm$ 0,100	1,96 $\pm$ 0,035	2,11 $\pm$ 0,052	2,07 $\pm$ 0,109	1,69 $\pm$ 0,166	2,11 $\pm$ 0,103	1,81 $\pm$ 0,128	1,49 $\pm$ 0,079
<b>Ci</b>	280 $\pm$ 1,70	271 $\pm$ 3,8	289 $\pm$ 2,89	288 $\pm$ 4,17	266 $\pm$ 5,74	270 $\pm$ 7,65	292 $\pm$ 7,62	295 $\pm$ 4,63
<b>EUA</b>	3,31 0,239	4,98 0,245	4,02 0,103	3,72 0,167	4,36 0,330	3,96 0,337	3,32 0,290	5,14 $\pm$ 0,322
<b>EUAI</b>	39,92 $\pm$ 1,21	38,15 $\pm$ 1,55	37,55 $\pm$ 0,82	32,50 $\pm$ 1,22	41,66 $\pm$ 3,64	40,86 $\pm$ 3,97	34,75 $\pm$ 4,01	27,83 $\pm$ 2,26

<b>Primavera 2008 - Folhas maduras</b>								
<b>dias</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>26</b>	<b>33</b>	<b>38</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>61</b>
<b>A<sub>sat</sub></b>	8,96 $\pm$ 0,93	9,46 $\pm$ 0,91	8,84 $\pm$ 0,39	9,88 $\pm$ 1,12	8,54 $\pm$ 0,71	8,34 $\pm$ 0,57	8,76 $\pm$ 0,82	9,18 $\pm$ 0,55
<b>g<sub>s</sub></b>	0,24 $\pm$ 0,023	0,25 $\pm$ 0,040	0,22 $\pm$ 0,013	0,24 $\pm$ 0,032	0,21 $\pm$ 0,019	0,20 $\pm$ 0,021	0,19 $\pm$ 0,028	0,33 $\pm$ 0,018
<b>E</b>	2,89 $\pm$ 0,224	1,89 $\pm$ 0,186	2,05 $\pm$ 0,060	2,59 $\pm$ 0,213	1,87 $\pm$ 0,121	2,10 $\pm$ 0,141	1,84 $\pm$ 0,218	1,65 $\pm$ 0,043
<b>Ci</b>	282 $\pm$ 7,84	269 $\pm$ 2,26	281 $\pm$ 7,31	265 $\pm$ 3,41	262 $\pm$ 5,59	262 $\pm$ 4,16	257 $\pm$ 4,01	288 $\pm$ 2,60
<b>EUA</b>	3,11 $\pm$ 0,215	5,03 $\pm$ 0,170	4,33 $\pm$ 0,263	3,77 $\pm$ 0,201	4,57 $\pm$ 0,212	4,02 $\pm$ 0,198	4,89 $\pm$ 0,298	5,55 $\pm$ 0,214
<b>EUAI</b>	37,77 $\pm$ 3,42	39,21 $\pm$ 3,04	41,49 $\pm$ 3,67	41,50 $\pm$ 1,88	42,11 $\pm$ 2,90	44,03 $\pm$ 2,84	50,17 $\pm$ 4,16	28,31 $\pm$ 0,96

**Tabela 23.** Valores médios da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD  $\text{gMS}^{-1}$ ), glutathiona redutase (GR,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) e ascorbato peroxidase (APX,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após período de exposição (dias) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de outubro a dezembro de 2007 (Primavera 2007). (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Primavera 2007</b>								
<b>dias</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>33</b>	<b>48</b>	<b>54</b>	<b>61</b>
<b>SOD</b>	955 $\pm$ 133	1930 $\pm$ 285	930 $\pm$ 156	1093 $\pm$ 97	663 $\pm$ 181	617 $\pm$ 135	1212 $\pm$ 235	1227 $\pm$ 132
<b>dias</b>	<b>4</b>	<b>33</b>	<b>48</b>	<b>54</b>	<b>68</b>			
<b>GR</b>	2326 $\pm$ 690	2558 $\pm$ 641	2934 $\pm$ 621	1866 $\pm$ 402	1387 $\pm$ 665			
<b>dias</b>	<b>4</b>	<b>19</b>	<b>33</b>	<b>48</b>	<b>54</b>	<b>61</b>	<b>68</b>	<b>74</b>
<b>APX</b>	3,6 $\pm$ 0,86	11,5 $\pm$ 2,74	12,3 $\pm$ 1,47	8,4 $\pm$ 1,75	4,3 $\pm$ 0,58	4,5 $\pm$ 0,79	5,0 $\pm$ 0,93	4,5 1,32

**Tabela 24.** Valores médios da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD  $\text{gMS}^{-1}$ ), glutathiona redutase (GR,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) e ascorbato peroxidase (APX,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após período de exposição (dias) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de janeiro a abril de 2008 (Verão 2008). (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Verão 2008</b>								
<b>dias</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>26</b>	<b>75</b>	<b>82</b>		
<b>SOD</b>	2043 $\pm$ 86	2688 $\pm$ 339	1764 $\pm$ 186	1410 $\pm$ 164	565 $\pm$ 148	564 $\pm$ 222		
<b>dias</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>26</b>	<b>33</b>	<b>61</b>	<b>67</b>	<b>75</b>
<b>GR</b>	2842 $\pm$ 958	2046 $\pm$ 193	2449 $\pm$ 349	3636 $\pm$ 891	3032 $\pm$ 651	2983 $\pm$ 651	2059 $\pm$ 686	2728 408
<b>dias</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>26</b>	<b>61</b>	<b>75</b>	<b>82</b>	
<b>APX</b>	8,4 $\pm$ 0,92	12,7 $\pm$ 2,27	11,9 $\pm$ 2,86	6,1 $\pm$ 2,27	11,5 $\pm$ 4,84	3,8 $\pm$ 0,54	7,3 $\pm$ 2,42	

**Tabela 25.** Valores médios da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD  $\text{gMS}^{-1}$ ), glutathiona redutase (GR,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) e ascorbato peroxidase (APX,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após período de exposição (dias) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de abril a junho de 2008. (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Outono 2008</b>								
<b>dias</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>40</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>68</b>	
<b>SOD</b>	587 $\pm$ 168	709 $\pm$ 120	411 $\pm$ 108	847 $\pm$ 128	741 $\pm$ 180	622 $\pm$ 103	882 $\pm$ 198	
<b>dias</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>40</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>68</b>	<b>75</b>	
<b>GR</b>	1560 $\pm$ 381	1491 $\pm$ 776	1698 $\pm$ 417	2755 $\pm$ 1156	1201 $\pm$ 451	2084 $\pm$ 1407	3859 $\pm$ 815	
<b>dias</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>40</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>68</b>	<b>75</b>	<b>82</b>
<b>APX</b>	1,2 $\pm$ 0,33	1,5 $\pm$ 0,59	1,2 $\pm$ 0,27	0,7 $\pm$ 0,09	1,0 $\pm$ 0,25	2,1 $\pm$ 0,32	2,6 $\pm$ 0,63	2,3 $\pm$ 0,66

**Tabela 26.** Valores médios da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD  $\text{gMS}^{-1}$ ), glutaciona redutase (GR,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) e ascorbato peroxidase (APX,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após período de exposição (dias) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de julho a setembro de 2008. (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão)

<b>Inverno 2008</b>								
<b>dias</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>33</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>61</b>	<b>68</b>	<b>75</b>
<b>SOD</b>	1400 $\pm$ 226	1362 $\pm$ 274	806 $\pm$ 131	503 $\pm$ 149	569 $\pm$ 166	1071 $\pm$ 261	1570 $\pm$ 179	1579 126
<b>dias</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>33</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>68</b>	<b>75</b>	
<b>GR</b>	1438 $\pm$ 462	2097 $\pm$ 734	336 $\pm$ 791	2741 $\pm$ 1271	2044 $\pm$ 691	4445 $\pm$ 1011	3731 $\pm$ 643	
<b>dias</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>33</b>	<b>61</b>	<b>68</b>	<b>75</b>		
<b>APX</b>	2,3 $\pm$ 0,51	2,1 $\pm$ 0,41	4,3 $\pm$ 2,22	10,6 $\pm$ 1,29	9,9 $\pm$ 1,78	11,4 $\pm$ 1,57		

**Tabela 27.** Valores médios da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, unidades de SOD  $\text{gMS}^{-1}$ ), glutaciona redutase (GR,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) e ascorbato peroxidase (APX,  $\text{dA min}^{-1} \text{gMS}^{-1}$ ) em indivíduos jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' após dias de exposição (dias) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no período de setembro a dezembro de 2008. (n = 6) (média  $\pm$  erro padrão).

<b>Primavera 2008</b>							
<b>dias</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>26</b>	<b>33</b>	<b>38</b>	<b>47</b>	<b>61</b>
<b>SOD</b>	1559 $\pm$ 129	872 $\pm$ 72	664 $\pm$ 46	1033 $\pm$ 178	261 $\pm$ 53	125 $\pm$ 12	319 $\pm$ 87
<b>dias</b>	<b>26</b>	<b>33</b>	<b>38</b>	<b>47</b>	<b>54</b>		
<b>GR</b>	3557 $\pm$ 821	3521 $\pm$ 993	3139 $\pm$ 403	2296 $\pm$ 770	2829 $\pm$ 1297		
<b>dias</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>33</b>	<b>38</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>61</b>
<b>APX</b>	11,2 $\pm$ 4,09	4,2 $\pm$ 1,15	6,8 $\pm$ 1,37	7,0 $\pm$ 2,02	9,3 $\pm$ 2,69	5,2 $\pm$ 1,25	3,2 $\pm$ 0,43