A photograph of guava seedlings growing in a greenhouse. The plants are in the foreground, with their green leaves and stems clearly visible. The background shows the curved metal frame of the greenhouse and the bright blue sky seen through the translucent panels.

Fernanda Mendes Rezende

Efeito da atmosfera enriquecida com CO₂ em mudas de *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato.

Effect of elevated CO₂ on seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato.

São Paulo

2013

Fernanda Mendes Rezende

VERSÃO CORRIGIDA

O original encontra-se disponível no Instituto de Bociências

Efeito da atmosfera enriquecida com CO₂ em mudas de *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato.

Effect of elevated CO₂ on seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato.

Dissertação apresentada ao Instituto de Bociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Botânica, na Área de Recursos Econômicos vegetais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cláudia Maria Furlan

São Paulo

2013

Rezende, Fernanda Mendes
Efeito da atmosfera enriquecida com
CO₂ em mudas de *Psidium guajava* L. cv.
Pedro Sato.

119 páginas.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

Palavra-Chave: 1. Goiabeira; 2.
Elevado CO₂; 3. Metabólitos Secundários.

Universidade de São Paulo. Instituto
de Biotecnologia. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Cláudia Maria Furlan

Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais, Heleno e
Márcia, ao meu irmão Rodrigo por todo
amor, suporte e compreensão que
possibilitaram a realização deste sonho.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha orientadora, Claudinha, por todo apoio ao longo desses sete anos trabalhando juntas. Foram ótimos momentos de aprendizado e amizade.

Ao professor Marcos Buckeridge e sua equipe por todo apoio com a fumigação e o suporte para análises realizadas em seu laboratório.

A Patrícia Bulbovas e suas alunas que auxiliaram nas análises de antioxidantes.

À professora Eny Floh, e principalmente a Amanda por toda paciência e ajuda oferecida nas análises de poliaminas.

Ao professor Diego Demarco por contribuição com as análises anatômicas.

A Paula e ao Homelhan por toda ajuda enchendo os vasos e além deles a todos que compareceram para ajudar no plantio.

Aos técnicos Leonardo e Leila que, cada um a sua maneira, contribuíram muito com as coletas e análises químicas. Por falar em coletas, Paula obrigada de novo.

Aos professores do laboratório Salatinos e Déborah por todos os momentos de aprendizagem e trocas durante reuniões ou cafés.

A Aline (a especialista) pelo bom humor e todo auxílio com assuntos da 147. Não poderia deixar de fora Mourisa, afinal quem é a técnica que diverte todo mundo na copa as 8:30 e ajuda pra que tudo funcione no laboratório?

Às minhas companheiras de pós Kátia, Carol, Bruna, Nati, Alice, Sarah e Adne pelo apoio nos momentos difíceis, descontrações nos momentos menos difíceis seja tomando um café, acompanhando num cigarro ou indo tomar um sol num belo dia de congresso. Agradeço também a todos os outros integrantes do laboratório de fitoquímica que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho chegasse ao fim.

Aos meus amigos distantes que se fizeram presentes em muitos momentos Sah, Naty, Lerdo, Nelito, Diurno, Thaís; e também por me acolherem muito bem no interior paulista (um viva para rep. Elza!). Obrigado aos *amigo* e as *amiga*!

À FAPESP pelo apoio financeiro (2011/09435-4) e a CAPES pela bolsa concedida. Além do Instituto de Biociências pela infraestrutura e hospitalidade como um segundo lar.

Enfim, a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação profissional.

Muito Obrigada!

Índice

Capítulo 1- Caracterização do tema estudado.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
2. ESTRUTURA DO TRABALHO	12
2.1- Cultivo e coletas das plantas	12
2.2-Dados microclimáticos	14
3. BIBLIOGRAFIA.....	18
Capítulo 2- Metabolismo primário em resposta ao elevado CO ₂	25
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Incremento e Biomassa	31
2.2 Carboidratos.....	31
2.3 Razão Carbono/Nitrogênio (C/N)	32
2.4 Ligninas e Fibras.....	32
2.5 Análises estatísticas	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1 Incremento e Biomassa	34
3.2 Carboidratos.....	39
3.3 Razão Carbono/Nitrogênio (C/N)	42
3.4- Ligninas e Fibras	43
3.5- Análises Multivariadas.....	45
4. BIBLIOGRAFIA.....	48
Capítulo 3-Defesas Antioxidantes em resposta ao elevado CO ₂	55
1- INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1 Ciclo AA/GSH	64
2.2 Substâncias Fenólicas.....	65
2.3 Poliaminas solúveis	67
2.4- Análises estatísticas	67

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.1 Ciclo AA/GSH	68
3.2 Substâncias Fenólicas.....	70
3.3 Poliaminas solúveis	80
3.4- Análise Multivariada	83
4. BIBLIOGRAFIA.....	86
Capítulo 4- Considerações finais.....	97
Resumo.....	109
Abstract.....	113
Anexo	117

Capítulo 1- Caracterização do tema estudado

1. INTRODUÇÃO GERAL

Psidium guajava L. pertence à Myrtaceae, uma das maiores famílias da flora brasileira, com 23 gêneros e 1000 espécies (Souza & Lorenzi, 2005). Myrtaceae inclui outras plantas agrícolas importantes que rendem produtos econômicos, como temperos aromáticos (cravo-da-índia, *Syzygium aromaticum*; pimenta-da-jamaica, *Pimenta dioica*), óleos aromáticos (eucalipto, *Eucalyptus* spp), plantas ornamentais (papeleira, *Malaleuca leucadendra*; escova-de-garrafa, *Callistemon citrinus*) e várias frutíferas (jambo, *Syzygium* spp.; grumixama, *Eugenia brasiliensis*; pitanga, *Eugenia uniflora*; jabuticaba, *Myrciaria cauliflora*; e muitas outras) (Kwee & Chong, 1990; Souza & Lorenzi, 2005). *Psidium* apresenta aproximadamente 150 espécies entre as quais se destacam *P. guajava* L. (goiabeira, $2n = 22$), *P. cattleianum* Sabine (araçá doce, araçá-de-praia ou araçá-de-coroa) e *P. guineense* Swartz (araçá-do-campo) (Pereira, 1995).

A maior diversidade de espécies de *Psidium* encontra-se no Brasil central e sudeste, mas há também um bom número de espécies (aproximadamente 15) de ocorrência na região norte da América do Sul, várias nas Índias Ocidentais, algumas na América do Norte, e algumas espécies periféricas dos Andes e do sul do Brasil. Numerosas espécies descritas da região central e sudeste do Brasil, ainda não foram adequadamente estudadas (Pommer *et al.*, 2006).

P. guajava é uma espécie tropical, frutífera e de grande importância na fruticultura brasileira. O Brasil é o quarto maior produtor mundial ficando atrás da Índia, Paquistão e Egito (FAO, 2011). No Brasil, os cultivares vermelhos de casca rugosa, principalmente Pedro Sato e Sassaoka, são, atualmente, os mais plantados para a comercialização de frutos frescos. Embora a área total em produção no país tenha aumentado 45% de 1999 a 2004, no nordeste do Brasil, onde a goiabeira é cultivada com irrigação e tecnologia intensiva, a área plantada aumentou cerca de 90%. Entretanto, devido aos baixos preços obtidos pelos produtores, a redução na área de plantio foi sentida em 2005 (Pommer *et al.*, 2006). França, Reino Unido e Países Baixos são os grandes consumidores da goiaba brasileira; juntos consomem quase 166 mil quilos desse fruto, segundo dados do Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (2011), caracterizando um mercado atraente e promissor (Pereira *et al.*, 2003; IBGE 2006; Souza, 2010).

Além de ser muito utilizada na alimentação (consumo *in natura* ou geleias) a goiabeira é utilizada na medicina popular há muitos anos, principalmente pela sua ação antidiarreica, mas também contra outros problemas gastrointestinais (Guitierrez *et al.*, 2008). Estudos etnofarmacológicos mostraram que *P. guajava* é usada em diversas partes do mundo para o tratamento de: diabetes, hipertensão, cáries, feridas, alívio de dores e redução de febre. Alguns países apresentam uma longa história de uso da goiabeira como planta medicinal, como México, países da América Central, África e Ásia. Na América Latina esta espécie também é amplamente usada na medicina tradicional (Mejía & Rengifo, 2000; Mitchell & Ahmad, 2006 a,b).

Nos países em desenvolvimento os problemas de diarreia são corriqueiros e fatais. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) a diarreia foi a maior doença registrada no mundo em 2004, atingindo 4.630,4 milhões de pessoas (OMS, 2005). Diversos são os estudos que descrevem a atividade antidiarreica de extratos de goiabeira (Lutterodt, 1989; 1992, Tona *et al.*, 1999; Conde *et al.*, 2003). Gonçalves *et al.* (2005) verificaram atividade inibitória (93,8%) de *Simian rotavirus* (SA-11; causador de viroses) quando utilizado um extrato metanólico de folhas de *P. guajava* (8 mg.mL⁻¹). Além disso, substâncias isoladas de frutos da goiabeira, como uma lectina galactosideo específica, ligou-se a *Escherichia coli* (comum agente causador de diarreia), prevenindo a adesão desta na parede intestinal (Coutiño *et al.*, 2001)

Os estudos de investigação científica com a goiabeira iniciaram-se em 1940 e foram diversas as atividades biológicas positivas para testes com: feridas, acne, placa dentária, malária, alergias, tosse, doenças cardiovasculares degenerativas, doenças musculares, doenças inflamatórias (incluindo reumatismo), dores menstruais, doenças hepáticas, câncer, entre outras (Guitierrez *et al.*, 2008).

Atividade antioxidante dos extratos de *P. guajava* é outra bioatividade amplamente descrita na literatura (Qian & Nihorimbere, 2004; Thaipong *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2006; Chen, 2007; You *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). You *et al.* (2011) analisaram extratos de variados órgãos de *P. guajava* (caule, folhas, sementes e frutos) obtidos com solventes de diferentes polaridades (acetona, etanol, metanol e água) quanto ao teor de substâncias fenólicas, captura dos radicais livres DPPH e ABTS e atividade inibitória da tirosinase. Os autores verificaram que os extratos de caule e folha apresentaram maiores atividades do que frutos e sementes, provavelmente pela maior quantidade de substâncias fenólicas presente nesses extratos. Os maiores valores de atividade para os testes realizados foram encontrados no extrato de folhas em acetona; apenas para o teste da atividade inibitória da tirosinase é que foram encontrados maiores valores de atividade no extrato etanólico de folhas.

As substâncias fenólicas formam uma grande classe, em número de substâncias já descritas, do metabolismo vegetal secundário. Os metabólitos secundários geralmente são relacionados com as atividades biológicas encontradas nas plantas e são sintetizados em diferentes compartimentos celulares, por quatro vias (fig. 1.1): chiquimato, mevalonato (MEV), malonato e metileritritol fosfato (MEP).

Cada uma das classes formadas por essas vias é reconhecida por agrupar substâncias com estruturas e propriedades químicas semelhantes, muito mais do que por compartilharem a mesma via de síntese. São elas: terpenoides, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas. Os terpenoides são sintetizados pelas vias MEP e MEV, enquanto as substâncias nitrogenadas, como alcaloides e glucosinolatos, têm como precursores aminoácidos alifáticos e aromáticos. Substâncias fenólicas são sintetizadas principalmente pela via do chiquimato, mas também, em menor proporção, pela via do malonato. Muitos metabólitos secundários provêm de uma combinação de duas ou mais vias de síntese, como é o caso dos flavonoides, que são sintetizados pela combinação de precursores oriundos das vias do malonato e do chiquimato (Dewick, 2009). É um número bem limitado de substâncias que atua como blocos construtores do vasto número de metabólitos secundários, e esses blocos construtores são derivados do metabolismo primário.

Um ponto importante é a classificação de substâncias como metabólitos primários e secundários. De modo geral, a diferenciação é feita pelo conceito de que metabólitos secundários não estão envolvidos em processo geradores de energia e de constituição do protoplasto. Assim, não apresentam papéis diretos nos processos de fotossíntese, respiração, transporte de solutos, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e gorduras (Dewick, 2009).

Outra definição baseia-se no fato de que, apesar da grande variedade entre os organismos, os caminhos de modificação e síntese de carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos são essencialmente os mesmos. Esses processos demonstram a unidade fundamental de toda a matéria viva. Por exemplo, a degradação de carboidratos geralmente ocorre por vias bem conhecidas como glicólise e ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido cítrico, ou ciclo do ácido tricarboxílico), que liberam energia através de reações oxidativas. Em contraste com essas vias metabólicas encontradas em todos os organismos, existem os metabólitos que apresentam distribuição limitada, são eles os metabólitos secundários ou especiais. Esses compostos expressam a individualidade de grupos (família, gênero e até espécie), apresentando características vitais, como atrativos ou repelentes a polinizadores, dissuasores de herbivoria, proteção contra radiação UV, sinalização intraespecífica e, até mesmo, adaptações a novas

situações impostas pelo ambiente, dentre outras funções. São esses metabólitos secundários que fornecem a maior parte dos produtos naturais farmacologicamente ativos (Dewick, 2009).

Figura 1.1- Desenho esquemático das vias de síntese de metabólitos secundários. Em negrito, as vias de síntese e as principais classes de metabólitos que geram estão indicadas pelas setas. As estruturas representam exemplos de metabólitos secundários. (Baseado em Dewick, 2009).

Como componentes majoritários dessa espécie foram descritos taninos e flavonoides (glicosídeos de quercetina) (Park *et al.*, 2012; Mailoa *et al.*, 2013; Yusaf *et al.*, 2013), sendo a atividade terapêutica da goiabeira atribuída principalmente há presença dessas duas classes de substâncias, que são altamente ativas contra diversas bactérias patogênicas (Meckes *et al.*, 1996; Shaheen *et al.*, 2000; Guitiérrez *et al.*, 2008).

Dentre os compostos secundários mais descritos em *P. guajava*, estão os ácidos fenólicos, como o ácido gálico (em folhas e raízes, Quisumbing, 1978; Okuda *et al.*, 1984), ácido ferúlico (em folhas, Zhu *et al.*;1997), ácido clorogênico (em folhas, Qian & Nihorimbere; 2004; Liang *et al.*;2005), entre outros. Essas substâncias são importantíssimas não somente para o uso medicinal, mas também como resposta a fatores bióticos e abióticos de estresse. Outra classe importante em *P. guajava* é a de óleos voláteis; como exemplo seu constituinte limoneno (Li *et al.*, 1999) é amplamente empregado na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, porém, para a planta, os óleos voláteis representam importantes formas de repelir e/ou atrair insetos (Maeda & Dudavera, 2012).

Além de sua importância alimentícia e medicinal, *P. guajava* também se mostrou ser boa bioindicadora de poluentes atmosféricos. Primeiramente, essa espécie foi estudada em ambiente afetado principalmente por óxidos de nitrogênio (NO_x) e fluoretos na região de Cubatão.

Moraes *et al.* (2002) estudaram *P. guajava* selvagem na forma de biomonitoramento ativo da região da Serra do Mar e Cubatão e encontraram que a goiabeira acumula altas concentrações de flúor, enxofre e nitrogênio, sem a presença clara de sintomas foliares visíveis. Os autores propuseram essa espécie como bioindicador para regiões tropicais. Em um estudo posterior, foi verificado que a goiabeira acumula fluoretos e nitrogênio em suas folhas, além de apresentar mudanças em seu crescimento quando exposta nas áreas mais afetadas pela poluição de Cubatão (Furlan *et al.*, 2007).

Estudos mais recentes, realizados em câmaras de fumigação, observaram sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio (O₃) em *P. guajava* cv. Paluma. Na presença de determinadas concentrações desse poluente o cultivar apresentou pontuações intervenais vermelho-amarronzadas na superfície adaxial de suas folhas (Furlan *et al.*, 2007; Pina *et al.*, 2007; Pina & Moraes, 2010). Para o cultivar Pedro Sato, a manifestação desses sintomas ocorre com menor intensidade e com tonalidade bronzeada (Moraes *et al.*, 2011). Essas duas tonalidades de sintomas foliares são frequentemente verificadas em plantas expostas ao ozônio e descritas como *reddening* e *bronzing*, respectivamente (Sanz *et al.*, 2002).

Rezende & Furlan (2009), também estudando *P. guajava* cv. Paluma verificaram um aumento nas quantidades foliares de antocianinas e taninos quando esse cultivar foi fumigado com ozônio, sendo progressivamente maior com o aumento da dose aplicada. O cultivar Pedro Sato apresentou redução nos conteúdos de antocianinas e taninos (Moraes *et al.*, 2011). Moraes (comunicação pessoal) vem propondo o cultivar Pedro Sato como menos tolerante ao ozônio quando comparado ao Paluma, não só pela redução de compostos fenólicos, mas também por alterações nas taxas de fotossíntese frente a alguns tipos de estresse.

Atualmente, além dos tradicionais gases poluentes conhecidos, e que fazem parte dos padrões nacionais de qualidade do ar, o dióxido de carbono (CO₂) vem chamando as atenções de muitos pesquisadores por colaborar com o efeito estufa.

O CO₂ está presente na atmosfera em pequenas quantidades e desempenha um papel vital no ambiente terrestre como um ingrediente necessário para o ciclo de vida de plantas e animais. Ao decorrer das eras geológicas a concentração deste gás variou, num período de 650.000 anos, entre 180 ppm (partes por milhão), nos períodos glaciais, e 280 ppm, nos períodos interglaciais (Damata *et al.*, 2009; IPCC, 2013).

No período em que ocorreu o surgimento das grandes florestas, entre o Devoniano e o Carbonífero, as concentrações deste gás eram próximas às encontradas atualmente (Körner, 2006). Após uma elevação dos teores de CO₂ ocorrida no Mesozóico, houve uma drástica diminuição destes durante o Terciário (Pagani *et al.*, 2005), o que possibilitou o surgimento e diversificação da maior parte dos gêneros modernos de plantas (Körner, 2006).

Devido ao maior aquecimento da atmosfera após o último período glacial (Laurenciano ~150.000 anos atrás), uma parte do CO₂ foi dissolvida na água do mar e a concentração desse gás na atmosfera ficou em torno de 240 ppm. Estima-se que a maioria das espécies que domina a biosfera atual evoluiu sob concentrações de CO₂ ([CO₂]) na faixa de 180 a 240 ppm, de acordo com dados de teores de CO₂ obtidos desde 650.000 anos atrás (Körner, 2006). O aumento da [CO₂] atmosférica pela ação antrópica (atualmente acima de 395 ppm) é uma nova experiência para a vida das espécies de plantas modernas (Pearson & Palmer, 2000; Crowley & Berner, 2001).

O primeiro alerta à humanidade em relação ao aumento de temperatura de que se tem registro foi feito em 1896 pelo físico sueco Svante Arrhenius. Ele afirmou que se a emissão de CO₂ continuasse na proporção do crescimento populacional e econômico, desde a Revolução Industrial em 1750, a temperatura média do planeta subiria de maneira dramática em decorrência do efeito estufa (processo de retenção de calor na atmosfera) (Leemans, 1997). No entanto, o alerta não teve qualquer impacto na sociedade daquela época. Com a intensificação da queima de

combustíveis fósseis e a destruição de florestas para a expansão da agricultura e da industrialização, a [CO₂] na atmosfera atingiu 395.15 ppm em agosto de 2013 (<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/> e <http://co2now.org/>).

Estima-se que a [CO₂] aumenta cerca de 1% por ano, principalmente pela queima de combustíveis fósseis (tais como o carvão, petróleo e gás natural), mas também pelo intensivo desmatamento. Nesse ritmo de crescimento, estudos de simulação de modelos climáticos preveem que essas concentrações possam alcançar de 600 a 750 ppm em 90 anos (IPCC, 2013).

A temperatura média global aumentou 0,4% entre 1992 e 2010 (Guia Rio+20), e os modelos sugerem que a temperatura média da atmosfera terrestre aumentará de 1,5 a 4°C neste século (IPCC, 2013), ocasionando derretimento de parte do gelo das calotas polares, elevando o nível dos mares e trazendo sérios prejuízos para a humanidade e para os ecossistemas terrestres, principalmente nas zonas litorâneas. Além disso, aumentos na temperatura média global causarão, com alta probabilidade, alterações na umidade atmosférica e nos regimes de precipitação devido a um regime hidrológico mais ativo, mudanças na circulação atmosférica e oceânica e aumento na capacidade de retenção de vapor de água do ar (Buckeridge *et al.*, 2007).

Em setembro de 2013 o Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (PBMC), criado em 2009 pelos ministérios do Meio Ambiente (MMA) e da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), divulgou o primeiro relatório de avaliação nacional (RAN1). Este é o mais completo diagnóstico já produzido sobre as principais tendências do clima futuro no país. As previsões apontam para um aumento, em todas as regiões do país, de 3 a 6°C até 2100. Sugere, ainda, que os índices pluviométricos apresentarão reduções em quase todos os biomas, tanto no inverno quanto no verão, com exceção dos pampas e da mata atlântica (apenas a porção da região sudeste) em que a precipitação será maior (RAN1, 2013).

Sabe-se que a alteração do perfil climático do globo, que se manifesta sob forma de tendências, rupturas e ciclicidades, faz parte da história do planeta e é anterior ao surgimento dos humanos. Essa alteração está registrada em relevos residuais, depósitos sedimentares, no solo, e também em registros meteorológicos realizados desde o século XVII (Conti, 2005), o que gera debates sobre a influência da ação humana sobre as mudanças climáticas. Mas, apesar das discussões e controvérsias sobre o tema, o CO₂ é o gás precursor da fotossíntese, de forma que as alterações nas concentrações desse gás irão influenciar os processos metabólicos em vegetais.

De modo geral, os efeitos diretos já relatados do aumento na concentração de CO₂ atmosférico nas plantas são citados como: i) aumento de atividade da RUBISCO, via estímulo da carboxilação e inibição da oxigenação dessa enzima; ii) redução da abertura estomática; iii)

alteração da respiração mitocondrial; e iv) possível redução da transcrição de genes relacionados às trocas gasosas ou ao crescimento. Indiretamente, também foi observada alteração no balanço de água e carbono nas plantas, com efeitos secundários sobre o crescimento, partição de recursos e síntese de substâncias de defesa (Buckeridge *et al.*, 2008 *apud* Godoy *et al.*, 2009).

É vasta a literatura a respeito dos efeitos no crescimento e fisiologia de plantas que crescem sob atmosfera enriquecida com CO₂ (Griffin & Seemann, 1996; Ceulemans *et al.*, 1999; Pritchard *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1999, Kerstiens, 2001; Ainsworth & Long, 2005; Malhi & Phillips, 2004; Körner, 2006; entre outros muitos disponíveis). E muitos são os trabalhos que discutem a relação do aumento dos níveis de CO₂ na síntese de substâncias oriundas do metabolismo secundário (Lincoln *et al.*, 1993; Lavola & Julken-Titto, 1994; Kinney *et al.*, 1997; Hartley *et al.*, 2000; Coviella *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Peltonen *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2006; Koike *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011, dentre outros), porém estes trabalhos concentram-se em espécies de zonas temperadas, incluindo cultivares agrícolas, espécies herbáceas e arbóreas (Iason *et al.*, 2012).

Dessa forma, por ser uma espécie frutífera tropical, economicamente importante no Brasil, e por apresentar respostas características na presença de poluentes atmosféricos como O₃ e fluoretos, *P. guajava* se mostrou interessante para o estudo em condições de atmosfera enriquecida com CO₂, especialmente por apresentar uma ativa produção de substâncias secundárias (em especial substâncias fenólicas). Este estudo se propôs a avaliar os conteúdos de açúcares solúveis e amido, razão C/N, e antioxidantes (substâncias fenólicas, poliaminas, ácido ascórbico e glutatona) em mudas de *P. guajava* cv. Pedro Sato submetidas à atmosfera enriquecida com CO₂.

Sendo uma espécie que realiza fotossíntese C₃ (utilizando a enzima RUBISCO), *P. guajava* seria mais sensível ao aumento de temperatura do que plantas C₄ e CAM. Sabe-se que em plantas C₃, sob condições de alto CO₂, há um incremento desse gás nos sítios de carboxilação da RUBISCO e a taxa de fotossíntese passa a ser limitada principalmente por reações bioquímicas conectadas ao transporte de elétrons. Em plantas C₃, o aumento de CO₂ atmosférico acima do ponto de compensação estimula a fotossíntese, que será limitada pela capacidade de o Ciclo de Calvin regenerar a molécula aceptora (RUBISCO), processo dependente das taxas de transporte de elétrons (maiores detalhes no capítulo 2). Entretanto, outros fatores, como a condutância estomática, também participarão do processo de regulação da fotossíntese, de forma que a maioria das plantas estudada parece encontrar uma concentração interna de CO₂ intermediária entre as limitações impostas pela carboxilação e a capacidade de regeneração da RUBISCO (Taiz & Zeiger, 2010; Smith, 2010).

Seguindo essa premissa, a atmosfera enriquecida com CO₂ poderia proporcionar um ambiente mais propício à realização de fotossíntese pela goiabeira, com limitações pelas taxas de transporte de elétrons (gerador de espécies reativas de oxigênio). A maior assimilação de carbono poderia resultar em maiores taxas de crescimento, maior produção de carboidratos não estruturais (precursores na via de síntese de substâncias fenólicas) e alteração na relação carbono/nitrogênio.

Alterações em nível fotossintético vêm sendo amplamente descritas na literatura, para certas espécies, sendo apresentadas menores taxas de fotossíntese relacionadas com redução de área foliar. Dessa forma, alteração na quantidade ou qualidade dos produtos primários formados via fotossíntese deve levar a uma consequente alteração na síntese de substâncias oriundas de vias secundárias de síntese, como as substâncias fenólicas, por exemplo. Por outro lado, várias substâncias secundárias vêm sendo descritas como sinalizadoras de fatores de estresse e como integrantes do *pool* de substâncias de defesa. Assim como vários poluentes (SO₂, NO₂), o CO₂ age, inicialmente, como uma forma de nutriente, estimulando a síntese de substâncias carbonadas, mas podendo inibi-la quando em longo período de exposição.

Este estudo, realizado sob condições controladas de fumigação de CO₂, teve como objetivo avaliar alterações bioquímicas e no crescimento da goiabeira (cv. Pedro Sato). Para tal, o presente trabalho analisou o conteúdo de açúcares solúveis, amido e nitrogênio orgânico, afim de melhor entender a alocação de C e N quando *P. guajava* é exposta à atmosfera enriquecida por CO₂. Além disso, avaliou se essa variação atmosférica poderia representar uma forma de estresse oxidativo para a planta, para tanto, foram analisados os conteúdos de substâncias fenólicas, ácido ascórbico, glutatona e poliaminas.

Como objetivo mais amplo, este estudo pretende contribuir para o conhecimento da resposta de espécies tropicais ao estresse induzido por elevadas concentrações de CO₂, podendo gerar subsídios para uma posterior avaliação do risco imposto por essa condição aos cultivos tropicais.

2. ESTRUTURA DO TRABALHO

2.1- Cultivo e coletas das plantas

Plantas jovens de *P. guajava* cv. Pedro Sato com cerca de 30 cm de altura e produzidas por estaquia, foram adquiridas de um produtor especializado, localizado em Taquaritinga - Sítio São João II. As mudas foram transplantadas para vasos de PVC (10 L, 120 cm de altura e 9 cm diâmetro) contendo substrato Plantmax (Eucatex®) e vermiculita fina na proporção 2:1; receberam, ainda, 100 mL da solução nutritiva de Hoagland (Epstein, 1975) no início da exposição e a cada 30 dias durante todo o período de exposição. Durante o cultivo e até o início da exposição (1 mês), os vasos permaneceram em casa de vegetação.

Após esse período, os vasos foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro câmaras de topo aberto (OTC, do inglês *Open Top Chamber*) de 1,5 metros de diâmetro e 4 metros de altura, providas de um sistema de circulação de ar, instaladas no Instituto de Biociências, e pertencentes ao Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFIECO) (fig. 1.2). Foram utilizados 50 vasos por câmaras. Em duas das câmaras foi acoplado um cilindro de CO₂ para que a atmosfera interna se mantivesse a uma concentração próxima de 720 ppm desse gás (elevado CO₂ - C). Nas outras duas câmaras o ar de entrada era proveniente do ambiente (390 ppm de CO₂ - A). As concentrações do gás no interior das câmaras e os dados microclimáticos (temperatura e umidade) foram obtidos através de um sistema de sensores controlados pelo software RICS (RICS- *Remote Integrated Control System*). Nesse sistema as medições de temperatura e umidade são registradas diariamente a cada 10 minutos em todas as câmaras. Já no sistema de medida da [CO₂], as leituras são realizadas a cada 1h30 min, sendo cada medição feita três vezes por 10 minutos. Os dados foram agrupados por médias horárias ao longo dos dias de experimento.

Figura 1.2- Sistema de exposição das mudas ao elevado CO_2 em câmaras de topo aberto (OTC). Setas indicam sistema de circulação de ar; números 2 e 4 correspondem às câmaras de elevado CO_2 (C) e 1 e 3 às câmaras de ar ambiente (A).

A exposição teve duração total de 3 meses (30/08/2011- 24/11/2011) e houve uma coleta inicial no t_0 (dia em que o CO_2 foi ligado). As coletas foram realizadas quinzenalmente (totalizando 7 coletas) com a retirada de 5 vasos (ao acaso) de cada câmara por coleta (totalizando 10 indivíduos de cada tratamento por coleta). Em cada coleta, para cada indivíduo, foram retirados os pares de folhas dos 3º., 4º., 5º. e 6º. nós (contados do ápice para a base do caule) para realização das análises químicas e anatômicas. O restante do material foi separado em raiz, caule e folhas, e manuseado para as análises químicas conforme mostra a tabela 1.1.

Para todos os tipos de armazenamento do material vegetal, a massa fresca e pós-liofilização foi anotada e utilizada para as análises de biomassa.

Tabela 1.1- Manuseio e tratamento dado ao material vegetal coletado e posteriores análises químicas.

Órgão	Manuseio	Tratamento	Análise Química
Raiz	Congelado em N ₂ líquido	Liofilizado	<ul style="list-style-type: none"> •Fenólicos (UV) •Açúcares Solúveis •Amido •C/N •Incremento e Biomassa •Ligninas
Caule	Congelado em N ₂ líquido	Liofilizado	<ul style="list-style-type: none"> •Fenólicos (UV) •Açúcares Solúveis •Amido •C/N •Incremento e Biomassa •Ligninas
Folhas	4°, 5° e 6° nós congelados em N ₂ líquido	Liofilizado	<ul style="list-style-type: none"> •Fenólicos (UV e CLAE) •Açúcares Solúveis •Amido •C/N •Ligninas
		Armazenado em freezer -80°C	<ul style="list-style-type: none"> •Ácido ascórbico •Glutathione •Poliaminas
	3° nó não congelado	Fixação com FAA	•Anatomia
	Restante congelado em N ₂ líquido	Liofilizado	•Incremento e Biomassa

2.2-Dados microclimáticos

O período de aclimação das mudas foi de um mês (julho-agosto) e a exposição ao elevado CO₂ teve início no final do inverno, com duração de três meses. A maior parte da exposição foi realizada durante a primavera no período de 30/08/2011 a 23/11/2012. Ao longo do experimento a temperatura máxima foi de 29,3°C e a mínima de 16,1°C (fig. 1.3). Quanto à umidade relativa, a máxima observada durante o experimento foi de 84,1% e a mínima de 54,4% (fig. 1.3). Observando a variação desses parâmetros ao longo do dia, viu-se que a máxima de temperatura ocorre entre 10h e 14h, enquanto que a umidade relativa apresenta, nesses horários, os valores mínimos do dia. Dessa forma, o ritmo diário de humidade é inverso ao da temperatura (fig. 1.4), podendo explicar a maior evaporação e consumo de água para fotossíntese durante esse período.

Figura 1.3- Médias diárias de (A) Temperatura (°C) e (B) umidade relativa (%), registradas ao longo dos 90 dias de experimento.

Figura 1.4- Médias horárias de (A) Temperatura (°C) e (B) umidade relativa (%).

A flutuação da $[CO_2]$ no decorrer do experimento, em cada tratamento, pode ser observada na figura 1.5, enquanto a variação durante as horas do dia pode ser observada na figura 1.6. Observou-se que as menores concentrações desse gás são encontradas entre 10h e 14h, o que costuma ser relacionado ao consumo de CO_2 para a realização da fotossíntese em horas iluminadas do dia. A figura 1.5 evidencia, ainda, que as câmaras de elevado CO_2 apresentaram, em média, o dobro do valor da $[CO_2]$ encontrada naturalmente no ambiente ao redor das câmaras.

Figura 1.5- Concentrações médias diárias de CO_2 ao longo da exposição. (●) Ar Ambiente; (■) Elevado CO_2 .

Figura 1.6- Concentração média horária de CO_2 ao longo do experimento. (●) Ar Ambiente; (■) Elevado CO_2 .

As concentrações para os parâmetros de temperatura, umidade e [CO₂], evidenciaram que as diferenças entre os tratamentos se resumem somente em maiores concentrações de CO₂, não sendo observadas diferenças na temperatura e umidade entre os tratamentos.

Essa dissertação está dividida em quatro capítulos. No capítulo 2 são relatados os resultados referentes às alterações observadas no metabolismo primário, com análises de açúcares solúveis, amido, a relação C/N, conteúdos de ligninas, além de alguns parâmetros de crescimento. Apesar das ligninas serem compostos fenólicos, optou-se por utilizar os dados junto ao capítulo de metabolismo primário, pois essas substâncias são uma importante forma de acúmulo de carbono nas plantas e são importantes constituintes da parede celular. O capítulo 3 aborda as alterações observadas em sinalizadores de estresse como resposta ao aumento de CO₂, como o ácido ascórbico, glutathione, poliaminas e conteúdos de substâncias fenólicas. Por fim, no capítulo 4, serão discutidas, de forma integrada, as alterações observadas em todos os parâmetros analisados neste estudo, utilizando-se para isso ferramentas de análise multivariada.

3. BIBLIOGRAFIA

- Abreu, P.R.; Almeida, M.C.; Bernardo, R.M.; Bernardo, L.C.; Brito, L.C.; Garcia, E.A.; Fonseca, A.S. & Bernardo-Filho, M. Guava extract (*Psidium guajava*) alters the labelling of blood constituents with technetium-99m. *Journal of Science*, v. 7, p. 429-435, 2006.
- Ainsworth, E.A & Long, S.P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist*, v. 165, n. 2, p. 531-371, 2005.
- Braga, M.R.; Aidar, M.P.M.; Marabesi, M.A. & Degodoy, J.R.L. Effects of elevated CO₂ on the phytoalexin production of two soybean cultivars differing in the resistance to stem canker disease. *Environmental and Experimental Botany*, v. 58, p. 85-92, 2006.
- Buckeridge, M.S.; Mortari, L.C. & Machado, M.R. Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de carbono nas plantas podem afetar o ecossistema? In *Fenologia – Ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos* (G.M. Rego, R.R.B. Negrelle & L.P.C. Morellato, eds.). Embrapa Florestas, Colombo, p.1-13, 2007.
- Ceulemans, R.; Janssens, I.A. & Jach, M.E. Effects of CO₂ Enrichment on Trees and Forests: Lessons to be Learned in View of Future Ecosystem Studies. *Annals of Botany*, v. 84, p. 577-590, 1994.
- Chen, F.; Ge, F. & Parajulee, M.N. Impact of elevated CO₂ on tritrophic interaction of *Gossypium hirsutum*, *Aphis gossypii* and *Leis axyridis*. *Environmental Entomology*, v. 34, p. 37-46, 2005.
- Chen, K.C.; Hsieh, C.L.; Peng, C.C.; Hsieh-Li, H.M.; Chiang, H.S.; Huang, K.D. & Peng, R.Y. Brain derived prostate cancer DU-145 cells are effectively inhibited *in vitro* by guava leaf extracts. *Nutrition Cancer* v. 58, p. 93-106, 2007.
- CO₂Now. Disponível em: < <http://co2now.org/>>. Acesso em 10 de agosto de 2013.
- Conde, G.E.A.; Nascimento, V.T. & Santiago, S.A.B. Inotropic effects of extracts of *Psidium guajava* L. (guava) leaves on the guinea pig atrium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 661-668, 2003.
- Conti, J. B. Considerações sobre as Mudanças Climáticas Globais. *Revista do Departamento de Geografia*, v.16, .p 70-75, 2005.
- Coutiño, R.R.; Hernández, C.P. & Giles, R.H. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* O157:H7. *Archives of Medical Research*, v. 32, p. 251-257, 2001.
- Coviella, C.E.; Stipanovic, R.D. & Trumble, J.T. Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO₂ and nitrogen in transgenic cotton plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 323-331, 2002.
- Crowley, T.J. & Berner, R.A. CO₂ and climate change. *Science*, v. 292, p. 870-872, 2001.
- Damatta, F.M.; Grandis, A.; Arenque, B.C. & Buckeridge, M.S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International*, v. 43, p. 1814-1823, 2010.

- Dewick, P.M. Medicinal Natural Products – A biosynthetic approach. Third edition. John Wiley and Sons. West Sussex, UK, 2009, 327 p.
- Epstein, E. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Tradução e notas de E. Malvolta. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Committee on commodity problems. Intergovernmental group on bananas and tropical fruits. Fifth session, Yaoundé, Cameroon, 2011.
- Furlan, C.M.; Moraes, R.M.; Bulbovas, P.; Domingos, M.; Salatino, A. & Sanz, M.J. *Psidium guajava* 'Paluma' as a new bioindicator of ozone in the tropics. Environmental Pollution, v. 147, p. 691-695, 2007.
- Godoy, J.R.L.; Marabesi, M.A.; Mortari, L.C.; Aidar, M.P.M. & Buckeridge, M.S. A dinâmica da floresta neotropical e as mudanças climáticas globais. Naturalia, v. 32, p. 53-66, 2009.
- Goncalves, J.L.; Lopes, R.C.; Oliviera, D.B.; Costa, S.S.; Miranda, M.M.; Romanos, M.T.; Santos, N.S. & Wigg, M.D. *In vitro* anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. Journal of Ethnopharmacology, v. 99, p. 403-407, 2005.
- Griffin, K.L. & Seemann, J.R. Plants, CO₂ and photosynthesis in the 21st century. Chemistry & Biology, v.3, p. 245-254, 1996.
- Guia Rio+20- Conferência das Nações unidas sobre desenvolvimento sustentável. 2012, 112p.
- Gutiérrez, R.M.P.; Mitchell, S. & Solis, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology, v. 117, p. 1-27, 2008.
- Hartley, S.E.; Jones, C.G.; Couper, G.C. & Jones, T.H. Biosynthesis of plant phenolic compounds in elevated atmospheric CO₂. Global Change Biology, v. 6, p. 497-506, 2000.
- Iason, G.R.; Dicke, M. & Hartley, S.E. The Ecology of Plant Secondary Metabolites- From gene to global processes. Cambridge University, U.K, 2012, 335p.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Agropecuário, Rio de Janeiro, 2006, 777p.
- IPCC- Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report: The Physical Science Basis. Climate Change 2013.
- Kelly, J.J.; Bansal, A.; Winkelman, J.; Janus, L.R.; Hell, S.; Wencel, M.; Belt, P.; Kuehn, A.; Rier, S.T. & Tuchman, N.C. Growth of Trees under Elevated Atmospheric CO₂ Alters Microbial Communities Colonizing Leaf Litter in a Temperate Woodland Stream. Applied and Environmental Microbiology, v. 76, p. 4950-4959, 2010.
- Kerstiens, G. Meta-analysis of the interaction between shade-tolerance, light environment and growth response of woody species to elevated CO₂. Acta Oecologica v. 22, p. 61-69, 2001.
- Kinney, K.K.; Lindroth, R.L.; Jung, S.M. & Nordheim, E.V. Effects of CO₂ and NO₃ availability on deciduous trees, phytochemistry and insect performance. Ecology, v. 78, p. 215-230, 1997.
- Koike, T.; Tobita, H.; Shibata, T.; Matsuki, S.; Konno, K.; Kitao, M.; Yamashita, N. & Maruyama, Y. Defense characteristics of seral deciduous broad-leaved tree seedlings grown under differing levels of CO₂ and nitrogen. Population Ecology, v. 48, p. 23-29, 2006.

- Körner C. Plant CO₂ responses: an issue of definition, time and resource supply. *New Phytologist*, v. 172, p. 393-411, 2006.
- Kwee, L.T. & Chong, K.K. Botany and cultivars. In: *Guava in Malaysia – Production, pests and diseases*. Tropical Press: Kuala Lumpur, p. 21-51, 1990.
- Lavola, A. & Julken-Titto, R. The effect of elevated carbon dioxide and fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). *Oecologia*, v.99, p. 315-321, 1994.
- Lee, W.C.; Mahmud, R.; Pillai, S.; Perumal, S. & Ismail, S. Antioxidant activities of essential oil of *Psidium guajava* L. leaves. *Procedia APCBEE*, v. 2, p. 86-91, 2012.
- Leemans, R. Effects of global change on agricultural land use: scaling up from physiological processes to ecosystem dynamics. In: Jackson, L.E. (Ed.). *Ecology in Agriculture* Academic Press, San Diego, CA, USA p.415-452, 1997.
- Li, J.; Chen, F. & Luo, J. GC–MS analysis of essential oil from the leaves of *Psidium guajava*. *Zhong Yao Cai*, v. 22, p. 78-80, 1999.
- Liang, Q.; Qian, H. & Yao, W. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *Journal European of Mass Spectrometry*, v. 11, p. 93-101, 2005.
- Lincoln, D.E.; Fajer, E.D. & Johnson, E.H. Plant-insect herbivore interactions in elevated CO₂ environments. *Trends Ecological Evolution*, v. 8, p. 64-68, 1993.
- Luo, Y.; Reynolds, J.; Wang, Y. & Wolfes, D. A search for predictive understanding of plant responses to elevated [CO₂]. *Global Change Biology*, v. 5, p. 143-15, 1999.
- Lutterodt, G.D. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 25, p. 235-247, 1989.
- Lutterodt, G.D. Inhibition of Microlax-induced experimental diarrhea with narcotic-like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 37, p. 51-157, 1992.
- Maeda, H. & Dudavera, N. The Shikimate Pathway and aromatic amino acid biosynthesis in Plants. *Annual Reviews of plant biology*, v. 63, p. 73-105, 2012.
- Mailoa, M.N.; Mahendradatta, M.; Laga, A. & Djide, N. Tannin extract of guava leaves (*Psidium Guajava* L) variation with concentration organic solvents. *International Journal of Scientific & Technology Research*, v. 2, n. 9, 106-110, 2013.
- Malhi, Y. & Phillips, O.L. Tropical forests and global atmospheric change: a synthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 359, p. 549-555, 2004.
- Meckes, M.; Calzada, F.; Tortoriello, J.; Gonzalez, J.L. & Martinez, M. Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. *Phytotherapy Research*, v. 10, p. 600-603, 1996.

- Mejía, K. & Rengifo, E. Plantas Medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana, 2ª ed. Tarea Asociación, Gráfica Educativa, Lima Peru, 2000, 286p.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Relatório de avaliação dos objetivos setoriais e dos programas do plano plurianual 2008-2011, Brasília 2011, 93p.
- Mitchell, S.A. & Ahmad, M.H. A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948–2001. West Indies Medical Journal, v. 55, p. 243-269, 2006a.
- Mitchell, S.A. & Ahmad, M.H. Protecting our medicinal plant heritage: the making of a new national treasure. Jamaica Journal, v. 29, p. 28-33, 2006b.
- Moraes, R.M.; Furlan, C.M.; Meirelles, S.T.; Santos, D.Y.A.C.; Souza, S.R.; Viola, S.R.A.; Rezende, F.M.; Barbosa, J.M. & Domingos, R.L. Avaliação da sensibilidade da goiabeira 'Pedro Sato' ao ozônio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 46, p. 971-978, 2011.
- Moraes, R.M.; Klumpp, A.; Furlan, C.M.; Klumpp, G.; Domingos, M.; Rinaldi, M.C.S. & Modesto, I.F. Tropical fruit trees as bioindicators of industrial air pollution in southeast Brazil. Environment International, v. 28, p. 367-374, 2002.
- NOAA- National Oceanic & Atmospheric Administration. Disponível em: <<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>>. Acesso em 10 de agosto de 2013.
- Okuda, T.; Tsutomu, H.; Kazufumi, Y. & Guavin B. An ellagitannin of novel type. Chemical Pharmaceutical Bulletin, v. 32, p. 3787-3788, 1984.
- Organização Mundial da Saúde (OMS), 2005. The treatment of diarrhea: a manual for physicians and other senior health workers, 4th rev. ed. Geneva: World Health Organization
- Pagani, M.; Zachos, J.C.; Freeman, K.H.; Tiple, B. & Bohaty, S. Marked decline in atmospheric carbon dioxide concentrations during the Paleogene. Science, v. 309, p. 600-603, 2005.
- Park, B.-J., Matsuta, T., Kanazawa, T., Park, C.-H., Chang, K.-J., & Onjo, M. Phenolic compounds from the leaves of *Psidium guajava* L. Quercetin and its glycosides. Chemistry of Natural Compounds, v. 48, n.3, p. 477–479, 2012.
- Pearson, P.N. & Palmer, M.R. Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years. Nature, v. 406; p. 695-699, 2000.
- Peltonen, P.A.; Vapaavuori, E. & Julkunen-tiitto, R. Accumulation of phenolic compounds in birch leaves is changed by elevated carbon dioxide and ozone. Global Change Biology, v. 11, p. 1305-1324, 2005.
- Pereira, F.M.; Carvalho, C.A. & Nachtigal, J.C. Século XXI: nova cultivar de Goiabeira de Dupla finalidade. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 25, n.3, p. 498-500, 2003.
- Pereira, F.M. *Cultura da goiabeira*. Jaboticabal, SP: Funep, 1995. 47 p.
- Pina, J.M. & Moraes, R.M. Gas exchange, antioxidants and foliar injuries in saplings of a tropical woody species exposed to ozone. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 73, p. 685-691, 2010.
- Pina, J.M.; Dias, A.P.S.; Rinaldi, M.C.S. & Moraes, R.M. *Psidium guajava* Paluma é sensível às concentrações de ozônio verificadas em São Paulo. Revista Brasileira de Biociências, v. 5, n. 1, p. 42-44, 2007.

- Pommer, C.V.; Murakami, K.R.T. & Watlington, F. Goiaba no mundo. O agrônomo, v. 58, p. 22-26, 2006.
- Pritchard, S.; Rogers, H.; Prior, S. & Peterson, C. Elevated CO₂ and plant structure: a review. Global Change Biology, v. 5, p. 807-837, 1999.
- Qian, H. & Nihorimbere, V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. Journal of Science, v. 5, p. 676-683, 2004.
- Quisumbing, E. Medicinal Plants of the Philippines. Katha Publishing Company, JMC Press, Quezon City, Philippines, p. 321-324, 1978.
- RAN1- Primeiro relatório de avaliação nacional. Base científica das mudanças climáticas. 2013, 197p.
- Rezende, F.M. & Furlan, C.M. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. Chemosphere, v. 76, p. 1445-1450, 2009.
- Sanz, M.J.; Peña, G.; Calatayud, V.; Minaya, M.T. & Cervero, J. La contaminación atmosférica de los bosques: Guía para la indentificacion de los danõs visibles causados por ozono. Ministerio Del Medio Ambiente, Madrid, 2002.
- Shaheen, H.M.; Ali, B.H.; Alqarawi, A.A. & Bashir, A.K. Effect of *Psidium guajava* leaves on some aspects of the central nervous system in mice. Phytotherapy Research, v. 14, p. 107-111, 2000.
- Smith, A.M. & Stitt, M. Coordination of carbon supply and plant growth. Plant, Cell & Environment v. 30, p. 1126-1149, 2010.
- Souza, M.E. Influência das precipitações pluviométricas em atributos físico-químicos de frutos da goiabeira 'Paluma' em diferentes estádios de maturação. Revista Brasileira de Fruticultura. 2010, v.32, n.2, pp. 637-646, 2010.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2005. 640p.
- Taiz, L. & Zeiger, E. Plant Physiology. 5ª edição, editora Artmed, 2010, 782p.
- Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Cisneros-Zevallos, L. & Byrne, D.H. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, v. 36, p. 254-257, 2005.
- Tona, L.; Kambu, K.; Mesia, K.; Cimanga, K.; Apers, S.; de Bruyne, T.; Pieters, L.; Totte, J. & Vlietinck, A.J. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. Phytomedicine, v. 6, p. 59-66, 1999.
- Wu, G.; Chen, F.J.; Ge, F. & Xiao, N.W. Impacts of elevated CO₂ on expression of plant defensive compounds in Bt-transgenic cotton in response to infestation by cotton bollworm. Agricultural and Forest Entomology, v. 13, p. 77-82, 2011.
- You, D.H.; Park, J.W.; Yuk, H.G. & Lee, S.C. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of different parts of guava (*Psidium guajava* L.). Food Science Biotechnology, v. 20, n. 4, p. 1095-1100, 2011.

- Yousaf, M., Zahoor, A.F, Ali, K.G., Anjum, A., Shahzadi, H. Mubeen, Z., Awais, M. & Purveen, S. Qualitative determination of allelochemicals in *Psidium guajava* L. leaves for their effect against wheat and canary grass. Pak. J. Weed Sci. Res. V.19, n.3, p. 239-256, 2013.
- Zhu, M.; Phillipson, J.D.; Greengrass, P.M.; Bowery, N.E. & Cai, Y. Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to proteins. Phytochemistry, v. 44, p. 441-447, 1997.

Capítulo 2- Metabolismo primário em resposta ao elevado CO₂

1. INTRODUÇÃO

O processo de fotossíntese consiste na conversão de energia luminosa em energia química. Em plantas, a energia solar é utilizada na oxidação da água que libera O₂, e reduz o CO₂, sintetizando carboidratos. A energia que é acumulada nas diversas moléculas carbonadas pode ser utilizada tanto como suprimento da demanda energética de numerosas vias anabólicas (para síntese de ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e polissacarídeos), quanto nos processos celulares de desenvolvimento e crescimento ou, ainda, armazenada para servir, posteriormente, como fonte energética para outras formas de vida (Taiz & Zeiger, 2010).

Em eucariotos fotossintetizantes, este processo acontece na organela conhecida como cloroplasto. Especificamente, nos organismos produtores de oxigênio, como, por exemplo, as plantas, a fotossíntese consiste em duas etapas: as reações de luz e as de fixação do carbono. A primeira etapa tem início com a captação de luz pelos complexos antena, que direcionam a luz absorvida para os centros de reação fotoquímica nos fotossistemas I e II (PSI e PSII), ambos localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos (Cruz *et al.*, 2005). A excitação do PS II produz um oxidante forte, capaz de oxidar a água e liberar O₂, prótons e elétrons (e⁻) (Diner & Babcock, 1996). Estes e⁻ serão transportados pela cadeia de transporte de elétrons por uma série de carregadores como a plastoquinona, o complexo citocromo b6f (Sacksteder *et al.*, 2000), plastocianina, chegando, finalmente, ao PSI (Malkin, 1996), onde serão transferidos para a ferredoxina que reduz o NADP⁺ em NADPH (Knaff, 1996). Este fluxo de e⁻ para NADP⁺ é acoplado à liberação de prótons para o estroma, gerando a força motriz eletroquímica que dirige a síntese de moléculas de alta energia (ATP) (Mitchell, 1966; McCarty, 1996), que serão posteriormente utilizadas nas reações de redução do CO₂. O ciclo de redução do carbono resulta na produção de carboidratos, esses compostos possuem diversas atribuições nos vegetais como o armazenamento e translocação de carbono, e a proteção contra condições ambientais adversas, como a restrição hídrica, alta salinidade e temperaturas extremas (Keller & Pharr, 1996).

A principal rota de fixação de carbono é o Ciclo de Calvin (ou também conhecido como ciclo redutor das pentoses fosfato), encontrado em alguns procariotos e em todos os eucariotos fotossintetizantes (Taiz & Zeiger, 2010). A difusão do CO₂ atmosférico para os espaços intracelulares do mesófilo foliar ocorre através dos estômatos. Após a entrada desse gás no interior dos cloroplastos, inicia-se a via C₃ (Ciclo de Calvin) com a combinação do CO₂ e água com uma molécula aceptora de cinco átomos de carbono, a ribulose-1,5-difosfato, através da ação da enzima ribulose-1,5-difosfato carboxilase-oxigenase (RUBISCO) e gerando, ao final, a molécula intermediária de 3 carbonos, 3-fosfoglicerato. Essa enzima possui baixa atividade específica (por

volta de $3,6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína), acarretando, para as plantas, uma maior demanda de nitrogênio na produção dessa enzima, a qual compreende cerca de 50% de todas as proteínas solúveis das folhas (Andrews & Lorimer, 1987; Leegood *et al.*, 2000).

Durante o ciclo das pentoses fosfato, substâncias importantes para o metabolismo secundário de plantas, são formadas, por exemplo, a eritrose 4-fosfato, um dos blocos construtores da via do chiquimato. As moléculas de 3-fosfoglicerato são convertidas em trioses-fosfato (triose-P), por reações que requerem ATP e NADPH (Sharkey, 1985; Taiz & Zeiger, 2010) e podem ser enviadas para o citosol, onde serão utilizadas para síntese de açúcares solúveis, açúcares álcoois, oligossacarídeos solúveis, ou na respiração. Podem, ainda, ser mantidas nos cloroplastos para síntese de amido ou para regeneração do aceptor ribulose-1,5-difosfato.

Embora a glicose seja normalmente representada como produto final da fotossíntese em equações resumidas, na realidade pouca glicose livre é formada. À medida que a glicose (ou outros monossacarídeos como manose, galactose, xilose, etc) é produzida, vai sendo convertida em seus polímeros, como o amido, que é o principal carboidrato de reserva das plantas, ou sacarose, um dissacarídeo que é o principal açúcar de transporte das plantas (Raven, 1996). A estrutura química e a concentração dessas substâncias variam entre as espécies, entre os órgãos, tecidos e células, bem como ao longo do dia, e nas diferentes estações do ano (Lewis, 1984).

O fato é que o aumento de CO_2 atmosférico pode afetar os processos biológicos em diferentes níveis de organização (Mooney *et al.*, 1999), sendo que os controles fisiológicos e ecológicos são os estudados há mais tempo (Ward & Strain, 1999). Em uma revisão, compilando 124 trabalhos realizados em FACE (do inglês, *Free Air Carbon Enrichment*), Ainsworth & Long (2005) verificaram que as taxas fotossintéticas de plantas cultivadas em elevado CO_2 aumentam 28%. Valores similares a este (aumento de 33%) foram encontrados anteriormente por Wand *et al.* (1999) em espécies de gramíneas que realizam fotossíntese via C_3 em diferentes condições de crescimento.

Como vimos no capítulo anterior, os efeitos diretos já relatados do aumento na concentração de CO_2 atmosférico nas plantas são citados como: i) aumento de atividade da RUBISCO, via estímulo da carboxilação e inibição da oxigenação dessa enzima; ii) redução da abertura estomática; iii) alteração da respiração mitocondrial; e iv) possível redução da transcrição de genes relacionados às trocas gasosas ou ao crescimento. Indiretamente, também foi observada alteração no balanço de água e carbono nas plantas, com efeitos secundários sobre o crescimento, partição de recursos e síntese de substâncias de defesa (Buckeridge *et al.*, 2008 *apud* Godoy *et al.*, 2009).

Outros fatores como a fertilidade do solo influenciam nas respostas ao elevado CO₂. Estudos analisando o efeito da atmosfera enriquecida com CO₂ em locais com baixa fertilidade do solo não mostraram crescimento da parte aérea e, em alguns casos, observou-se uma ligeira redução (Curtis *et al.*, 1994; Kubiske *et al.*, 1998; Oren *et al.*, 2001; Sigurdsson *et al.*, 2001; Pokorný *et al.*, 2010; Norby & Zak, 2011), mas é importante ressaltar as diferentes espécies podem responder de forma divergente (Dawes *et al.*, 2011).

Estudos em áreas com baixa fertilidade têm mostrado um incremento inicial que diminui, em poucos anos após o início da exposição; assim como um aumento do uso de nutrientes causado pelo maior crescimento reduz os nutrientes disponíveis no solo (Oren *et al.*, 2001; Norby *et al.*, 2010). Isso tem sido chamado de "limitação progressiva de nitrogênio" (Luo *et al.*, 2004). Alguns estudos incluem adição de nutrientes combinada ao elevado CO₂, e isso resultou num aumento significativo das respostas de crescimento da parte aérea sob elevada [CO₂] (Hättenschwiler & Körner, 1998; Kubiske *et al.*, 1998; Oren *et al.*, 2001; Sigurdsson *et al.*, 2001; Norby *et al.*, 2010).

No entanto, nem sempre a maior disponibilidade de nutrientes implica em maior crescimento. Em climas extremamente frios, o elevado CO₂ não teve efeito, ou teve efeito negativo sobre o crescimento de plantas, independentemente do aporte de nutrientes (Inauen *et al.*, 2012). Quando utilizadas meta-análises para comparar a vasta literatura sobre os experimentos de exposição ao CO₂ em alta e baixa disponibilidade de nutrientes, alguns reportam grandes efeitos sobre o crescimento acima do solo (Curtis & Wang, 1998; Nowak *et al.*, 2004), enquanto outros não encontram diferenças (Ainsworth & Long, 2005). Levando em consideração diferentes espécies e habitats, a razão C/N continua sendo um parâmetro muito importante a ser analisado nos estudos com atmosfera enriquecida com CO₂.

A parede celular é fundamental para a sustentação da planta. Moléculas de grande complexidade estrutural compõem a parede celular primária, estrutura que envolve as células vegetais em expansão (McNeil *et al.*, 1984). A constituição desta parede é basicamente de polissacarídeos e proteínas. Os polissacarídeos são longas cadeias de açúcares ligadas covalentemente em variadas posições, podendo apresentar ramificações de diversos comprimentos (Carpita & MacCann, 2000). A celulose é considerada o polímero vegetal mais abundante, representando cerca de 15 a 30% da massa seca de paredes celulares primárias (Carpita & MacCann, 2000), sendo ainda mais abundante em paredes secundárias (McNeil *et al.*, 1984).

O acúmulo de carbono não ocorre apenas na forma de carboidratos em seus diferentes graus de polimerização, pode se acumular na forma de outras substâncias carbonadas sintetizadas via metabolismo secundário.

Além de carboidratos e proteínas, polímeros fenólicos como as ligninas e taninos também são formas de acúmulo de carbono nas plantas. A lignina é um polímero fenólico complexo, encontrado em todas as plantas vasculares (Traqueófitas), principalmente nas paredes celulares de tecidos de sustentação e condução, conferindo força, rigidez e a hidrofobicidade dessas paredes (Bonawitz & Chapple, 2010). A lignina não está restrita às paredes das células que depositam paredes secundárias, mas também ocorre na parede celular primária e lamela média, em contato com a celulose e hemicelulose já existentes (Taiz & Zeiger, 2010), tornando-se uma substancial fração do carbono orgânico total na biosfera, ultrapassada, em abundância, apenas pela celulose (Battle *et al.*, 2000; Davin *et al.*, 2008; dos Santos, 2008).

Além da lignificação que ocorre durante o desenvolvimento dos tecidos, os estresses biótico e abiótico podem desencadear a síntese de ligninas em locais específicos (Vance *et al.*, 1980; Rogers & Campbell, 2004). A via de síntese de ligninas é a via do chiquimato (ver fig. 3.1 cap. 3). Esse polímero de constituição complexa é resultado da polimerização de três principais unidades monoméricas, os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico.

Diversos estudos têm avaliado o efeito do elevado CO₂ sobre esses compostos do metabolismo secundário (Coley *et al.*, 1985; Kanowski, 2001; Hall *et al.*, 2005; Koike *et al.*, 2006; Haikio *et al.*, 2009), sendo os efeitos relatados bem diversificados, além de ser pouco investigado o efeito de elevado CO₂ em espécies tropicais.

Assim posto, o objetivo deste trabalho foi compreender de que forma a goiabeira investe o carbono oferecido pela atmosfera enriquecida com CO₂. Neste capítulo serão apresentados os parâmetros escolhidos para tentar compreender a alocação de compostos do metabolismo primário entre os diferentes órgãos da goiabeira, assim como analisar o seu investimento em ligninas. Como hipótese, pressupôs-se um aumento de crescimento e alocação de substâncias carbonadas, uma vez que a planta estaria submetida a uma situação de elevado CO₂ sem restrição de água e nutrientes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo foram analisadas as amostras de todos os órgãos vegetais. Para incremento e biomassa utilizamos os dados de todas as coletas, porém, para as demais análises, foram utilizados os dados referentes a 0, 30, 60 e 90 dias ou, ainda, 0, 30 e 90 dias. Essa escolha baseou-se, principalmente, no lento crescimento que essa espécie apresentou.

2.1 Incremento e Biomassa

Foram realizadas medidas de incremento em centímetros (comprimento da raiz e altura do caule) e número de folhas. A altura foi medida a partir da raiz até a base do meristema apical do caule. Além disso, foram calculadas as biomassas fresca e seca (g). A taxa de crescimento (TCR; $\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e a alocação de biomassa (razão raiz/parte aérea, g.g^{-1} ; e frações de massa, g.g^{-1}) foram calculadas segundo Marabesi (2007).

2.2 Carboidratos

2.2.1- Açúcares solúveis

Para a extração de açúcares solúveis totais, exatamente cerca de 10 mg do material triturado foi submetido a quatro extrações consecutivas com 1,5 mL de etanol 80% (v:v) durante 20 minutos a 80°C em banho-maria, e o sobrenadante era recolhido. O sobrenadante foi seco em *speed-vac*, retomado em 1 mL de água ultrapura e acrescido de 0,5 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) para a remoção de pigmentos lipossolúveis como a clorofila. Após a separação das duas fases a fase superior foi coletada e armazenada em microtubos a -20°C.

A quantificação (modificado de Massuko *et al.*, 2005) foi realizada com leitor de microplacas do tipo ELISA a 490 nm. Adicionava-se em cada poço 30 µL do extrato aquoso diluído contendo os açúcares solúveis (utilizando água como controle negativo), 150 µL de ácido sulfúrico concentrado e 30 µL de fenol 5%. A placa era aquecida a 75°C por 5 min e resfriada em banho de gelo por mais 5 min, e então era realizada a leitura. Os resultados de absorbância obtidos eram comparados com uma curva padrão utilizando glicose como referência (23 a 700 µg/mL), e estão expressos em mg.g^{-1} de massa seca (MS). A equação da reta, r^2 e concentração das curvas utilizadas em todo trabalho podem ser visualizadas no anexo A1.

2.2.2- Amido

A extração e a dosagem foram realizadas conforme Amaral *et al.* (2007). Após remoção dos açúcares solúveis (item 2.2.1) foram adicionados ao precipitado 0,5 mL de α -amilase (120 U.mL^{-1}) termoestável de *Bacillus licheniformis*, diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5 (Sigma). As amostras foram incubadas a 75° C por 30 min, e o procedimento repetido mais uma vez. Após esse

procedimento, resfriou-se as amostras até 50° C, adicionou-se 0,5 mL de uma solução contendo 30 U.mL⁻¹ de amiloglucosidase de *Aspergillus niger* em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. As amostras foram incubadas por 30 min a 50°C e foram acrescentados 100 mL de ácido perclórico 0,8 M, centrifugando-se, em seguida, a 9.300 g por 2 min. Para dosagem, foram retirados 5 µL do extrato e acrescentados 300 µL do reagente Glicose PAP Liquiform, contendo as enzimas peroxidase (700 U.mL⁻¹) e glicose-oxidase (11000 U.mL⁻¹), 290 µmol.L⁻¹ de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5. Em microplacas foram adicionados 50 µL do extrato diluído e 250 µL do reagente Glicose PAP, a placa foi incubada por 15 min a 37°C e o teor de amido foi determinado em comprimento de onda de 490 nm. Os valores obtidos foram quantificados através de comparação com curva padrão gerada com solução de glicose (20 a 300 µg.mL⁻¹), e estão expressos em mg.g⁻¹ de massa seca (MS).

2.2.3- Secções anatômicas

As folhas foram fixadas em FAA (Johansen, 1940) por 24 h, formalina neutra tamponada (FNT) em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (Lillie, 1965) e em sulfato ferroso em formalina (Johansen, 1940) por 48 h e estocadas em etanol 70%.

A porção mediana da lâmina foliar de todos os materiais foi isolada, desidratada em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen, 1940), incluída em parafina e seccionada transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo. Secções com 10 a 18 µm de espessura foram obtidas e coradas com azul de astra e safranina (Gerlach 1984) para análise estrutural; com reagente de Lugol para amido (Johansen 1940). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DMLB com câmera digital acoplada e foram realizadas em colaboração com o Prof. Diego Demarco, do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica (IBUSP).

2.3 Razão Carbono/Nitrogênio (C/N)

Exatamente cerca de 2 mg do material liofilizado de folhas, caules e raízes foram enviados para o Laboratório de Análise Elementar na Central Analítica do Instituto de Química da USP para análise de porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio (%CHN) através de um analisador Perkin-Elmer 2400. Foram realizadas as análises de 78 amostras, sendo 26 amostras de cada órgão vegetal, compreendendo as coletas dos dias 0 (n=3), 30 (n=5) e 90 (n=5) para cada tratamento.

2.4 Ligninas

A quantidade de ligninas na amostra foi determinada através da extração do material solúvel em soluções ferventes de detergente (Hatfield *et al.*, 1994). Do material vegetal seco e pulverizado, 400 mg foram tratados com 50 mL de solução de detergente neutro (30 g de

dodecilsulfato de sódio, 19 g de EDTA-Na, 7 g de tetraborato de sódio decaidratado, 4,5 g de fosfato de sódio dibásico e 10 mL de 2-etoxietanol) em ebulição durante uma hora. Após esse período, a solução era filtrada em cadinhos de Gooch e lavada com água fervente até total eliminação do detergente. O resíduo foi seco em estufa a 100° C durante duas horas e transferido para dessecador para ser pesado no dia seguinte, assim determinava-se a quantidade de fibra detergente neutra (NDF). O resíduo da primeira extração foi tratado com 100 mL de solução de detergente ácido (20 g de CTBA em ácido sulfúrico 1 N) a 100° C durante uma hora. Após esse período, a solução era filtrada em cadinhos de Gooch e lavada com água fervente até total eliminação do detergente. O resíduo foi seco em estufa a 100° C durante duas horas e transferido para dessecador para ser pesado no dia seguinte, assim determinava-se a quantidade de fibra detergente ácida (ADF).

O resíduo da segunda etapa era então tratado com ácido sulfúrico 12 M durante um período de 3 horas, a temperatura ambiente. Após o término desse período, a solução foi filtrada em cadinhos de Gooch e lavada com água fervente até total eliminação do ácido. O resíduo era seco em estufa a 100° C durante duas horas, transferido para dessecador, pesado, e submetido à combustão (450° C) para ser novamente pesado, determinando-se a quantidade de lignina detergente ácida (ADL) pela diferença entre as duas pesagens.

2.5 Análises estatísticas

Foram realizados testes utilizando o programa STATISTICA (versão 12) para verificar se a distribuição dos dados era normal. Em seguida, foi confeccionado um gráfico do tipo *box-plot* para verificar a presença de extremos e *outliers*. Esses foram retirados da análise para realização de ANOVA seguida de teste Tukey. Para a análise ANOVA considerou-se o tratamento (elevado CO₂) e a coleta (tempo de exposição em dias), realizando-se uma análise *Two-Way* para verificar a interação desses fatores. Também foram realizadas análises multivariadas de componente principal (PCA) para verificar a correlação entre todas as variáveis analisadas e como influenciam na distribuição das amostras. Para essas análises não foram retirados os *outliers* e matrizes de correlação foram utilizadas como forma de uniformizar a ordem de grandeza dos dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Incremento e Biomassa

As análises estatísticas de incremento em comprimento e número de folhas não demonstraram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos. Viu-se que não há maior incremento da raiz e caulinar (cm), bem como no número total de folhas (fig. 2.1) no tratamento de elevado CO_2 . As análises de biomassa seca não revelaram alterações estatisticamente significativas quando os órgãos estavam separados, porém a análise de biomassa seca total revelou aumento significativo ($p<0,05$) desse parâmetro no tratamento de elevado CO_2 após 75 dias de fumigação, além de uma tendência de aumento após 45, 60 e 90 dias de fumigação (fig. 2.2).

Figura 2.1- Incremento ao longo dos 90 dias de exposição. A- número de folhas, B- incremento do caule (cm), C- incremento da raiz (cm). ■- elevado CO_2 , ♦- Ar ambiente (n=10).

Figura 2.2- Biomassa total (g MS) ao longo dos 90 dias de exposição. (A)- Ar ambiente, (C)- elevado CO_2 (n=10). F- folhas, C- caule e R- raiz. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos.

Poucos são os estudos que analisam o efeito de elevadas concentrações de CO₂ em espécies arbóreas tropicais. Em um estudo realizado com plântulas de *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae), uma espécie tropical, verificou-se que o aumento da [CO₂] elevou a assimilação de carbono tanto pelo incremento em área foliar, quanto pela biomassa seca. O incremento em biomassa foi correlacionado com a diminuição da função oxigenase da RUBISCO, que reduziu a fotorrespiração, estimulando a assimilação de carbono. Nesse mesmo trabalho, os autores mediram a saturação da fotossíntese sob elevado CO₂ com outras espécies (*Caesalpinia echinata*, *Piptadenia gonoacantha*, *Tibouchina granulosa* e *T. pulchra*) e verificaram que, para todas elas, os valores foram elevados, estando a saturação em aproximadamente 800 ppm (Aidar *et al.*, 2002).

Matinez *et al.* (2008) num estudo também com arbóreas tropicais, evidenciaram que o aumento de biomassa sob elevado CO₂ é influenciado por outros fatores, como o estágio sucessional e a disponibilidade de nutrientes. Observaram que as espécies pioneiras (*Croton urucurana* e *Cecropia pachystachya*), crescendo com disponibilidade de CO₂ e nutrientes, apresentaram incrementos de biomassa (17,5% e 32%, respectivamente), mas em situação de baixos níveis de nutrientes e elevadas [CO₂], o aumento de biomassa foi bem menor (10 e 5%). Já as espécies tardias (*Cariniana legalis* e *Essenbeckia leiocarpa*), quando em presença de muitos nutrientes e CO₂, apresentaram aumento de biomassa (17 e 25%, respectivamente), e quando em baixas concentrações de nutrientes, não apresentaram incremento. Nesse trabalho foram avaliados parâmetros de fotossíntese e os resultados em conjunto sugerem que a nutrição do solo tem um grande potencial para influenciar a resposta de espécies diante as mudanças na [CO₂]. Entretanto, no presente estudo, as plantas de goiabeira foram mantidas por três meses sob fumigação com CO₂ e adubação a cada mês, o que representaria uma condição normal de disponibilidade de nutrientes para essas plantas. Mesmo assim, o incremento em biomassa foi significativo apenas aos 75 dias de exposição, mas desde os 15 dias de fumigação, as plantas crescidas em elevada [CO₂] mostraram uma tendência ao incremento de biomassa total, o que sugere a influência desse parâmetro no aumento de biomassa.

Considerando o incremento de cada exposição, o aumento promovido pelo elevado CO₂ em relação ao ar ambiente iniciou-se na segunda quinzena de crescimento, contudo entre 30 e 45 dias teve seu efeito diminuído. A maior diferença de incremento entre os dois tratamentos ocorreu entre 45 e 60 dias de crescimento onde o incremento no elevado CO₂ foi 176% maior que o do ar ambiente. Este foi o ápice do incremento, de forma que nas coletas seguintes, a taxa de crescimento relativa apenas reduziu (tab. 2.1).

Tabela 2.1- Taxa de crescimento relativa ($\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) entre coletas consecutivas de *Psidium guajava* nos tratamentos ar ambiente (A) e elevado CO_2 (C), e o efeito do tratamento C sobre A expresso como porcentagem nos diferentes dias de coleta.

Período	A	C	Efeito %
0-15	0,031	0,024	-22,83
15-30	0,009	0,011	27,75
30-45	0,013	0,012	-3,45
45-60	0,004	0,010	176,73
60-75	0,002	0,003	68,56
75-90	0,016	0,010	-39,83

A alocação de biomassa, expressa como razão raiz:parte aérea, não apresentou diferença significativa. Nos primeiros 15 dias de experimento, a alocação foi maior no elevado CO_2 , porém esse padrão se altera a partir da coleta de um mês, permanecendo dessa forma (maior razão no ar ambiente) até os 3 meses de desenvolvimento (fig. 2.3).

Figura 2.3- Razão Raiz/Parte aérea ao longo dos 90 dias de exposição. ■- elevado CO_2 ,
♦- Ar ambiente (n=10).

A alocação calculada por frações de massa de cada órgão indicaram que a alocação do caule e a da raiz determinam a distribuição dos componentes, já que a fração folha não apresentou alterações ao longo do experimento (fig. 2.4). Até os 15 dias de experimento a alocação de recursos para a raiz aumentou no elevado CO₂, porém dos 30 dias até os 90 há uma redução desta alocação neste órgão. Para o caule foi observado o inverso sendo a maior alocação em função do tratamento dos 30 aos 90 dias.

Figura 2.4- Frações de massa de cada órgão ao longo dos 90 dias de exposição. ■ elevado CO₂,

◆ - Ar ambiente (n=10).

Uma vez que o CO₂ é o substrato para a fotossíntese, a sua concentração pode ter uma relação direta sobre a produtividade de cada espécie. O que tem sido observado é que o efeito do CO₂ sobre a taxa de crescimento ou é pequeno, quando medido no final do experimento (Poorter & Nagel, 2000), ou inicia com maiores incrementos e termina a fumigação com valores iguais ou menores do que os observados em concentração ambiente, quando analisado ao longo do experimento (den Hertog *et al.*, 1996; Makino *et al.*, 1997; Centritto *et al.*, 1999); dados que corroboram os obtidos com a goiabeira. Poorter (1993), num experimento com 10 espécies, verificou que a taxa de crescimento relativa aumentava, em todas as espécies, cerca de 10%, porém o aumento de fotossíntese foi de 20%, indicando que o aumento da fotossíntese não foi proporcional ao aumento nas taxas de crescimento. O autor verificou, ainda, que, nesse caso, as folhas tendiam a ser mais pesadas por unidade de área de forma que os montantes crescentes de carboidratos não eram totalmente utilizados pela planta. Isso contribuiu para uma ineficaz transformação do ganho de carbono (pela fotossíntese) em crescimento. Algo semelhante ocorreu neste estudo, onde não foram obtidos aumentos significativos em crescimento e sim aumento conspícuo nos teores de amido (fig.2.5).

Numerosos estudos têm mostrado que a exposição a níveis elevados de CO₂, quase sempre conduzem a um aumento na resposta fotossintética (Curtis, 1996; Saxe *et al.*, 1998; Ainsworth & Long, 2005; Hyvönen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012). No entanto, também se verificou que o estímulo no crescimento da parte aérea em elevada [CO₂] é muito mais variável do que as taxas fotossintéticas foliares (Curtis & Wang, 1998; Nowak *et al.*, 2004; Körner, 2006; Hyvönen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012).

Não existe um consenso na literatura sobre o efeito do alto CO₂ na alocação de biomassa. Quando descrita como razão raiz/parte aérea, pode tanto aumentar como diminuir (Wolfe *et al.*, 1998; Pritchard *et al.*, 1999; Aidar *et al.*, 2002). Poorter & Nagel (2000), revisando a literatura em que a alocação de biomassa foi dividida em três compartimentos, também não encontraram diferenças na alocação de biomassa, sendo o mesmo observado por den Hertog *et al.* (1996) trabalhando com *Urtica dioica*. A alocação de biomassa, independente do tamanho da planta, não apresenta diferenças entre os tratamentos (Centritto *et al.*, 1999; Bernacchi *et al.*, 2000), corroborando os resultados obtidos para a goiabeira.

É importante refletir que as respostas de arbóreas às mudanças climáticas dependem de muitos fatores além do aumento das [CO₂], como a eficiência do uso da água, disponibilidade de nutrientes, aumento de temperaturas, o tempo de aquecimento e a capacidade das espécies de se adaptarem a novas situações ambientais.

Way & Oren (2010) fizeram uma revisão utilizando 63 trabalhos com o objetivo de compreender como o aumento de temperatura afetaria as espécies arbóreas perenes e caducifólias. Os autores verificaram que as temperaturas elevadas estimularam o crescimento (altura da parte aérea, diâmetro do caule e biomassa) em maior grau nas plantas caducifólias e menor nas perenes. Observaram que as espécies tropicais são mais vulneráveis ao aumento de temperatura do que as espécies de clima temperado ou boreal, fato possivelmente relacionado com a prevalência de espécies perenes nos trópicos. Dessa forma o aquecimento global poderia afetar mais intensamente as regiões de clima tropical, já que estudos mostram que há redução do crescimento de arbóreas tropicas mesmo em pequenos graus de aquecimento (Clark *et al.*, 2003, 2010; Feeley, *et al.*, 2007).

Contudo, o aumento de temperatura e de CO₂ ocorrerão concomitantemente e ainda não há na literatura disponível, estudos que avaliem a combinação desses fatores com o crescimento de arbóreas, sendo prioridade esse tipo de estudo para uma previsão realista sobre o crescimento das florestas no cenário de mudanças climáticas.

3.2 Carboidratos

Pode ser observado na figura 2.5 que as plantas mantidas sob elevado CO₂ apresentaram maiores quantidades de carboidratos armazenados na forma de amido. Observando-se o corte anatômico de uma folha de goiabeira mantida sob elevado CO₂ (fig 2.6), pode-se observar que essas substâncias são acumuladas no parênquima paliçádico e lacunoso das folhas (fig. 2.6B). O tratamento de elevado CO₂ propiciou maiores quantidades de amido em tecido foliar sendo as diferenças, entre os tratamentos, significativas em todas as coletas ($p < 0,05$). Mas o mesmo não foi observado para caules e raízes, onde os conteúdos de amido foram bem semelhantes entre os tratamentos.

Vê-se que o maior acúmulo de amido ocorreu nas folhas, um órgão considerado como fonte dessa substância, pois é ele quem produz fotossintatos além de suas necessidades. Já, os órgãos dreno, como caules, raízes e folhas jovens, são órgãos ou não fotossintetizantes ou que não produzem fotossintatos suficientes para suprir suas necessidades (Taiz & Zeiger, 2010), mas podem armazenar grandes quantidades de carboidratos de reserva.

Embora tenha ocorrido aumento nas concentrações de amido, este foi armazenado apenas nas folhas. Neste estudo, não foi observada translocação de sacarose e acúmulo de amido no caule ou raiz.

Figura 2.5- Teor de amido e de açúcares solúveis (g.g⁻¹ MS) ao longo dos 90 dias de exposição. ■- elevado CO₂, ◆- Ar ambiente (n=10). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05).

Figura 2.6- Secção transversal de folhas de *P. guajava*. A- Coradas com azul de astra e safranina para análise estrutural, B- coradas com lugol: pigmentações escuras indicam a presença de amido. Fotos: Diego Demarco.

Poorter & Kitajima (2007) analisaram diversas espécies tropicais com relação aos conteúdos de carboidratos e concluíram que espécies arbóreas de regiões tropicais apresentam grande variação no conteúdo de amido foliar. Os resultados obtidos expressos em mg.g⁻¹ revelaram quantidades bem inferiores às obtidas nesse trabalho com *P. guajava*. Outras espécies de Myrtaceae (*Eugenia florida* e *Myrciaria cauliflora*) apresentaram uma média de 49 mg.g⁻¹ para açúcares solúveis e 22 mg.g⁻¹ de amido, enquanto a goiabeira, antes da exposição, apresentava uma média de 75 mg.g⁻¹. Talvez essa diferença esteja relacionada com a metodologia de extração, uma vez que os autores utilizaram somente uma enzima (amiloglucosidase) por uma noite, para hidrólise, enquanto utilizamos amiloglucosidase e α -amilase em extrações consecutivas de 1 hora com cada enzima. Outro fator que poderia resultar nessa diferença é a região, no trabalho de Poorter & Kitajima as espécies analisadas eram da Bolívia; além disso, deve-se levar em consideração o fato de que os autores analisaram indivíduos adultos em seu ambiente natural, enquanto neste trabalho, analisamos indivíduos jovens.

A maioria das espécies vegetais apresenta fotossíntese do tipo C₃, sendo que das 15 plantas que fornecem 90% das calorias do mundo, 12 fixam o carbono por ação dessa rota fotossintética. Reddy *et al.* (2010), numa revisão que avaliou o impacto do elevado CO₂ na fotossíntese e produtividade das plantas, verificaram que a maior parte das plantas C₃ estudada apresentou uma resposta positiva para a aclimação fotossintética, assim como plantas CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), enquanto que plantas C₄ (mecanismo análogo ao ciclo de Calvin porém com carboxilação primária realizada pela fosfoenol piruvato carboxilase, PEPcarboxilase, ao invés da RUBISCO) exibiram respostas negativas durante o crescimento. Nestes dois últimos tipos, existem mecanismos de concentração de CO₂ reduzindo a fotorrespiração. Na fotossíntese de plantas C₃ altas [CO₂] induzem a função carboxilase da enzima RUBISCO, propiciando acumulação de carboidratos durante a assimilação de carbono. O acúmulo de carboidratos não estruturais em folhas de plantas C₃ em função do elevado CO₂ é um efeito bastante documentado (Stitt, 1991; Cheng *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 2004). As rotas de fluxo de carbono variam de espécie para espécie de forma que o maior acúmulo de carboidratos observado com a goiabeira foi na forma de amido, resultado semelhante foi encontrado para o jatobá (Costa, 2004).

Em espécies C₄, o acúmulo desses carboidratos não é comumente relatado (Wand *et al.*, 1999), mas já foram observados aumentos nos teores de açúcares solúveis (Read *et al.*, 1997; LeCain & Morgan, 1998). Estudos com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L. cv. SP80-3280) observaram reduções nos níveis de amido foliar e nenhuma alteração significativa para o caule nos dias iniciais de desenvolvimento da planta (45-75 dias após o plantio), mas assim como na

goiabeira, essa forma de carboidrato foi a mais abundante nos tecidos analisados. Em contrapartida, houve aumento nos teores de carboidratos não estruturais nas folhas e no caule, sendo um aumento mais conspícuo observado para o caule (Souza *et al.*, 2013). Opostos a esses resultados, os teores de açúcares solúveis da goiabeira (fig. 2.5) não apresentaram diferenças quando comparados os tratamentos.

3.3 Razão Carbono/Nitrogênio (C/N)

Em todos os órgãos foi possível observar uma tendência ao aumento na razão C/N ao longo do desenvolvimento da espécie. Para folhas e caules houve aumento significativo ($p < 0,05$) dessa razão, após 30 e 90 dias, em função do tratamento (fig. 2.7).

Figura 2.7- Razão C/N nos diferentes órgãos e ao longo dos 90 dias de exposição. ■- elevado CO₂, ◆- Ar ambiente (n=5). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

O acúmulo de carbono em tecidos vegetais ocorre de forma eficiente apenas em situações onde a disponibilidade de nutrientes é suficiente. O nitrogênio, assim como o fósforo e o potássio, são os nutrientes mais limitantes para o desenvolvimento das plantas, mas diversos outros nutrientes são importantes para uma boa assimilação de carbono e consequente desenvolvimento da planta. Se a nutrição da planta é limitada, qualquer carbono adicional não será utilizado de forma produtiva, mesmo com o estímulo da fotossíntese por elevadas [CO₂], e, dessa forma, o estímulo em crescimento pode não ser observado (Kirschbaum, 2011). No presente estudo, esta maior disponibilidade de carbono parece ter influenciado diretamente no acúmulo de amido, mas não no incremento em biomassa da goiabeira.

Diversos estudos que incluem adição de nutrientes revelaram aumento significativo das respostas de crescimento da parte aérea sob elevada [CO₂] (Hättenschwiler & Körner, 1998; Kubiske *et al.*, 1998; Oren *et al.*, 2001; Sigurdsson *et al.*, 2001; Norby *et al.*, 2010). No entanto, nem sempre a maior disponibilidade de nutrientes implica diretamente em maior crescimento. Quando utilizadas meta-análises para comparar a vasta literatura sobre experimentos de exposição de CO₂ em alta e baixa disponibilidade de nutrientes, pode-se observar que alguns estudos encontraram fortes efeitos sobre o crescimento da parte aérea (Curtis & Wang, 1998; Nowak *et al.*, 2004), enquanto outros não observaram mudanças (Ainsworth & Long, 2005).

Novamente, pela análise da razão C/N, verifica-se que a goiabeira parece fotoassimilar mais carbono, mas não o utiliza para seu crescimento, mas sim o parece acumular em substâncias carbonadas não-estruturais.

3.4- Ligninas e Fibras

Nas raízes foram encontradas as maiores porcentagens de ligninas no início e ao fim do experimento (22% e 30 %, respectivamente), porém não houve variação nesses teores como um efeito do tratamento, mas sim relacionado ao desenvolvimento da planta. Diferenças também não foram observadas para caules e folhas. No tecido foliar houve uma tênue redução ($p>0,05$) no conteúdo de ligninas em função do tratamento como pode ser visto na figura 2.8. Durante o desenvolvimento parece ocorrer redução nas porcentagens de ligninas nas folhas ao mesmo tempo em que há um aumento no conteúdo dessas substâncias nas raízes (fig 2.8).

Figura 2.8- Porcentagem de ligninas nos diferentes órgãos e ao longo dos 90 dias de exposição. ■ - elevado CO₂, ◆ - Ar ambiente (n=5).

Assim como outros compostos carbonados as ligninas são influenciadas pela alta disponibilidade de CO₂. Hartley *et al.* (2000) observaram como resposta ao CO₂ uma redução nos níveis desse polímero na primeira geração de *Cardamine hirsuta*, porém, na segunda geração, ocorreu um aumento. Para *Poa annua* não foram observadas mudanças, nem redução nem aumento, em três gerações consecutivas. Os autores consideram essas alterações nos conteúdos, em diferentes gerações, uma consequência das mudanças na fertilidade do solo. Ainda nesse mesmo trabalho, outras duas espécies (*Spergula arvensis* e *Senecio vulgaris*) não apresentaram diferenças nas porcentagens de lignina. Matros *et al.* (2006) estudando *Nicotiana tabacum* relataram ausência de efeito do elevado CO₂ sob os conteúdos de ligninas em folhas e raízes, corroborando com outros e com este estudo, que não observaram alterações significativas nesses teores (Poorter *et al.*, 1997; Peñuelas & Estiarte, 1998). Os metabólitos secundários satisfazem

inúmeras funções celulares, tais como estrutural e defesa contra estresses bióticos e abióticos (Dixon & Paiva, 1995). Contudo alterações no conteúdo de classes como, por exemplo, substâncias fenólicas, afetam diretamente a interação da planta com o ambiente no qual ela está inserida.

A quantidade de lignina presente nos tecidos pode variar com diferentes tipos de estresse. Estudos com estresse por alta luminosidade e altas temperaturas apontam para um aumento dessa classe de substâncias, por outro lado alguns estudos com estresse hídrico mostraram redução (Moura *et al.*, 2010). Como vimos anteriormente, as respostas induzidas pelo elevado CO₂ nessa classe de compostos é variável. Em um estudo que observou redução de ligninas em folhas sob elevada [CO₂] sugere-se que a redução ocorra porque árvores investem muito mais em crescimento do que no enrijecimento da parede celular (Oksanen *et al.*, 2005).

3.5- Análises Multivariadas

A análise de componente principal utilizando as 19 variáveis analisadas neste capítulo e relacionadas a parâmetros do metabolismo primário revelou que 55% da variabilidade encontrada nos dados podem ser explicados pelos dois primeiros eixos (fig. 2.10). Nessa representação gráfica bidimensional, é possível notar uma clara separação dos dados em função do tratamento e do período de exposição.

O eixo 1 posiciona as amostras com relação ao período de exposição, ou seja, as diferenças observadas entre os grupos formados estão relacionadas às variações no desenvolvimento da planta e independentes do tratamento. Para o eixo 1, as amostras pertencentes ao tempo zero de exposição (●) estão localizadas no lado negativo desse eixo, em contraste com as amostras pertencentes ao último período de coleta (▲) no extremo positivo do eixo 1, sendo diferenciadas principalmente pela biomassa de folhas, caules e raízes. Ao longo do eixo 2 estão distribuídas as amostras de acordo com o tratamento, com o posicionamento das amostras provenientes da exposição ao ar ambiente no lado positivo desse eixo e, em contraste, as amostras submetidas ao elevado CO₂ são encontradas no lado negativo do eixo 2.

As amostras do tratamento ar ambiente apresentaram uma distribuição gradual ao longo do eixo 1 em função do período de exposição, mostrando clara influência do desenvolvimento da planta para as diferenças encontradas entre os três grupos formados. Para o elevado CO₂, as amostras provenientes das coletas de 30 e 90 dias, formaram um grupo, indicando que o tratamento teve maior efeito na distribuição dessas amostras do que as alterações derivadas do desenvolvimento da planta, como observado para as amostras do ar ambiente.

A.

B.

Variáveis	Eixo01	Eixo02
C-F	-0,1746	0,1782
N-F	-0,3067	0,1008
C-R	0,0577	-0,3954
N-R	-0,2956	-0,0801
C-C	0,0550	0,0306
N-C	-0,1823	0,3220
Lig-F	-0,2201	0,1997
Lig-C	-0,0025	-0,1362
Lig-R	0,2903	0,0937
MS-R	0,2925	0,2992
MS-C	0,3341	0,1110
MS-F	0,3197	-0,0359
MS-T	0,3372	0,1560
Am-F	0,2412	-0,2578
Am-C	0,2342	0,3390
Am-R	0,2514	-0,1089
AÇS-R	0,0558	-0,3068
AÇS-C	0,1313	-0,2542
AÇS-F	-0,0778	-0,3796

C.

CP	% de variância	% de variância acumulada	% de variância esperada
1	40,066	40,066	18,672
2	14,746	54,812	13,409
3	9,182	63,993	10,778
4	7,235	71,229	9,023

Figura 2.10 - Análise de componente principal de 19 variáveis (C- % de carbono, N- % de nitrogênio, Lig- % de ligninas, MS- massa seca, Am- amido, AÇS- açúcares solúveis; F- folhas, C- caule, R-raíz) relacionadas ao metabolismo primário de *P. guajava* cv. Pedro Sato ao longo do experimento: dia 0 (●), 30 dias (■) e 90 dias (▲) mantidas em ar ambiente (azul) e elevado CO₂ (vermelho). B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Os parâmetros que mais influenciaram a distribuição ao longo do eixo 1 foram os teores de nitrogênio em folhas e a biomassa seca de caules, folhas e biomassa total. Como já mencionado, o eixo 1 mostrou o posicionamento das amostras separando-as pelo tempo de exposição e, dessa forma, as biomassas refletem o desenvolvimento da planta ao longo do período de exposição, independente do tratamento. A influência dos teores de amido, analisados em todos os órgãos vegetais, também mostrou forte correlação com a distribuição das amostras ao longo desse eixo, consistente com os dados de quantificação, onde o teor de amido aumentou ao longo do desenvolvimento da planta. Entretanto, esta foi uma variável que também influenciou fortemente a distribuição das amostras ao longo do eixo 2, juntamente com os teores de carbono nas raízes e de açúcares solúveis em folhas. Como nesse eixo encontramos grupos formados pelos tratamentos, as correlações negativas dessas variáveis com esse eixo sugerem que as amostras posicionadas no lado positivo do eixo 2, as provenientes do tratamento ar ambiente, apresentam menores teores de carbono, amido e açúcares solúveis em folhas. Ao contrário, as amostras posicionados no lado negativo do eixo 2, as provenientes do tratamento de elevado CO₂, apresentam maiores teores de carbono, açúcares solúveis e amido nas folhas, condizente com os resultados encontrados para outras espécies submetidas a tratamento com elevado CO₂.

Interessantemente, uma variável que influencia fortemente o posicionamento das amostras ao longo do eixo 2, é a quantidade de amido em caules, com forte correlação positiva com esse eixo. Para esse parâmetro poderíamos sugerir que as goiabeiras submetidas ao elevado CO₂ não translocaram os açúcares produzidos nas folhas e não acumularam na forma de amido nos chamados órgãos drenos (caules e raízes), o que parece ter ocorrido nas goiabeiras mantidas em ar ambiente.

Os resultados dessa análise revelaram que o aumento da [CO₂] influencia a composição de metabólitos primários e, para a goiabeira, uma espécie de crescimento lento, parece haver consequente influência em seu desenvolvimento, embora as análises estatísticas não tenham revelado diferenças significativas entre os tratamentos quando as variáveis foram analisadas separadamente. Esse resultado sugere, ainda, que maiores períodos de fumigação possam revelar diferenças mais acentuadas na alocação de biomassa e recursos entre as mudas de goiabeira nos diferentes tratamentos.

Os resultados, em sua totalidade, mostram que *P. guajava* cv. Pedro Sato apresenta alterações nas quantidades de seus compostos relacionados à maior disponibilidade de carbono. Ocorreu acúmulo significativo de amido em tecido foliar, bem como aumento da razão C/N foliar, caulinar e total. As análises multivariadas sugerem que é válida a hipótese de que as mudas de

goiabeira crescidas sob elevado CO₂ diferem de mudas crescidas nas concentrações atuais de CO₂, isso no que diz respeito à biomassa seca, teores de amido, razão C/N e conteúdo de açúcares solúveis. Entretanto, *P. guajava* não apresentou incremento aparente como suposto por nossa hipótese. Para uma espécie arbórea de crescimento lento como a goiabeira, um maior tempo de exposição ao elevado CO₂ poderia confirmar as tendências de alterações encontradas neste trabalho.

4. BIBLIOGRAFIA

- Aidar, M.P.M.; Martinez, C.A.; Costa, A.C.; Costa, P.M.F.; Dietrich, S.M.C. & Buckeridge, M.S. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Biota Neotropica*, v. 2, n.1, p. 1-10, 2002.
- Ainsworth, E.A & Long, S.P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist*, v. 165, n. 2, p. 531-371, 2005.
- Amaral, L.I.V.; Gaspar, M.; Costa, P.M.F.; Aidar, M.P.M. & Buckeridge, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.
- Andrews, J.T. & Lorimer, G.H. Rubisco: structure, mechanisms and prospects improvement. *In*: Haleh, M.D. & Boardman, N.K. (Eds.) *Biochemistry of Plants*. Academic Press New York v.10, p. 132-207, 1987.
- Battle, M.; Bender, M.L.; Tans, P.P.; White, J.W.; Ellis, J.T.; Conway, T. & Francey, R.J. Global carbon sinks and their variability inferred from atmospheric O₂ and δ¹³C. *Science*, v. 287, p. 2467-70, 2000.
- Bernacchi, C.J.; Coleman, J.S.; Bazzaz, F.A. & McConnaughay, K.D.M. Biomass allocation in old-field annual species grown in elevated CO₂ environments: no evidence for optimal partitioning. *Global Change Biology*, v. 6, p. 855-863, 2000.
- Bonawitz, N.D. & Chapple, C. The Genetics of Lignin Biosynthesis: Connecting Genotype to Phenotype. *Annual Review of Genetics*, v. 44, p. 337-363, 2010.
- Buckeridge, M.S. *Biologia & Mudanças Climáticas no Brasil*. Rima Editora, São Carlos, 2008. 295p.
- Carpita, N. & McCann, M. Cell wall. *In* *Biochemistry & molecular biology of plants* (eds.) Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. American Society of Plant Physiologists, p. 52-108, 2000.
- Centritto, M.; Lee, H.S.J. & Jarvis, P.G. Increased growth in elevated [CO₂]: in early, short-term response? *Global Change Biology*, v. 5, p. 623-633, 1999.
- Cheng, S.H.; Moore, B.D. & Seemann, J.R. Effect on short and long term elevated CO₂ on the expression of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Plant Physiology*, v. 116, p. 715-723, 1998.

- Clark, D.A.; Piper, S.C.; Keeling, C.D. & Clark, D.B. Tropical rainforest tree growth and atmospheric carbon dynamics linked to interannual temperature variation between 1984–2000. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, v. 100, p. 5852-5857, 2003.
- Coley, P.D.; Bryant, J.P. & Chapin, F.S. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, v. 230, p. 895-899, 1985.
- Costa, P.M.F. Efeitos da alta concentração de CO₂ sobre o crescimento e o estabelecimento de plântulas do jatobá de mata *Hymenea courbaril* L. var. *Stilbocarpa* (Heyne) Lee & Langenhein (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). Dissertação de Mestrado: Universidade Estadual de Campinas, 2004, 75p.
- Cruz, J.A.; Avenson, T.J.; Kanazawa, A.; Takizawa, K.; Edwardsand G.E. & Kramer M. Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 411, p. 395-406, 2005.
- Curtis, P.S. & Wang, X. A meta-analysis of elevated CO₂ effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia*, v. 113, p. 299-313, 1998.
- Curtis, P.S. A meta-analysis of leaf gas exchange and nitrogen in trees grown under elevated carbon dioxide. *Plant Cell Environmental*, v. 19, p. 127-137, 1996.
- Curtis, P.S.; Zak, D.R.; Pregitzer, K.S. & Teeri, J.A. Above and belowground response of *Populus grandidentata* to elevated atmospheric CO₂ and soil N availability. *Plant Soil*, v. 165, p. 45-51, 1994.
- Davin, L.B.; Patten, A.M.; Joudes, M. & Lewis, N.G. Lignins: A twenty-first century challenge. In Himmel, M.E. Biomass Recalcitrance. Deconstructing the Plant Cell Wall for bioenergy. Blackwell Publishing, p. 213-287, 2008.
- Dawes, M.A.; Hättenschwiler, S.; Bebi, P.; Hagedorn, F.; Handa, I.T.; Körner C. & Rixen, C. Species-specific tree growth responses to 9 years of CO₂ enrichment at the alpine treeline. *Journal of Ecology*, v. 99, p. 383-394, 2011.
- den Hertog, J.; Stulen, I.; Fonseca, F. & Delea, P. Modulation of carbon and nitrogen allocation in *Urtica dioica* and *Plantago major* by elevated CO₂: impact of accumulation of nonstructural carbohydrates and ontogenetic drift. *Physiologia Plantarum*, v. 98, p. 77-88, 1996.
- Diner, B.A. & Babcock, G.T. Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in photosystem II. In: Ort DR, Yocum CF, eds. Oxygenic photosynthesis: the light reactions. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 213-247, 1996.
- Dixon, R.A. & Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, v. 7, p. 1085-1097, 1995.
- dos Santos, W.D.; Ferrarese, M.L.; Nakamura, C.V.; Mourão, K.M.S.; Mangolin, C.A. & Ferrarese-Filho, O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible model of action. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, p. 1230-1241, 2008.
- Feeley, K.J.; Wright, S.J.; Supardi, M.N.N.; Kassim, A.R. & Davies, S.J. Decelerating growth in tropical forest trees. *Ecology Letters*, v. 10, p. 461-469, 2007.

- Gerlach, D. 1984 Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3rded., Stuttgart, Georg Thieme.
- Godoy, J.R.L.; Marabesi, M.A.; Mortari, L.C.; Aidar, M.P.M. & Buckeridge, M.S. A dinâmica da floresta neotropical e as mudanças climáticas globais. *Naturália*, v. 32, p. 53-66, 2009.
- Haikio, E.; Makkonen, M.; Julkunen-Tiitto, R.; Sitte, J.; Freiwald, V.; Silfver, T.; Pandey, V.; Beuker, E.; Holopainen, T. & Oksanen, E. Performance and secondary chemistry of Ttwo hybrid Aspen (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) clones in long-term elevated ozone exposure. *Journal of Chemical Ecology*, v. 35, n. 6, p. 664-678, 2009.
- Hall, M.C.; Stiling, P.; Hungate, B.A.; Drake, B.G. & Hunter, M.D. Effects of elevated CO₂ and herbivore damage on litter quality in a scrub oak ecosystem. *Journal of Chemical Ecology*, v. 31, p. 2343-2356, 2005.
- Hartley, S.E.; Jones, C.G.; Couper, G.C. & Jones, T.H. Biosynthesis of plant phenolic compounds in elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology*, v. 6, p. 497-506, 2000.
- Hatfield, R.D.; Jung, H.G.; Ralph, J.; Buxton, D.R. & Weimer, P.J.A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 65, p. 51-58, 1994.
- Hättenschwiler, S. & Körner, C. Biomass allocation and canopy development in spruce model ecosystems under elevated CO₂ and increased N deposition. *Oecologia*, v. 113, p. 104-114, 1998.
- Hyvönen, R.; Agren, G.I. & Linder, S. The likely impact of elevated [CO₂], nitrogen deposition, increased temperature and management on carbon sequestration in temperate and boreal forest ecosystems: a literature review. *New Phytologist*, v. 171, p. 275-296, 2007.
- Inauen, N.; Körner, C. & Hiltbrunner, E. No growth stimulation by CO₂ enrichment in alpine glacier forefield plants. *Glob Change Biology*, v. 18, p. 985-999, 2012.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York, 523p.
- Kanowski, J. Effects of elevated CO₂ on the foliar chemistry of seedlings of two rainforest trees from Northeast Australia: Implications for folivorous marsupials. *Austral Ecology*, v. 26, p. 165-172, 2001.
- Keller, F. & Pharr, D.M. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources. Galactosyl-Sucrose. In: Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships. New York, Marcel Dekker, p. 157-184, 1996.
- Kirschbaum, M.U.F. Does Enhanced Photosynthesis Enhance Growth? Lessons Learned from CO₂ Enrichment Studies. *Plant Physiology*, v. 155, p. 117-124, 2011.
- Knaff, D.B. Ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes. In: Ort DR, Yocum CF, eds. Oxygenic photosynthesis: the light reactions. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, v. 333-361, 1996.
- Koike, T.; Tobita, H.; Shibata, T.; Matsuki, S.; Konno, K.; Kitao, M.; Yamashita, N. & Maruyama, Y. Defense characteristics of seral deciduous broad-leaved tree seedlings grown under differing levels of CO₂ and nitrogen. *Population Ecology*, v. 48, p. 23-29, 2006.

- Körner, C. Plant CO₂ responses: an issue of definition, time and resource supply. *New Phytologist*, v. 172, p. 393-411, 2006.
- Kubiske, M.E.; Pregitzer, K.S.; Zak, D.R. & Mikan, C.J. Growth and C allocation of *Populus tremuloides* genotypes in response to atmospheric CO₂ and soil N availability. *New Phytologist*, v. 140, p. 251-260, 1998.
- LeCain, D.R. & Morgan, J.A. Growth, gas exchange, leaf nitrogen and carbohydrate concentrations in NAD-ME and NADP-ME C₄ grasses grown in elevated CO₂. *Physiologia Plantarum*, v. 102, p. 297-306, 1998.
- Leegood, R.C.; Sharkey, T.D. & von Caemmerer, S. Introduction. In: Leegood, R. C.; Sharkey, T. & Caemmerer, S. Von (Eds.). *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, 2000. 624p.
- Lewis, D.H. Storage carbohydrates in vascular plants: distribution, physiology and metabolism. London, Cambridge University, 1984.
- Lillie, R.D. 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd ed., McGraw-Hill, New York, 501p.
- Luo, Y.; Su, B.O. & Currie, W.S. Progressive nitrogen limitation of ecosystem responses to rising atmospheric carbon dioxide. *BioScience*, v.54, p.731-739, 2004.
- Makino, A.; Harada, M.; Sato, T.; Nakano, H. & Mae, T. Growth and N allocation in rice plants under CO₂ enrichment. *Plant Physiology*, v.115, p. 199-203, 1997.
- Malkin R. PhotosystemI electron transfer reactions-components and kinetics. In: Ort DR, Yocum CF, eds. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. The Netherlands: Kluwer Academic Press, p. 313-332, 1996.
- Marabesi, M.A. Efeito do alto CO₂ no crescimento inicial e na fisiologia da fotossíntese em plântulas *Senna alata* (L.) Roxb. Dissertação de Mestrado Universidade de São Paulo, 2007, 70p.
- Martinez, C.A.; Oliveira, E.D.; Legracie, J.R. & Approbato, A. The effects of elevated CO₂ on tropical trees are related to successional status and soil nutritional conditions. *Photosynthesis. Energy from the Sun*, p 1380-1382, 2008.
- Massuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S. & Lee, Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, v. 339, n.1, p. 69-72, 2005.
- Matros, A.; Amme, S.; Kettig, B.; Buck-Sorlin, G.H.; Sonnewald, U. & Mock, H. Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with *potato virus Y*. *Plant, Cell and Environment*, v. 29 , p. 126-137, 2006.
- McCarty, R.E. An overview of the function, composition and structure of the chloroplast ATP synthase. In: Ort, D.R. & Yocum, C.F., eds. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, v. 439-451, 1996.
- McNeil, M.; Darvill, A.G.; Fry, S.C & Albersheim, P. Structure and function of the primary cell wall of plants. *Annual Review of Biochemistry*, v. 53, p. 625-663, 1984.

- Mitchell, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 41, p. 445-502, 1966.
- Mooney, H.A.; Canadell, J.; Chapin, F.S.; Ehleringer, J.R.; Körner, C.; McMurtie, R.E.; Arton, W.J.; Pitelka, L.F. & Schulze, E.D. Ecosystem physiology responses to global change. In: *The terrestrial biosphere and global change*. Cambridge University Press, Cambridge, 1999.
- Moura, J.C.M.S.; Bonine, C.A.V.; Viana, J.O.F.; Dornelas, M.C. & Mazzafera, P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 52, n. 4, p. 360-376, 2010.
- Norby, R.J. & Zak, D.R. Ecological lessons from free-air CO₂ enrichment (FACE) experiments. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, v. 42, p. 181-203, 2011.
- Norby, R.J.; Warren, J.M.; Iversen, C.M.; Medlyn, B.E. & McMurtrie, R.E. CO₂ enhancement of forest productivity constrained by limited nitrogen availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 107, p. 19368-19373, 2010.
- Nowak, R.S.; Ellsworth, D.S. & Smith, S.D. Functional responses of plants to elevated atmospheric CO₂ – do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? *New Phytologist*, v. 162, p. 253-280, 2004.
- Oksanen, E.; Ikonen, J.; Kaakinen, S.; Holopainen, T. & Vapaavuori, E. Structural characteristics and chemical composition of birch (*Betula pendula*) leaves are modified by increasing CO₂ and ozone. *Global Change Biology*, v. 11, p. 732-748, 2005.
- Oren, R.; Ellsworth, D.S.; Johnson, K.H.; Phillips, N.; Ewers, B.E.; Maiers, C.; Schaëfer, K.V.R; McCarthy, H.; Hendrey, G.; McNulty, A.G. & Katul, G.G. Soil fertility limits carbon sequestration by a forest ecosystem in a CO₂ enriched atmosphere. *Nature*, v. 411, p. 469-472, 2001.
- Penuelas, J. & Estiarte, M. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? *Tree*, v. 13, p. 20-24, 1998.
- Pokorný, R.; Tomášková, I.; Drápelová, I.; Kulhavý, J. & Marek, M. Long-term effects of CO₂ enrichment on bud phenology and shoot growth patterns of Norway spruce juvenile trees. *Journal of Forest Science*, v. 56, p. 251-257, 2010.
- Poorter, H. Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetation*, v. 104/105, p. 77-97, 1993.
- Poorter, H.; Berkel, V.; Baxter, R.; den Hertog, J.; Dijkstra, P.; Gifford, R.M.; Giffin, K.L.; Rounet, C.; Roy, J. & Wong, S.C. The effect of elevated carbon dioxide on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. *Plant, Cell and Environment*, v. 20, p. 472-482, 1997.
- Poorter, H. & Nagel, O. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 27, p. 595-607, 2000.

- Poorter, L. & Kitajima, K. Carbohydrate storage and light requirements of tropical moist and dry forest species. *Ecology*, v. 88, p. 1000-1011, 2007.
- Pritchard, S.G.; Rogers, H.H.; Prior, S.A. & Peterson, C.M. Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Global Change Biology*, v. 5, p. 807-837, 1999.
- Raven, P. H.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. *Biologia Vegetal*. ed. Guanabara Koogan, 1996. 728p.
- Read, J.J.; Morgan, J.A.; Chattertons, N.J. & Harrison, P.A. Gas exchange and carbohydrate and nitrogen concentrations in leaves of *Paspopyrum smithii* (C₃) and *Bouteloua gracilis* (C₄) at different carbon dioxide concentrations and temperatures. *Annals of Botany*, v. 79, p. 197-206, 1997.
- Reddy, A.R.; Rasineni, G.K. & Raghavendra, A.S. The impact of global elevated CO₂ concentration on photosynthesis and plant productivity. *Current Science*, v. 99, n. 1, p. 46-57, 2010.
- Rogers, A.; Allen, D.J.; Davey, P.A.; Morgan, P.B.; Ainsworth, E.A.; Bernachi, C.J.; Cornic, G.; Dermody, O.; Dohleman, F.G.; Heaton, E.A.; Mahoney, J.; Zhu, X-G.; Delucia, E.H.; Ort, D.R. & Long, S.P. Leaf photosynthesis and carbohydrate dynamics of soybeans grown throughout their life-cycle under Free-Air Carbon dioxide Enrichment. *Plant, Cell and Environment*, v. 27, p. 449-458, 2004.
- Rogers, L.A. & Campbell, M.M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytologist*, v. 164, p. 17-30, 2004.
- Sacksteder, C.A.; Kanazawa, A.; Jacoby, M.E. & Kramer, D.M. The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: a proton-pumping Q-cycle is continuously engaged. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 97, p. 14283-14288, 2000.
- Saxe, H.; Ellsworth, D.S. & Heath, J. Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytologist*, v. 139, p. 395-436, 1998.
- Sharkey, T.D. Photosynthesis in intact leaves of C₃ plants: physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review*, v. 51, p. 53-105, 1985.
- Sigurdsson, B.D.; Thorgeirsson, H. & Linder, S. Growth and dry-matter partitioning of young *Populus trichocarpa* trees during three years of elevated CO₂ and fertilization. *Tree Physiology*, v. 21, p. 941-950, 2001.
- Souza, A.P.; Arundale, R.A.; Dohleman, F.G.; Long, S.P. & Buckeridge, M.S. Will the exceptional productivity of *Miscanthus x giganteus* increase further under rising atmospheric CO₂? *Agricultural and Forest Meteorology*, v. 171, p. 82-92, 2013.
- Stitt, M. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment*, v. 14, p. 395-436, 1991.
- Taiz, L. & Zeiger, E. *Plant Physiology*. 5ª edição, editora Artmed, 2010, 782p.
- Vance, C.P.; Kirk, T.K. & Sherwood, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 18, p. 259-88, 1980.

- Wand, S.J.E.; Midgley, G.F.; Jones, M.H. & Curtis, P.S. Responses of wild C₄ and C₃ grass (Poaceae) species to elevated atmospheric CO₂ concentration: a metaanalytic test of current theories and perceptions. *Global Change Biology*, v. 5, p. 723-741, 1999.
- Wang, D.; Heckathorn, S.A.; Wang, X. & Philpott, S.M. A meta-analysis of plant physiological and growth responses to temperature and elevated CO₂. *Oecologia*, v. 169, p. 1-13, 2012.
- Ward, J.K. & Strain, B.R. Elevated CO₂ studies: past, present and future. *Tree Physiology*, v. 19, p. 211-220, 1999.
- Way, D.A. & Oren R. Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. *Tree Physiology*, v. 30, p. 669-688, 2010.
- Wolfe, D.W., Gifford, R.M., Hilbert, D. & Luo, Y. Integration of photosynthetic acclimation to CO₂ at the whole-plant level. *Global Change Biology*, v. 4, p. 879-893, 1998.

Capítulo 3-Defesas Antioxidantes em resposta ao elevado CO₂

1- INTRODUÇÃO

O estresse é, na maioria das definições, considerado como um desvio significativo das condições ótimas para a vida, e induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes (Larcher, 2006). Uma característica comum observada entre todos os estresses abióticos é o desencadeamento de um estresse oxidativo, que é referido como uma perturbação no balanço pró-oxidante-antioxidante com predomínio de pró-oxidantes, levando a danos celulares (Sies, 1993; Levine *et al.*, 1998; Monaghan *et al.*, 2009). As causas podem ser diversas como: luz intensa, calor ou frio excessivo, metais pesados, herbicidas, seca, poluentes atmosféricos, envelhecimento, entre outras.

Além desses fatores exógenos, processos endógenos levam à situação de estresse oxidativo. O oxigênio, por exemplo, é um gás tóxico e mutagênico fundamental para a existência de todos os organismos aeróbicos. Desde a introdução de oxigênio molecular (O₂) na atmosfera, pelo surgimento e evolução de organismos fotossintetizantes (há cerca de 2.7 bilhões de anos), espécies reativas de oxigênio (ERO) têm sido companheiras indesejáveis da vida aeróbica (Halliwell, 2006).

As ERO incluem os radicais livres, que possuem pelo menos um elétron desemparelhado, sendo bastante instáveis e promovendo transferências eletrônicas rápidas, e os não radicais, intermediários instáveis, que derivam do oxigênio molecular. Como radicais podem ser citados o ânion superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila (OH[•]), o peroxila (LOO[•]) e o dióxido de carbono (CO₂^{•-}). Como não radicais, podemos citar o peroxinitrito (ONOO⁻), o ácido hipocloroso (HOCl), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o oxigênio singlete (¹O₂) e o ozônio (O₃), que, apesar de não serem radicais livres, podem induzir reações radicalares no organismo, sendo, por isso, também considerados como espécies reativas de oxigênio (Porter, 1984; Benzie, 1996; Patel, 1999; Halliwell, 2006). É importante ressaltar que as ERO não são as únicas espécies reativas que afetam os sistemas biológicos, há também as espécies reativas de nitrogênio (ERN), de cloro (ERC) e de bromo (ERB). Todas essas moléculas são reativas, mas a reatividade pode atuar em diferentes graus, de acordo com o potencial redutor (V) que cada molécula apresentará. Quanto mais positivo for V, maior será a tendência de a estrutura ser reduzida, recebendo um e⁻ e atuando como um agente oxidante. Moléculas que reagem muito rápido apresentam alto V (por exemplo, o OH[•] reage mais rápido que o H₂O₂ e O₂^{•-}; V= 2,31; 0,32 e 0,94 respectivamente) (Halliwell, 2006; Monaghan, 2009).

As ERO ocorrem naturalmente no processo de fotossíntese (Foyer & Noctor, 2003); à medida que a cadeia de transporte de elétrons opera em um ambiente aeróbico torna-se um facilitador para o surgimento dessas espécies. Como uma forma de reduzir os danos causados por essas substâncias altamente reativas, as plantas apresentam diversos mecanismos antioxidantes. Para que haja um equilíbrio entre a produção e inativação de ERO nos cloroplastos, é necessária a presença de um sistema delicado e estritamente controlado.

Ácido Ascórbico (AA) e Glutathione (GSH) são os mais abundantes e melhor caracterizados antioxidantes hidrossolúveis (Foyer & Shigeoka, 2011). Acumulam-se em concentrações na ordem de milimolar (mM) e, embora sejam capazes de agir separadamente, juntos funcionam de forma mais eficaz. Atuam em conjunto no conhecido ciclo ascorbato/glutathione (AA/GSH) (Foyer & Halliwell, 1976) e no ciclo da água (Asada, 1999) para metabolizar H_2O_2 e dissipar o excesso de energia de excitação nos cloroplastos. Outra importante função é a sinalização do estresse feita por esses compostos, tanto no simplasto como também no apoplasto (Tausz-Posch *et al.*, 2013).

O ciclo AA/GSH apresenta características hidrofílicas e opera em grande parte dentro do estroma, mas também está relacionado com a regeneração de α -tocoferol (TOC), um antioxidante hidrofóbico. Tocoferóis e carotenoides são os grupos mais abundantes de antioxidantes lipossolúveis nos cloroplastos (DellaPenna & Pogson, 2006). TOC é acumulado a concentrações elevadas nos cloroplastos, onde atua impedindo a peroxidação lipídica pela remoção de oxigênio singlete e radicais peroxila (Krieger-Liszkay & Trebst, 2006).

Os fatores que controlam a compartimentalização intracelular de metabolitos na célula e os sistemas de transporte de antioxidantes são de particular importância para a regulação global da fotossíntese e a sua operação efetiva numa larga gama de condições ambientais. Embora nos últimos anos têm-se testemunhado um aumento na nossa compreensão dos papéis de ERO nos sistemas de sinalização que coordenam a expressão do gene antioxidante, poucas são as informações disponíveis, até o momento, sobre a forma como o baixo peso molecular dos antioxidantes participa desse controle (Foyer & Noctor, 2011).

Outra importante classe de substâncias que auxilia na defesa antioxidante em plantas é a das substâncias fenólicas. Os efeitos protetores em sistemas biológicos são atribuídos a sua capacidade de transferir elétrons para radicais livres, quelar metais de transição (Ferrali *et al.*, 1997), ativar enzimas antioxidantes (Elliott *et al.*, 1992), reduzir radicais de α -tocoferol (Hirano *et al.*, 2001), e inibir oxidases (Cos *et al.*, 1998).

Essas substâncias são oriundas, em sua grande maioria, da via do ácido chiquímico, este é o precursor dos aminoácidos aromáticos (AAA) tirosina, triptofano e fenilalanina (figura 3.1). A

fenilalanina é o principal AAA precursor de substâncias fenólicas (Maeda & Dudavera, 2012; Hichri *et al.*, 2011), no entanto, em algumas espécies vegetais, pequenas quantidades de fenilpropanoides podem ser formadas através da tirosina (Razal *et al.*, 1996). Entre os três AAA o maior fluxo de carbono é direcionado para fenilalanina, em algumas espécies vegetais as substâncias derivadas desse aminoácido podem constituir mais de 30% da matéria orgânica (Weiss 1986; Razal *et al.*, 1996; Prabhu & Hudson, 2010).

O termo substâncias fenólicas engloba um número grande e bem diversificado de compostos (Vermeris & Nicholson, 2006), e muitos deles apresentam atividades antioxidantes, como será mencionado a seguir. A eritrose 4-fosfato e o fosfoenolpiruvato são intermediários glicolíticos que se unem e sofrem reações que levam a formação do ácido 3-dehidrochiquímico que formará as estruturas C₆-C₁.

Um exemplo é o ácido gálico que originará a classe dos taninos hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis são polímeros de ácido gálico e elágico (dímero de ácido gálico) esterificados com açúcares, são substâncias adstringentes (precipitam proteínas transformando-as em derivados insolúveis), e essa propriedade é muito importante na proteção contra herbivoria, uma vez que torna o material vegetal pouco palatável e com menor valor nutricional.

O ácido 3-dehidrochiquímico formará o ácido chiquímico que sofrerá diversas reações para sintetizar os AAA. A fenilalanina, quando desaminada, origina o ácido cinâmico, o primeiro fenilpropanoide (C₆-C₃) formado. Os fenilpropanoides subsequentes podem sofrer diversas alterações mediadas por enzimas que levarão a formação de outras classes de substâncias fenólicas, como as lignanas e ligninas, por exemplo (Vermeris & Nicholson, 2006; Dewick, 2009; Maeda & Dudavera, 2012).

Para a síntese de flavonoides, substâncias com 15 átomos de carbono, são combinados esqueletos carbônicos provenientes de duas vias: a via do chiquimato e a do malonato, assim dizemos: biossíntese mista (ver figura 3.1). Na figura 3.1 podemos observar que após a fenilalanina ser desaminada, hidroxilada e ligada a uma coenzima-A (CoA), uma molécula de coumaroil-CoA é formada. Essa estrutura liga-se a 3 unidades de malonil-CoA, levando, após algumas reações, a formação de uma chalcona, primeira classe de flavonoides formada e, que isomeriza-se em uma flavanona. Dessa forma, flavonoides são substâncias que possuem, em geral, um esqueleto C₆-C₃-C₆, C₆-C₃ proveniente do chiquimato, ligados a um anel C₆ que vem do malonato (Harborne & Williams, 2000; Marais *et al.*, 2006).

Figura 3.1- Esquema da via de síntese de substâncias fenólicas com as principais substâncias formadas e enzimas que atuam na síntese desses compostos.

Essa estrutura básica de 15 carbonos pode ter pequenas variações que levam a formação das diversas classes de flavonoides. Por exemplo, uma flavanona tem o anel B (fig. 3.2) ligado ao carbono 2 enquanto que as isoflavonas tem o anel B ligado à posição 3. Algumas classes como as isoflavonas são restritas à poucas famílias de plantas. Flavonas e flavonóis são muito semelhantes entre si, tendo como única diferença a presença do grupo hidroxila (OH) na posição 3 nos flavonóis. As proantocianidinas (PAS, ou taninos condensados) formadas pelo ramo terminal da via

dos flavonoides apresentam as mesmas propriedades dos taninos hidrolisáveis, apesar de serem polímeros de catequinas (Vermerris & Nicholson, 2006; Maeda & Dudavera, 2012).

Figura 3.2- Esqueleto básico de um flavonoide.

Os processos biossintéticos que levam a formação da fenilalanina ocorrem nos plastídios e a síntese dos fenilpropanoides e flavonoides prossegue na parte citossólica do retículo endoplasmático, sendo que essas substâncias são então armazenadas nos vacúolos (Zhao & Dixon, 2009). Elas também podem ser encontradas em outros compartimentos celulares como parede celular, núcleo, cloroplastos e até mesmo no espaço extracelular dependendo da espécie, do tecido ou do estágio de desenvolvimento da planta (Hutzler *et al.*, 1998; Kuras *et al.*, 1999; Feucht *et al.*, 2004; Gagné *et al.*, 2006; Zhao & Dixon, 2009). Os flavonoides são sintetizados principalmente no citosol, em complexos multienzimáticos ligados às membranas do retículo endoplasmático (RE), e de lá são transportados para seus destinos subcelulares (Hrazdina & Wagner, 1985).

Em muitos casos, tem sido observada uma correlação temporal entre a acumulação de flavonoides e o estresse oxidativo (Kirakosyan *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2004). No entanto, poucos são os trabalhos que correlacionam o tempo de estresse oxidativo com produtos da oxidação de flavonoides (Hernández *et al.*, 2009).

De acordo com o local em que o flavonoide for encontrado ele pode exercer uma função diferente. Nos cloroplastos, por exemplo, ocorre a formação de grandes quantidades de H₂O₂, devido à dismutação de O₂ nos tecidos fotossintetizantes (Mehler, 1951). Estão presentes flavonoides glicosilados que são oxidados pela oxidação do fotossistema II e assim atrasam a peroxidação das membranas do tilacoide quando há luz.

Estudos mostram que há uma correlação negativa entre a presença desses flavonoides com a do O₂ singleto (Agati *et al.*, 2007) e assim, possivelmente, esses flavonoides funcionariam como

uma maquinaria antioxidante no cloroplasto. Esse mecanismo também seria responsável pela ativação de outros substratos antioxidantes como ascorbato, que desencadeia a formação de enzimas pelo ciclo ascorbato-glutationa. Dessa forma, acredita-se que os flavonóis sejam o grupo de flavonoides com maior ação antioxidante *in planta* (Hernández *et al.*, 2009).

A presença de flavonóis, flavanas-3-óis e chalconas no núcleo é indiretamente relacionada com uma proteção antioxidante (Feucht *et al.*, 2004). Essas substâncias apresentam, no núcleo, importante ação na proteção do DNA, com redução do dano oxidativo pela ação quelante de metais de transição e dissipação de UV (Melidou *et al.*, 2005; Polster *et al.*, 2006).

Proantocianidinas são armazenadas no vacúolo junto com outros flavonoides e apresentam importante papel na dissipação de energia, pigmentação e fotoproteção. O processo de polimerização dessas estruturas ainda não é muito claro. Os blocos construtores de PAS são flavanas-3-óis. Estas podem exercer a sua função contra H_2O_2 e outras ERO, obtendo-se a oxidação dessas substâncias antes de serem transportadas para o vacúolo. A polimerização de PAS é de fato um mecanismo de ação antioxidante, mas pode ser menos importante para fisiologia vegetal do que outros mecanismos antioxidantes (Hernández *et al.*, 2009).

Grace & Logan (2000) sugerem que a via dos fenilpropanoides gera diversos compostos com função desconhecida, como o ácido clorogênico, que deve agir como uma válvula de escape para o excesso de energia de excitação, assim como uma fonte de fluxo de antioxidantes de baixo peso molecular, que por sua vez representam um mecanismo de dissipação da energia. Hernández & van Breusegem (2010) propõem que os flavonoides devem desempenhar um papel de válvulas de escape de energia, adicionalmente a outras funções já bem conhecidas como dissuasores de herbivoria, absorção de raios UV, pigmentos florais, dentre outros.

Vanderauwera *et al.* (2005) avaliaram a expressão de 19 genes relacionados com a síntese de flavonoides sob diferentes tipos de estresse e observaram que os genes relacionados à síntese de fenóis são super expressados quando há períodos de estresse abiótico. Esse estudo corrobora a ideia de que a via como um todo é coordenadamente regulada para atuar como um dissipador de fotoassimilados sob condições desfavoráveis de crescimento (Hernández & van Breusegem, 2010). Dessa forma, especula-se que esses compostos possam agir como sinalizadores de estresse.

Além das substâncias fenólicas, algumas substâncias nitrogenadas como as poliaminas vêm sendo relatadas como sinalizadoras de respostas aos estresses bióticos e abióticos (Bais & Ravishankar, 2002; Silveira *et al.*, 2004; Kuznetsov *et al.*, 2006; Tun *et al.*, 2006). O papel de poliaminas (PA) e do óxido nítrico (NO) parece estar relacionado à regulação metabólica, desempenhando importantes funções em diferentes processos do desenvolvimento de plantas

(Silveira *et al.*, 2004; Tun *et al.*, 2006). PA encontram-se em altas concentrações intracelulares, variando de centenas de µM a poucos mM. Em plantas, duas vias de síntese, que tem como precursor o aminoácido L-arginina, já foram descritas (Brassard *et al.*, 2010).

O modo de ação de poliaminas durante o estresse abiótico ainda é pouco compreendido, mas sabe-se que ativam enzimas antioxidantes, aumentam a síntese de carotenoides e atuam na regulação do limite de peroxidação lipídica (Verma & Mishra, 2005). Também foi relatado que auxiliam na tolerância a metais pesados, protegendo as enzimas glutathione redutase e superóxido dismutase (Groppa *et al.*, 2001).

Elevadas [CO₂] podem evitar a formação de ERO por propiciarem uma maior taxa de transporte de elétrons, devido ao maior direcionamento de elétrons para fixação do carbono e pouca quantidade de escape canalizada para formação de ERO (Asada, 1999). Essa redução na formação de espécies reativas pode reduzir a necessidade de defesas antioxidantes (Badiani *et al.*, 1998; Di Toppi *et al.*, 2002). Estudos prévios que avaliaram o estresse oxidativo e respostas de defesas antioxidantes em condições de elevado CO₂, comparando sempre com plantas crescidas em [CO₂] ambientes, mostraram redução do estresse foto-oxidativo (Aranjuelo *et al.*, 2008), e significativa redução das concentrações de ácido ascórbico e glutathione (Robinson & Sicher, 2004; Aranjuelo *et al.*, 2008; Gillespie *et al.*, 2011). No entanto, alguns trabalhos contrastantes foram reportados, indicando que o crescimento sob elevado CO₂ pode aumentar o nível de estresse oxidativo (Rao & De Kok, 1994; Badiani *et al.*, 1998; Di Toppi *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2010).

O principal objetivo deste estudo foi avaliar se uma atmosfera enriquecida com CO₂ pode funcionar como uma situação de estresse para a goiabeira (*P. guajava* cv. Pedro Sato), ou não. Nesse sentido, este estudo tentou compreender se essa situação altera o perfil quantitativo de defesas antioxidantes e de sinalizadores de estresse. Para tanto foram realizadas análises quantitativas de substâncias fenólicas, ácido ascórbico, glutathione e poliaminas a fim de se verificar o potencial redox dessa espécie frente à presença de elevada [CO₂] atmosférico. Este capítulo abordará como algumas substâncias antioxidantes presentes na goiabeira são afetadas na presença de atmosfera enriquecida com CO₂.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ciclo AA/GSH

2.1.1- Ácido Ascórbico (AA), dehidroascórbico (DHA) e total (AAtot) (Dias *et al.*, 2011)

Exatamente cerca de 0,250 g de folhas congeladas (-80°C) foram trituradas com solução de extração (ácido metafosfórico - HPO_3 , EDTA sódico e água ultrapura) em banho de gelo. O extrato era homogeneizado em vórtex e centrifugado por 10 min a 14.000 g a 2°C. O sobrenadante era recolhido e utilizado para as dosagens de AA (na forma reduzida) e AAtot (AA+DHA). Para análise de AA prosseguiu-se com diluição do extrato em água (1:4), seguida de filtragem em unidade filtrante (membrana durapore 0,45U de poro - Milex) e injeção de 20 μL em CLAE. Para análise de AAtot 1 mL da amostra era acrescido de 200 μL de DTT (ditiotreitól - 0,2%) e 100 μL de K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibásico - 45%), agitava-se no vórtex e o material permanecia no escuro por 20 min à temperatura ambiente. Ao fim dos 20 min acrescentavam-se 200 μL de H_3PO_4 (ácido ortofosfórico- 2M) e 3,5 mL de água ultrapura para a diluição utilizada anteriormente (1:4). Era realizada filtragem em Milex e injeção de 20 μL em CLAE.

Para as análises por CLAE (coluna Zorbax SB – C18 de 150 X 4,6 mm, 5 μm - Agilent) utilizou-se um gradiente isocrático de H_3PO_4 (pH 2.3) por 4min, com detector de arranjo de diodo (DAD) a 245 nm e injeção de 20 μL . Os resultados obtidos foram comparados com curva padrão de ácido ascórbico reduzido (10 a 18 mg.mL^{-1}) e expressos em mg.mL^{-1} . Valores de dehidroascorbato (DHA) foram obtidos pela fórmula: $\text{AAtot} = \text{AA} + \text{DHA}$.

2.1.2- Glutathiona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e total (Gtot) (Israr *et al.*, 2006)

Nas extrações de glutathiona utilizou-se exatamente cerca de 0,250 g de tecido vegetal de folhas congelados (-80°C). O material foi triturado em nitrogênio líquido e macerado duas vezes em banho de gelo com 0,7 mL de solução de ácido sulfosalicílico 0,1%. O extrato foi centrifugado a 15.000 g à 4°C por 20 min e recolhido o sobrenadante. As dosagens foram realizadas por leitor de microplacas do tipo ELISA, a 412 nm. Para GSH foram depositados, em cada poço, 25 μL do extrato (utilizou-se a solução de extração como controle negativo), 175 μL de EDTA e 100 μL de DTNB, agitando por 5 minutos em vórtex na presença de luz; as pipetagens e a leitura eram realizadas no escuro. Para análise Gtot foram adicionados, em cada poço, 10 μL de NADPH e 0,5 μL da enzima glutathiona redutase; após 20 min na luz era realizada a leitura no escuro. As quantificações foram realizadas por comparação com curva padrão de glutathiona reduzida (3 a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e expressos em mg.mL^{-1} . Os valores de glutathiona oxidada (GSSG) foram obtidos pela fórmula: $\text{Gtot} = \text{GSH} + \text{GSSG}$.

2.2 Substâncias Fenólicas (modificado de Watanabe *et al.*, 2011)

Foi realizada uma extração de exatamente cerca de 0,100 g de material vegetal de raízes, caules e folhas em 15 mL de MeOH 80% durante 1h em banho seco à 70°C. O material foi filtrado e o volume ajustado para 25 mL. Esse extrato foi utilizado para análises em espectrofotômetro UV-visível para a quantificação de: taninos totais, proantocianidinas, fenóis totais e flavonoides totais. O extrato também foi utilizado para a análise da composição de flavonas e flavonóis via CLAE-DAD. Apenas os extratos de folhas tiveram os compostos majoritários quantificados via CLAE-DAD através de comparação com curva padrão.

2.2.1- Taninos Totais (modificado de Watanabe *et al.*, 2011)

Foram misturados 500 µL do extrato com 1 mL de albumina de soro bovino (BSA); após 10 min, o extrato foi centrifugado à 11000 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 2 mL da solução detergente de dodecilsulfato de sódio (SDS), a homogeneização foi realizada com auxílio de vórtex e 0,5 mL de cloreto férrico 0,01M foram adicionados à mistura. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 520 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de ácido tânico (100 a 285 µg.mL⁻¹) e expressos em mg.mL⁻¹.

2.2.2- Proantocianidinas (modificado de Watanabe *et al.*, 2011)

Adicionaram-se 1,5 mL do reagente de butanol (sulfato ferroso heptahidratado e HCl concentrado) a 100 µL do extrato; a homogeneização foi realizada em vórtex. A amostra foi aquecida a 95° C por 1 h; o material era resfriado e analisado em espectrofotômetro a 550 nm. Os valores foram comparados com curva padrão de tanino quebracho (300 µg a 3 mg.mL⁻¹) e expressos em mg.mL⁻¹.

2.2.3- Fenóis Totais (modificado de Watanabe *et al.*, 2011)

Uma alíquota de 100 µL do extrato foi misturada com 3,9 mL de água destilada, 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 0,75 mL da solução de carbonato de sódio saturada. Após duas horas a reação foi analisada em espectrofotômetro em 760 nm. Os resultados foram comparados com curva padrão de ácido *p*-cumárico (100 a 700 µg. mL⁻¹) e expressos em mg.mL⁻¹.

2.2.4- Flavonoides Totais UV (modificado de Watanabe *et al.*, 2011)

Ao extrato (500 µL) foram adicionados 500 µL da solução de cloreto de alumínio 5%, e após 15 minutos a reação foi analisada em espectrofotômetro em 420 nm. Os resultados foram comparados com curva padrão de rutina (3 a 120 µg. mL⁻¹) e expressos em mg.mL⁻¹.

2.2.5- Flavonas/Flavonóis CLAE (modificado de Furlan *et al.*, 2010)

Os extratos foram filtrados em unidade filtrante (membrana durapore 0,45U de poro - Millex) e analisados via CLAE (utilizando-se coluna Zorbax SB – C18 (250 X 4,6 mm, 3,5 μ m - Agilent), segundo o gradiente de solventes: 15% de B (0-20 minutos); 15-100% de B (20-25 minutos), 100% de B (25-30 minutos), 100-15% de B (30-32 minutos) e 15% de B (32-35 minutos); A: ácido acético 0,1% e B: acetonitrila. Variação do fluxo: 1,5 mL.min⁻¹ (0-25,1 minutos), 1 mL.min⁻¹ (25,2-26,9 minutos) e 1,5mL⁻¹min (27-35 minutos), injeção de 3 μ L com uso de célula de fluxo de caminho óptico de 60 nm. A detecção foi feita através de detector de arranjo de diodo (DAD) sendo monitorados em 352 nm. Os resultados foram quantificados através de curvas padrão de quercetina (Sigma Q4951), quercitrina (Sigma Q3001) e rutina (Sigma R5143) (1,5 a 60 μ g. mL⁻¹) e expressos em mg.mL⁻¹.

2.2.6- Antocianinas (American Herbal Pharmacopoeia, 2008)

Foram utilizados 0,250 g de folhas congeladas (-80°C) e trituradas em nitrogênio líquido. Ao triturado, foram acrescentados 10 mL de HCl (ácido clorídrico 0,2% em MeOH); o material foi filtrado e centrifugado a 11000 g por 10 minutos para posterior análise em espectrofotômetro a 528 nm. A porcentagem de antocianinas foi calculada pela fórmula: $[(A \times V) / (772 \times m)] \times 100$; sendo A: Absorbância da amostra em 528 nm; V: volume final da leitura; M: massa da amostra (g); 772: absorbância específica da cianidina-3-glicosídeo.

2.2.7- Secções anatômicas

As análises anatômicas foram realizadas pelo Prof. Diego Demarco do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica (IBUSP). As folhas foram fixadas em FAA (Johansen, 1940) por 24 h, em FNT (formalina neutra tamponada em tampão fosfato de sódio pH 7,0) (Lillie, 1965) e em sulfato ferroso em formalina (Johansen, 1940) por 48 h e estocadas em etanol 70%.

A porção mediana da lâmina foliar de todos os materiais foi isolada, desidratada em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen, 1940), incluída em parafina e seccionada transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo. Secções com 10 a 18 μ m de espessura foram obtidas e coradas com azul de astra e safranina (Gerlach, 1984) para análise estrutural e substâncias fenólicas e com sulfato ferroso em formalina específico para substâncias fenólicas. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DMLB com câmera digital acoplada.

2.3 Poliaminas solúveis (Silveira et al. ,2004)

Foram triturados exatamente cerca de 0,200 g de amostras de folhas congeladas (-80°C) por duas vezes com 0,7 mL de ácido perclórico 5% (HClO₄). Após 1h, os extratos foram centrifugados por 20 min a 20.000 g a 4°C, recolhendo-se o sobrenadante e acrescentando 0,2 mL de HClO₄ 5%, repetindo o processo mais uma vez para totalizar 1,6 mL de HClO₄. As PA livres foram determinadas diretamente pelo sobrenadante, enquanto as totais foram extraídas por hidrólise de 200 µL do sobrenadante com 200 µL de HCL 12N por 19h a 100°C. As amostras foram secas em nitrogênio e, em seguida, solubilizadas em 200 µL de HClO₄ (5%). PA livres e totais foram derivadas com cloreto de dansila (1,8 mM) e identificadas por CLAE (utilizando-se coluna Shimadzu Shinpack ODS CLC – C18, 250 X 4,6, 5µm) utilizando amostras autênticas. O gradiente utilizado foi: 0-11 min 65% de A em B, 11-25 min 65-100% de A em B, 25-35 min 100% de A, sendo A acetonitrila e B acetonitrila 10% em água. A detecção foi realizada por detector de fluorescência a 340 nm de excitação e 510 nm de emissão. As áreas foram comparadas com curvas padrão de putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (1 a 50 nmol) e expressos em mg.mL⁻¹. As poliaminas conjugadas foram determinadas por: PA_{tot} = PA livres + PA conjugadas.

2.4- Análises estatísticas

Foram realizadas análises utilizando o programa STATISTICA (versão 12) para verificar se a distribuição dos dados era normal. Em seguida, foi confeccionado um gráfico do tipo *box-plot* para verificar a presença de extremos e *outliers*. Esses foram retirados da análise para realização de ANOVA seguida de teste Tukey. Para a análise ANOVA considerou-se o tratamento (elevado CO₂) e a coleta (tempo de exposição em dias), realizando-se uma análise *Two-Way* para verificar a interação desses fatores. Também foram realizadas análises multivariadas de componente principal (PCA) para verificar a correlação entre as variáveis analisadas, assim como influenciam na distribuição das amostras. Para essas análises não foram retirados os *outliers* e matrizes de correlação foram utilizadas como forma de uniformizar a ordem de grandeza dos dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ciclo AA/GSH

Não foram verificadas diferenças significativas nos resultados obtidos de teores de ácido ascórbico e glutatona, nem entre os tratamentos, nem ao longo do desenvolvimento das mudas no período de 90 dias (fig. 3.3 e 3.4). Para ambas as substâncias, foram encontradas menores quantidades da forma oxidada (DHA e GSSG) e quantidades mais elevadas da forma reduzida (AA ~ 1,8 mg.g⁻¹ mf e GSH ~ 8 mg.g⁻¹ mf). Como a forma reduzida é a doadora de elétrons para ERO, supõe-se que há substrato disponível para inativar substâncias reativas.

Figura 3.3- Teores (mg.g⁻¹ MF) de ácido ascórbico reduzido (A), oxidado (B) e total (C) ao longo dos 90 dias de exposição. ■- elevado CO₂, ◆- Ar ambiente.

Figura 3.4- Teores (mg.g⁻¹ MF) de glutatona reduzido (A), oxidado (B) e total (C) ao longo dos 90 dias de exposição. ■- elevado CO₂, ◆- Ar ambiente.

Os teores da forma reduzida em relação ao total indicam o estado de redução/oxidação da planta (Dias *et al.*, 2011; Dafré-Martinelli *et al.*, 2011). Essa razão, quanto mais próxima de 1, maiores são as quantidades de AA ou GSH na forma reduzida, ou seja, a forma doadora de elétrons. Isso indica que a planta está com substrato para sequestrar radicais e que o balanço do estado redox está eficiente. A figura 3.5 mostra que o estado de redução/oxidação da goiabeira não sofreu alterações significativas ao longo do experimento, quando avaliada por esse parâmetro. Pela razão entre os teores da forma reduzida em relação ao total, podemos verificar que a situação de elevado CO₂ não influenciou o balanço redox em *P. guajava* (fig. 3.5).

Figura 3.5- Estado redox da *Psidium guajava* medido pela razão GSH/Gtot - glutathiona (A) e AA/AAtot - ácido ascórbico (B). ■- elevado CO₂, ◆- Ar ambiente.

Elevadas [CO₂] podem evitar a formação de ERO por propiciarem uma maior taxa de transporte de elétrons, devido ao maior direcionamento de elétrons para fixação do carbono e pouca quantidade de escape canalizada para formação de ERO (Asada, 1999). Essa redução na formação de espécies reativas pode reduzir a necessidade de defesas antioxidantes (Badiani *et al.*, 1998; Di Toppi *et al.*, 2002). Estudos prévios que avaliaram o estresse oxidativo e respostas de defesas antioxidantes em condições de elevado CO₂, comparando sempre com plantas crescidas em [CO₂] ambientes, mostraram redução do estresse foto-oxidativo (Aranjuelo *et al.*, 2008), e significativa redução das concentrações de ácido ascórbico e glutathiona (Robinson & Sicher, 2004; Aranjuelo *et al.*, 2008; Gillespie *et al.*, 2011). No entanto, alguns trabalhos contrastantes foram reportados, indicando que o crescimento sob elevado CO₂ pode aumentar o nível de estresse oxidativo (Rao & De Kok, 1994; Qiu *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2010).

Esses antioxidantes são cruciais para manter a quantidade de ERO sob controle, e o aumento dessas defesas antioxidantes é importantíssimo para a tolerância ao estresse (Foyer & Noctor, 2011). Diversos trabalhos relataram aumento das concentrações dessas substâncias em situações de estresse que estimularam a produção de ERO, como resposta ao ozônio (Gillespie *et al.*, 2011),

ao estresse hídrico (Sircelj *et al.*, 2005), ou forte irradiância (Posch *et al.*, 2008). Alterações nas quantidades das formas oxidadas (DHA e GSSG) podem estar envolvidas na sinalização redox de respostas ao estresse em tecidos vegetais (Foyer & Noctor, 2011). Por outro lado, se a produção de ROS é mais baixa, a produção de antioxidantes deve ser reduzida também, o que poderia explicar a redução da capacidade antioxidante sob elevado CO₂ (Robinson & Sicher, 2004; Aranjuelo *et al.*, 2008; Gillespie *et al.*, 2011; Tausz-Posch *et al.*, 2013).

Moraes *et al.* (2002) estudaram duas espécies de *Psidium* utilizando o biomonitoramento ativo na região da Serra do Mar e Cubatão. *P. guajava* não apresentou alterações no teor de AAtot na área mais poluída de Cubatão por material particulado, enxofre e fluoretos, mas apresentou diferenças significativas nos teores de AAtotal nas áreas de exposição com maiores concentrações de ozônio. Esse resultado sugere que esse antioxidante não é acionado por essa espécie em situações de estresse que não envolvam um *burst* oxidativo. Para os teores de tióis solúveis (que corresponderiam à glutathione total), essa espécie apresentou diminuição significativa de glutathione total nas áreas poluídas tanto por ozônio, quanto por dióxido de enxofre, fluoretos e material particulado. *P. cattleianum* (araçá) não mostrou diferenças significativas para esses parâmetros.

Dias *et al.* (2007), expondo mudas de *P. guajava* no Parque Municipal do Ibirapuera, na cidade de São Paulo, observaram aumento das concentrações de ácido ascórbico nas plantas mantidas no Parque, área com ocorrência de grandes concentrações de ozônio. Entretanto, para outros antioxidantes, como as enzimas peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), as mudas não apresentaram nenhuma resposta à presença de ozônio.

Para esses parâmetros, *P. guajava* parece não acionar os antioxidantes tradicionalmente estudados em situações que não gerem extremo estresse oxidativo.

3.2 Substâncias Fenólicas

A análise anatômica foi realizada corando as folhas com azul de safrinha e mostraram a presença de grande quantidade de compostos de natureza hidrofílica, que aparecem corados em vermelho (fig. 3.6). A presença desses compostos foi pouco observada na epiderme e hipoderme foliar. Esses tecidos não apresentam organelas fotossintetizantes e a síntese de substâncias fenólicas tem início nos cloroplastos, prossegue na parte citossólica do RE até o acúmulo no vacúolo.

A figura 3.7 mostra a secção transversal da lâmina foliar corada com sulfato ferroso. É possível observar intensa pigmentação amarronzada, característica da presença de substâncias fenólicas, as quais são capazes de se complexarem com o ferro, proporcionando a coloração

(marrom) observada. Ainda nesta figura, pode-se observar a presença de canais oleíferos preenchidos com óleos voláteis, que em *P. guajava* são majoritariamente terpênicos (Furlan, 2004). Entretanto, os corantes utilizados nas análises histoquímicas são, em sua grande maioria, inespecíficos, podendo corar substâncias com propriedades ou estruturas químicas semelhantes, mas que não fazem parte da mesma classe metabólica. Por exemplo, testes para a presença de substâncias fenólicas coram substâncias que apresentem pelo menos uma hidroxila fenólica e, nesse caso, tanto substâncias fenólicas como os aminoácidos aromáticos reagiriam com o corante.

Figura 3.6- Secção transversal da lâmina foliar corada com azul de astra e safranina. Pigmentações avermelhadas indicam a presença de compostos de natureza hidrofílica (foto - Diego Demarco).

Figura 3.7- Secção transversal foliar corada com sulfato ferroso em formalina. Pigmentações marrons indicam a presença de substâncias fenólicas. As setas apontam para o canal oleífero preenchido com óleos voláteis (foto - Diego Demarco).

As dosagens de diferentes classes de substâncias fenólicas (fenóis, flavonoides e proantocianidinas) em raízes, caules e folhas não evidenciaram alterações significativas entre os tratamentos (tabela 3.1). Contrapondo-se, as quantificações de taninos totais em folhas de *P. guajava*, revelaram aumento destes aos 90 dias ($p < 0,01$), quando em elevado CO_2 . Em trabalhos com ozônio a goiabeira apresentou maiores quantidades de proantocianidinas, taninos totais e antocianinas, associadas à presença de injúrias foliares avermelhadas (Rezende & Furlan, 2009). O aumento de taninos totais observado neste trabalho com elevadas $[\text{CO}_2]$ pode sugerir que essa classe de substância estaria relacionada ao mecanismo de sinalização e/ou defesa dessa espécie a situações de estresse em geral.

Lindroth *et al.* (1995) relataram que teores de proantocianidinas em *Betula papyrifera* aumentaram duas vezes quando as árvores foram cultivadas em elevada $[\text{CO}_2]$ por 50 dias. Aumentos similares têm sido descritos na literatura em situação de CO_2 elevado (Lincoln *et al.*, 1993; Lavola & Julken-Titto, 1994; Kinney *et al.*, 1997; Kuokkanen *et al.*, 2001, 2003; Peltonen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Koike *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado com cultivares transgênicos ('GK-12') e não transgênicos ('Simian-3') de algodão, observou-se que sob elevado CO_2 os níveis de taninos condensados são significativamente inferiores em folhas de algodão transgênico do que em não transgênico, mas que ambos os cultivares apresentaram aumento de taninos condensados sob elevada $[\text{CO}_2]$, 35 a 40 dias após plantio (Wu *et al.*, 2011). Ademais, diversos estudos apontam estabilidade desses compostos quando em elevado CO_2 (Kanowski, 2001; Hall *et al.*, 2005; Koike *et al.*, 2006; Haikio *et al.*, 2009). Alguns trabalhos reportaram, ainda, reduções nos níveis dessa classe de compostos quando a planta é submetida à elevada $[\text{CO}_2]$ (Peñuelas *et al.*, 1996; Koike *et al.*, 2006).

Tabela 3.1- Teores de fenóis, flavonoides, taninos totais e proantocianidinas (mg.g⁻¹ MS; media ± desvio padrão) nos diferentes órgãos vegetais. Asteriscos indicam diferença significativa (p<0,05) entre os tratamentos: ar ambiente (A) e elevado CO₂ (C).

Dias de exposição	Fenóis Totais					
	Raiz		Caule		Folha	
	A	C	A	C	A	C
0	143,59±13,64	218,86±82,19	46,43±15,69	50,86±7,94	110,63±11,99	115,35±15,83
15	158,30±38,04	176,37±23,08	66,72±20,13	72,56±11,49	123,01±16,07	105,83±23,40
30	123,14±13,95	115,36±21,72	42,93±9,75	39,86±12,35	122,06±19,59	98,82±12,817
45	106,47±17,28	117,84±27,92	53,90±9,71	43,37±19,62	126,87±27,92	103,91±25,24
60	111,79±18,88	109,24±18,04	43,67±8,31	51,88±7,34	115,97±15,18	108,64±19,67
75	117,79±13,37	128,04±36,07	39,99±6,37	48,83±5,23	108,57±20,10	120,70±21,68
90	137,97±27,67	121,37±16,02	46,85±22,39	58,67±8,55	103,79±26,73	128,89±21,03

Dias de exposição	Taninos Totais					
	Raiz		Caule		Folha	
	A	C	A	C	A	C
0	2,75±0,54	1,86±1,54	42,53±18,86	46,11±1,30	84,12±13,78	90,67±16,16
15	1,66±1,55	1,59±1,58	46,05±16,81	60,21±13,49	102,21±16,13	108,23±11,63
30	2,54±0,32	2,79±0,85	45,21±7,025	37,51±24,09	105,36±19,52	92,89±19,28
45	1,98±1,39	2,73±0,73	52,78±5,11	52,07±5,023	109,76±19,53	97,13±15,53
60	2,32±0,28	2,80±0,68	42,84±7,63	51,62±5,74	113,04±13,17	122,06±10,60
75	2,15±1,11	3,02±0,76	43,27±8,97	51,01±4,20	113,85±12,27	124,26±22,07
90	2,06±1,48	3,25±0,87	63,97±8,57	60,26±10,43	*102,8±11,68	129,23±11,27

Dias de exposição	Flavonoides Totais					
	Raiz		Caule		Folha	
	A	C	A	C	A	C
0	1,53±0,41	2,34±0,80	3,13±1,53	3,49±1,40	23,88±2,08	21,18±1,71
15	2,68±0,23	2,65±0,49	1,48±0,84	1,99±1,17	24,37±1,94	23,78±1,99
30	1,75±0,54	1,55±0,51	2,73±0,45	2,17±1,09	25,95±3,17	22,47±3,23
45	1,73±0,47	1,89±0,45	1,96±0,91	1,99±1,11	24,75±3,09	23,29±1,84
60	1,45±0,14	2,03±0,63	2,19±0,77	1,38±0,20	26,05±3,22	22,04±3,82
75	1,74±0,17	1,99±0,51	2,32±0,76	2,67±0,38	21,89±4,08	22,63±2,82
90	2,71±0,84	2,19±0,47	2,38±1,28	3,21±0,31	21,01±3,68	22,83±3,49

Dias de exposição	Proantocianidinas					
	Raiz		Caule		Folha	
	A	C	A	C	A	C
0	0,45±0,25	0,26±0,29	7,94±4,37	3,68±0,90	36,11±9,75	42,07±17,53
15	0,26±0,19	0,41±0,43	9,49±5,16	15,05±9,36	52,58±15,89	57,89±8,34
30	0,55±0,12	0,55±0,21	9,10±3,51	5,08±3,46	57,72±12,71	46,79±12,01
45	0,36±0,26	0,58±0,22	11,31±3,50	8,91±4,61	63,31±13,89	48,59±19,61
60	0,44±0,20	0,54±0,28	9,24±3,05	12,01±2,91	65,01±13,05	70,23±15,45
75	0,43±0,23	0,72±0,29	6,74±4,52	8,82±3,99	57,87±8,58	68,68±24,86
90	0,37±0,25	0,63±0,37	17,76±4,13	13,42±2,57	55,36±12,43	77,87±8,62

Há diversos trabalhos na literatura que dosam substâncias fenólicas em situação de elevado CO₂, mas são muito escassos os trabalhos que utilizam espécies tropicais. Em geral, os resultados empíricos não apontam para uma previsão teórica do efeito do elevado CO₂ na produção de metabólitos secundários. Diferentes classes, assim como tipos específicos de metabólitos secundários, parecem ser diferencialmente influenciadas por altas concentrações de CO₂ (Koricheva *et al.*, 1998; Zvereva & Kozlov, 2006; Birdat-Bouzat & Imeh-Nathaniel, 2008; Lindroth, 2010).

Elevadas doses de CO₂ podem alterar a composição química das plantas influenciando: a assimilação de nutrientes e carbono; a abundância dos precursores na biossíntese de metabólitos secundários; as vias de transdução de sinal; e, eventualmente, os genes que controlam a expressão desses metabólitos (Lindroth, 2010). Dessa forma, o elevado CO₂ pode aumentar ou diminuir as concentrações de produtos do metabolismo secundário em folhas (Hovenden & Williams, 2010) alterando, ainda, as interações com outros componentes bióticos e modificando ecossistemas.

Um estudo com quatro espécies de plantas herbáceas (*Senecio vulgaris*, *Spergula arvensis*, *Cardamine hirsuta* e *Poa annua*) verificou um aumento da expressão da enzima PAL (fenilalanina amônia-liase) em situação de elevado CO₂, com exceção da espécie *Poa annua* onde ocorreu redução da expressão dessa enzima tão importante na síntese de substâncias fenólicas. Esses resultados apontam para reações espécie-específicas à presença de elevado CO₂ (Hartley *et al.*, 2000).

Utilizando a análise multivariada de componentes principais (PCA), pode-se observar que os órgãos vegetais analisados diferem entre si na composição fenólica apresentada. A figura 3.8 traz o resultado do PCA utilizando como variáveis os teores de substâncias fenólicas em cada órgão vegetal analisado e para cada tratamento. Podemos observar que o primeiro eixo explica 70,5% da variância total encontrada nos dados. Para esse eixo, o principal fator de influência para separação espacial das amostras são os teores de taninos e flavonoides, sendo estes maiores nos objetos posicionados à direita do eixo 1 (grupo formado pelas amostras de folha, independentemente do tratamento). Esta PCA evidenciou a formação de três grupos distintos de amostras que corresponderam aos órgãos vegetais analisados e que claramente apresentam quantidades de substâncias fenólicas bem distintas entre eles.

A.

B.

Variáveis	Eixo1	Eixo2
FT	0,1202	0,9586
FIT	0,5726	0,0965
TT	0,5625	-0,2653
PrT	0,5842	-0,0364

C.

CP	% de variância	% de variância acumulada	% de variância esperada
1	70,460	70,460	52,083
2	25,954	96,414	27,083
3	2,506	98,920	14,583
4	1,080	100,000	6,250

Figura 3.8 - Análise de componente principal de 4 variáveis (; FT- fenóis totais; FIT- flavonoides totais; TT- taninos totais; PrT- proantocianidinas) relacionadas a substâncias fenólicas de folhas (●), caules (■) e raízes (▲) de *P. guajava* cv. Pedro Sato mantidas em ar ambiente (azul) e elevado CO₂ (vermelho). B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Quanto às análises via CLAE, observou-se que não há diferenças qualitativas entre os tratamentos no que se refere à composição de constituintes fenólicos. A identificação das bandas observadas nos cromatogramas foi realizada através da comparação dos tempos de retenção com os de amostras autênticas, juntamente com análise dos espectros de UV/visível.

Analisando-se os cromatogramas obtidos para os extratos foliares, 6 bandas majoritárias foram observadas, todas apresentaram espectros de absorção UV/Visível característicos de flavonoides (Fig. 3.9B). Além disso, os espectros UV/Visível são característicos da classe dos flavonóis, em particular do flavonoide quercetina. Dessa forma, as seis bandas encontradas e utilizadas para as análises quantitativas foram identificadas como sendo derivados de quercetina com diferentes graus de glicosilação. O sistema de solventes em gradiente que inicia com 88% de ácido acético 1%, juntamente com o uso de uma coluna de fase reversa, privilegia a eluição de substâncias mais polares, que acabam apresentando menores tempos de retenção. Dessa forma, flavonoides com maior número de glicosilação são eluídos primeiro, enquanto as agliconas e flavonoides metoxilados, acabam por apresentar os maiores tempos de retenção. Para os derivados de quercetina encontrados na goiabeira pudemos identificar as bandas como sendo, do menor para o maior tempo de retenção: 1- diglicosídeo de quercetina não identificado, 2- quercetina 3-*O*-rutinosídeo (rutina), 3- glicosídeo de quercetina não identificado, 4- quercetina 3-*O*-xilósídeo, 5- quercetina 3-*O*-arabinosídeo (guajaverina) e 6- quercetina 3-*O*-ramnosídeo (quercitrina).

Os extratos de caules e raízes foram analisados por CLAE para verificar, exploratoriamente, os constituintes presentes, mas não foram utilizados para análises quantitativas. Foi possível observar a presença de ácidos fenólicos (por exemplo, *p*-cumárico fig. 3.10-1B) e derivados de ácido elágico (fig. 3.10- 1A e 2B) como constituintes majoritários desses extratos, principalmente nos caules, o que está de acordo com os maiores teores de taninos nesse órgão (fig. 3.10).

Figura 3.9- Cromatograma obtido por CLAE-DAD (352 nm) do extrato hidroalcoólico de folhas (A). Espectros UV/Visível (B) das bandas majoritárias mostradas em A.

As seis bandas encontradas por CLAE-DAD foram quantificadas, mas não foram encontradas diferenças significativas nos teores individuais desses flavonoides quando comparamos as mudas que cresceram em ar ambiente com as que foram mantidas sob elevado CO₂ (tabela 3.2). Esses resultados indicam que elevadas [CO₂] parecem não influenciar os teores de flavonoides em *P. guajava* cv. Pedro Sato, o contrário do observado para a o cultivar Paluma exposto à poluição industrial e ao ozônio (Furlan *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2011).

Figura 3.10- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (352 nm) dos extratos hidroalcoólicos de caules (A) e raízes (B). Espectros UV/Visível das bandas majoritárias mostradas em A e B.

Tabela 3.2- Teores dos flavonoides (mg.g⁻¹ MS; media ± desvio padrão) via CLAE-DAD. (A) ar ambiente e elevado CO₂ (C). 1- diglicosídeo de quercetina não identificado, 2- rutina, 3- glicosídeo de quercetina não identificado, 4- quercetina 3-O-xilosídeo 5- guajaverina, 6- quercitrina.

Dias de exposição	1		2		3	
	A	C	A	C	A	C
0	0,22±0,03	0,37±0,08	6,31±0,26	10,19±7,36	0,76±0,069	1,18±0,68
15	0,26±0,12	0,28±0,12	8,22±2,30	7,89±2,74	0,83±0,20	0,82±0,23
30	0,31±0,16	0,23±0,13	7,22±1,24	6,78±1,58	0,77±0,09	0,72±0,14
45	0,37±0,27	0,37±0,23	9,34±5,44	10,93±4,48	1,14±0,62	1,30±0,51
60	0,29±0,04	0,30±0,24	7,77±1,43	7,13±1,83	0,78±0,18	0,67±0,12
75	0,51±0,15	0,80±0,53	9,30±4,62	13,17±4,80	0,95±0,48	1,24±0,52
90	0,15±0,15	0,52±0,22	8,83±1,87	11,78±2,64	0,99±0,28	1,22±0,27
Dias de exposição	4		5		6	
	A	C	A	C	A	C
0	2,04±0,29	3,05±1,82	2,38±0,50	3,76±2,28	1,39±0,01	2,22±1,42
15	2,20±0,45	2,20±0,59	2,59±0,62	2,29±0,58	1,34±0,58	1,03±0,18
30	2,13±0,48	1,83±0,41	2,52±0,80	1,99±1,52	1,16±0,18	0,99±0,18
45	2,88±1,92	3,23±1,41	2,92±1,99	3,50±1,52	1,46±1,03	1,99±0,95
60	1,93±0,43	1,69±0,55	1,99±0,47	1,67±0,47	1,07±0,37	0,91±0,36
75	1,78±0,89	2,10±0,87	2,09±1,06	3,01±1,63	1,07±0,50	1,06±0,37
90	2,04±0,48	2,38±0,48	2,13±0,79	2,84±0,70	0,95±0,33	1,15±0,49

Pela análise via CALE-DAD, podemos observar que o flavonoide majoritário em *P. guajava* cv. Paluma é a rutina, um diglicosídeo de quercetina, resultados que corroboram o encontrado por Furlan *et al.* (2010). Diversos estudos relatam a presença de derivados de quercetina em extratos de folhas de *P. guajava* (Arima & Danno, 2002; Liang *et al.*, 2005; Prabu *et al.*, 2006). Num estudo recente e detalhado sobre a composição flavonoídica desta espécie, utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), foram identificados 10 derivados de quercetina com diferentes substituintes, sendo eles: quercetina, quercetina 3-O-glicosídeo, quercetina 3-O-galactosídeo, quercetina 3-O-ramnosídeo (quercitrina), quercetina 3-O-arabinopiranosídeo (guajaverina), quercetina 3-O-arabinofuranosídeo (avicularina), quercetina 3-O-xilopiranosídeo, quercetina 3-O-(6-O-galoil)-galactosídeo, quercetina 3-O-(6-O-galoil)-glicosídeo, quercetina 3-O-(5-O-galoil)-arabinofuranosídeo (Khan *et al.*, 2011).

Lawler *et al.* (1997) mostraram que concentrações de fenólicos em folhas de mudas de *Eucaliptus tereticornis* aumentaram sob elevado CO₂, mas apenas em combinação com outros fatores de estresse, como nutriente e regimes de luz. Num estudo realizado por McKiernan *et al.* (2012), não foram detectadas alterações nas substâncias fenólicas analisadas (fenóis totais e taninos) em mudas de *Eucaliptus globulus* quando submetidas ao elevado CO₂. Dessa forma, esses estudos sugerem que a elevada [CO₂] sozinha não teria um efeito consistente nas concentrações

foliares de substâncias fenólicas em mudas de eucalipto, espécies também pertencente à Myrtaceae.

A maior disponibilidade de carbono em relação aos outros nutrientes pode induzir aumento de metabólitos secundários. Alguns estudos têm demonstrado que o aumento de carbono pode ser direcionado para um aumento da produção de terpenoides, mas a identificação de substâncias alteradas pela ação do elevado CO₂ ainda é escassa (Buckeridge, 2008). Em um estudo realizado com *Populus* observou-se que as vias de biossíntese do metabolismo secundário (principalmente para síntese de antocianinas) e a glicólise foram significativamente aumentadas por exposição ao elevado CO₂ e durante a senescência. Acredita-se que o acúmulo de antocianinas poderia servir para prolongar a longevidade das folhas e retardar a senescência, uma vez que para esta classe de flavonoides, se tem inúmeros relatos de sua atividade antioxidante, muito relacionada ao retardo do envelhecimento (Tallis *et al.*, 2010).

As análises de teores de antocianinas via CLAE-DAD, neste estudo, não foram positivas. As cromatografias resultavam em cromatogramas sem nenhuma banda detectada, provavelmente devido: 1- a pequena quantidade de material vegetal disponível para a análise, 2- a espécie não apresentar acúmulo dessa substância em suas folhas e, 3- esse cultivar não apresentar como sintoma visível o aparecimento de manchas avermelhadas. Em situação de altas concentrações de ozônio, o cultivar Pedro Sato apresentou redução dos níveis de antocianinas e injúrias foliares do tipo marrons (Moraes *et al.*, 2011). Para os autores, o cultivar Pedro Sato seria mais susceptível ao ozônio se comparado ao Paluma. As análises via espectrofotômetro UV/visível mostraram quantidades traço dessa classe de substâncias nas folhas. Além do mais, não foi observada ocorrência de injúrias como efeito do tratamento aplicado.

3.3 Poliaminas solúveis

A análise de poliaminas solúveis por CLAE revelou a presença de espermina (Spm), espermidina (Spd) e putrescina (Put). Dentre as três poliaminas, a Spm foi a que apresentou as maiores quantidades na sua forma livre (fig. 3.11). Entretanto, não foi verificada diferença significativa entre as concentrações de Spm se considerado o tratamento ou o período de exposição. Por outro lado, Spd foi a poliamina que apresentou maiores quantidades na sua forma conjugada. Sua forma livre mostrou redução de conteúdo após 75 dias na condição de elevado CO₂ ($p < 0,05$).

Figura 3.11- Teor de poliaminas solúveis ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF). A-livres, B-conjugadas e C- totais. ■ elevado CO_2 , ◆- Ar ambiente. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos.

As poliaminas participam de diversos processos fundamentais, tais como, regulação do transcriptoma, divisão, crescimento e desenvolvimento celular. Atuam integradas com vias hormonais relacionadas com estresse, como o ácido abscísico (ABA), sinalização de ERO, óxido nítrico e regulação de canais iônicos (Walden *et al.*, 1997; Bouchereau *et al.*, 1999; Alcazar *et al.*, 2005; Kussano *et al.*, 2008). Por atuarem na sinalização de ERO são associadas às respostas a diferentes tipos de estresse. Diversos estudos, utilizando diferentes espécies vegetais mostraram que, em resposta a diferentes condições ambientais (salinidade, seca, frio, calor, hipóxia, exposição ao ozônio, UV-B e UV-C, metais pesados, ferimento mecânico e tratamento com herbicidas), geralmente ocorre acúmulo de poliaminas (Bouchereau *et al.*, 1999; Alcazar *et al.*, 2006; Groppa & Benavides 2008).

A presença de Put está relacionada com a tolerância ao estresse. Viu-se no genoma de *Arabidopsis* que dois genes codificam a arginina descarboxilase (*ADC1* e *ADC2*), enzima responsável pela descarboxilação desse aminoácido alifático e que levará à formação da Put (Takahashi & Kakehi, 2010). Urano *et al.* (2004) mostraram que mutantes para o alelo *ADC2* de *Arabidopsis* eram mais sensíveis ao estresse salino. Em um modelo, com base em estudos que utilizaram plantas transgênicas, viu-se que o nível de Put deve exceder um determinado limite para aumentar a síntese de Spd e Spm, para haver também uma recuperação do estresse (Capell *et al.*, 2004). Um mutante duplo de *ADC1* e *ADC2* não produziu poliaminas e não foi capaz de se desenvolver, morrendo ainda como embrião (Urano *et al.*, 2005).

A Spd é essencial para o crescimento das plantas (Takahashi & Kakehi, 2010). As poliaminas não estão presentes apenas na forma livre, mas ocorrem comumente conjugadas com ácidos cinâmicos como *p*-cumárico, ferúlico e cafeico (Bagni & Tassoni, 2001). Spd conjugadas são utilizadas na proteção contra patógenos, “sequestro” de substâncias fenólicas, e também como uma reserva de poliaminas que pode ser ativada e utilizada para proliferação de tecidos. A redução de Spd observada aos 75 dias de experimento, com simultâneo aumento de Spd conjugada, pode sugerir a conjugação desta substância como forma de armazenar substâncias fenólicas produzidas em excesso ou, ainda, para armazenar poliaminas que não estavam em uso.

Não só a Spd pode ser encontrada na sua forma conjugada, mas sim todas as poliaminas e além de atuarem na sinalização de ERO, podem atuar como efetivos varredores de radicais livres quando na forma conjugada, isto porque a conjugação com substâncias que apresentam grandes quantidades de hidroxilas (como as substâncias fenólicas) pode estabilizar radicais livres ou quelar metais.

Em situação de estresse oxidativo causado por ozônio, as poliaminas mostraram diversas funções, como inibição da peroxidação de lipídeos em membranas (Tadolini, 1988), ativação de ATPases ligadas a membranas e redução da formação do etileno (Smith, 1985; Evans & Malmberg, 1989). Essas funções são atribuídas ao acúmulo de poliaminas (Rowland-Bamford *et al.*, 1989; Sandermann *et al.*, 1989; Dohmen *et al.*, 1990; Raab & Weinstein, 1990).

Num estudo com *Nicotiana tabacum*, observou-se que em altas concentrações de ozônio ocorreu acúmulo de monocateoil-putrescina (Langebartels *et al.*, 1991). Tegelberg *et al.* (2008), estudando *Betula pendula*, não verificaram alterações nos teores de poliaminas quando a planta foi exposta a elevado CO₂, mas encontraram redução de Put e aumento de Spm, nas suas formas livres, quando a planta foi submetida a altas temperaturas. Os autores sugerem que possa ocorrer acúmulo de poliaminas também na forma conjugada. Previamente Kotzabasis *et al.* (1999), estudando uma espécie de alga verde, observou uma diminuição semelhante na relação Put/Spm em exposição a pouca luz, de forma que a queda foi concomitante com a diminuição da proporção de clorofilas *a* e *b* e ao aumento da proteína LHClI, sugerindo que a conformação das proteínas do complexo antena pode ser regulada por poliaminas, afetando a eficiência da captação de luz (Del Duca *et al.*, 1994). No presente estudo, foi observada redução na relação Put/Spm, mas a ausência de análises fotossintéticas não permite inferir sobre alterações na eficiência de capacitação de luz de mudas de *P. guajava*.

3.4- Análise Multivariada

A análise de componente principal utilizando as 22 variáveis analisadas neste capítulo revelou que 34% da variabilidade total encontrada nos dados podem ser explicados pelos dois primeiros eixos (fig. 3.12). Não foi possível observar grupos bem delimitados e influenciados pelo tempo de exposição ou pelo efeito do tratamento. Porém, olhando os dados referentes às coletas dos 30 dias (■) e 90 dias (*), pode-se observar que ocorreu uma separação dessas amostras ao longo do eixo 1, de forma que a maioria das amostras de 30 dias permanecem no lado negativo do eixo, enquanto as amostras do final do experimento, permanecem, em geral, no lado positivo do eixo. Esta distribuição ao longo deste eixo é influenciada, principalmente, pelos flavonoides identificados e quantificados por CLAE (rutina, Flav.3, quercetina 3-*O*-xilósídeo, guajaverina e quercitrina).

A.

B.

Variáveis	Eixo01	Eixo02
DHA	-0,0316	-0,1052
AA	-0,0237	-0,1510
AA	0,0106	0,0731
FT	-0,0167	0,4987
FIT	-0,0231	0,3385
TT	-0,0036	0,5100
PrT	-0,0141	0,4869
GSH	-0,0208	0,0031
Gt	-0,0080	0,0482
GSSG	0,0186	0,0906
PUT	0,0916	0,1257
PUTconj	0,0598	0,1514
SPD	0,1047	-0,0412
SPD-conj	0,0623	0,0047
SPM	0,0506	-0,1556
SPM-conj	0,0464	-0,0066
FI1	0,2663	-0,1490
Rut	0,4195	0,0270
FI3	0,4272	0,0381
Qxil	0,4300	0,0206
Qara	0,4341	0,0132
Qram	0,4029	0,0127

C.

CP	% de variância	% de variância acumulada	% de variância esperada
1	22,611	22,611	16,776
2	11,517	34,128	12,231
3	10,201	44,329	9,958
4	9,681	54,009	8,443

Figura 3.12 - Análise de componente principal de 22 variáveis (DHA- dehidroascórbico, AAt- ácido ascórbico total; AA- ácido ascórbico; FT- fenois totais; FIT- flavonoides totais; TT- taninos totais; PrT- proantocianidinas; GSH- glutathiona reduzida; Gt- glutathiona total; GSSG- glutathiona oxidada; PUT- putrescina livre; PUTconj- putrescina conjugada; SPD- espermidina livre; SPDconj- espermidina conjugada; SPM- espermina livre; SPMconj- espermina conjugada; FI1- flavonoide 1 (NI); Rut- rutina; FI3- flavonoide 3 (NI); Qxil- quercetina 3-O-xilosídeo; Qara- guajaverina; Qram- Quercitrina) relacionadas a defesas antioxidantes, de tecido foliar de *P. guajava* cv. Pedro Sato, ao longo dos dias de exposição ao elevado CO₂: 15 dias (●), 30 dias (■), 45 dias (▲), 60 dias (▼), 75 dias (◆) e 90 dias (*). Mantidas em ar ambiente (azul) e elevado CO₂ (vermelho). B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Analisando o efeito do tratamento sob essas mesmas coletas é possível observar uma separação espacial ao longo do eixo 2, se considerado o tempo de 90 dias de fumigação. Para esse eixo, os teores de fenóis, taninos, flavonoides e proantocianidinas totais são as variáveis que mais influenciam a distribuição das amostras. Estes resultados corroboram as quantificações obtidas para essas substâncias (tab. 3.1) onde aos 30 dias a produção dessas substâncias foi menor no tratamento de elevado CO₂ e, aos 90 dias, a situação parece ser invertida, com maiores quantidades de substâncias fenólicas como efeito do tratamento. Além disso, considerando as amostras de 90 dias de fumigação, as mantidas sob elevado CO₂ parecem apresentar maiores teores de AA e GSH quando comparadas com as amostras mantidas em ar ambiente, mais uma vez indicando que a planta está com substrato para sequestrar radicais e que o balanço do estado redox está eficiente.

De maneira geral, os resultados obtidos neste capítulo indicam que *P. guajava* cv. Pedro Sato não se encontra numa situação de estresse oxidativo, já que os aumentos de flavonoides foram discretos e AA, GSH e poliaminas, importantes substâncias relacionadas à sinalização e inativação de ERO, não evidenciaram alterações que demonstrem uma situação desfavorável para a planta. Por outro lado, ocorreu acúmulo significativo de taninos que, em situação de estresse oxidativo, reduziram neste cultivar (Moraes *et al.*, 2011). Assim, acredita-se que esse acúmulo possa indicar uma forma de armazenar o carbono disponível em maior quantidade. Como *P. guajava* é uma espécie reconhecida pelas suas grandes quantidades de taninos, o que inclusive a tornam uma espécie de interesse medicinal, parece natural que a forma estoque de carbono excedente seja nessa forma polimérica.

É importante refletir que em experimentos de campo, a resposta é sempre um resultado da alteração de diversos fatores que ocorrem concomitantes, e que também influenciarão o metabolismo de carbono e a produção e inativação de ERO (Gillespie *et al.*, 2011). Dois pontos devem ser considerados no experimento aqui apresentado: 1- o local de estudo, fitotério do Instituto de Biociências da USP, região de ocorrência de altas concentrações de ozônio e, 2- a não utilização de filtros para remoção de ozônio (como por exemplo, o uso de carvão ativado).

O ozônio e o dióxido de carbono apresentam propriedades bem distintas, sendo o primeiro, um poluente altamente oxidante. As respostas das plantas serão alteradas pela co-ocorrência de níveis elevados desses dois gases. O crescimento em elevadas [CO₂] reduz muitos dos efeitos negativos provocados pela elevação da [O₃], mas os mecanismos pelos quais essa melhoria ocorre não são bem compreendidos. Uma das hipóteses sugere que a diminuição da condutância estomática, causada pelo aumento de CO₂, leva a um menor fluxo de O₃ para o interior da folha,

resultando em menor dano oxidativo sem a necessidade de alterações no metabolismo antioxidante (McKee *et al.*, 1997; McKee *et al.*, 2000; Wustman *et al.*, 2001).

Há outras hipóteses que corroboram esse efeito “protetor” do elevado CO₂ sob o influxo de O₃, porém esse efeito dependerá das concentrações de cada gás e de outros fatores ambientais como luz, temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, dentre outros.

Para os teores de substâncias antioxidantes em *P. guajava*, elevadas [CO₂] parecem não afetar a produção dessas substâncias, pelo menos não quando considerado um período de exposição de 90 dias.

4. BIBLIOGRAFIA

- Agati, G.; Matteini, P.; Goti, A. & Tattini, M. Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist*, v. 174, p. 77-89, 2007.
- Alcazar, R.; Marco, F.; Cuevas, J.C.; Patron, M.; Ferrando, A.; Carrasco, P.; Tiburcio, A.F. & Altabella, T. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters*, v. 28, p. 1867-1876, 2006.
- American Herbal Pharmacopoeia, 2008. Analytical methods and quantitative standards. <http://www.herbal-ahp.org/analytic_guide.htm> (accessed 05.11.08).
- Aranjuelo, I.; Erice, G.; Nogues, S.; Morales, F.; Irigoyen, J.J. & Sanchez-Diaz, M. The mechanism(s) involved in the photoprotection of PSII at elevated CO₂ innodulated alfalfa plants. *Environmental and Experimental Botany*, v. 64, p. 295-306, 2008.
- Arima, H. & Danno, G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, p. 727-730, 2002.
- Asada, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen species and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 50, p. 601-639, 1999.
- Badiani, M.; Paolacci, A.R.; Fusari, A.; Bettarini, I.; Brugnoli, E.; Lauteri, M.; Miglietta, F. & Raschi, A. Foliar antioxidant status of plants from naturally high-CO₂ sites. *Physiologia Plantarum*, v. 104, p. 765-771, 1998.
- Bagni, N. & Tassoni, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*, v. 20, p. 301-317, 2001.
- Bais, H.P. & Ravishankar, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 69, p. 1-34, 2002.
- Bassard, J.E.; Ullmann, P.; Bernier, F. & Werck-Reichhart, D. Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry*, v. 71, p. 1808-1824, 2010.

- Benzie, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *International Journal of Food Science Nutrition*, v.47, p.233-261, 1996.
- Bidart-Bouzat, M.G. & Imeh-Nathaniel, A. Global change effects on plant chemical defenses against insect herbivores. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 50, p. 1339-1354, 2008.
- Bouchereau, A.; Aziz, A.; Larher, F. & Martin-Tanguy, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, v. 140, p. 103-125, 1999.
- Buckeridge, M.S. *Biologia & Mudanças Climáticas no Brasil*. Rima Editora, São Carlos, 2008. 295p.
- Capell, T.; Bassie, L. & Christou, P. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, v. 101, p. 9909-9914, 2004.
- Chen, F.; Ge, F. & Parajulee, M.N. Impact of elevated CO₂ on tritrophic interaction of *Gossypium hirsutum*, *Aphis gossypii* and *Leis axyridis*. *Environmental Entomology*, v. 34, p. 37-46, 2005.
- Cos, L.; Ying, M.; Calomme, J.P.; Hu, K.; Cimanga, B.; Van Poel, L.; Pieters, A.J.; Vlietnck, D. & Vanden Berghe. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, v.61, p. 71-76, 1998.
- Dafré-Martinelli, M.; Nakazato, R.K.; Dias, A.P.; Rinaldi, M.C.S. & Domingos, M. The redoxstate of *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' growing under ozone in a subtropical area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 1645-1652, 2011.
- Del Duca, S.; Tidu, V.; Bassi, R.; Esposito, C. & Serafini-Francassini, D. Identification of Chl *a/b* proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta*, v. 193, p. 283-289, 1994.
- DellaPenna, D. & Pogson, B.J. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 711-738, 2006.
- Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products – A biosynthetic approach*. Third edition. John Wiley and Sons. West Sussex. UK., 2009, 327 p.
- Di Toppi, L.S.; Marabottini, R.; Badiani, M. & Raschi, A. Antioxidant status in herbaceous plants growing under elevated CO₂ in mini-FACE rings. *Journal of Plant Physiology*, v. 159, p. 1005-1013, 2002.
- Dias, A.P.L.; Dafré, M.; Rinaldi, M.C.S. & Domingos, M. How the redox state of tobacco 'Bel-W3' is modified in response to ozone and other environmental factors in a sub-tropical area? *Environmental Pollution*, v. 159, p. 458-465, 2011.
- Dias, A.P.L.; Rinaldi, M.C.S. & Moraes, R.M. Alterações bioquímicas associadas a injúrias foliares visíveis em plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' mantidas em ambiente contaminado por ozônio. *Hoehnea*, v. 34, n.2, p. 231-238, 2007.
- Dohmen, G.P.; Koppers, A. & Langebartels, C. Biochemical response of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst., towards 14-month exposure to ozone and acid mist: effects on amino acid, glutathione and polyamine titers. *Environmental Pollution*, v. 64, p. 375-383, 1990.

- Elliott, A.J.; Scheiber, S.A.; Thomas, C. & Pardini, R.S. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, v. 44, p. 1603-1608, 1992.
- Evans, P.T. & Malmberg, R.L. Do polyamines have roles in plant development? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 40, p. 235-269, 1989.
- Ferrali, M.; Signorini, C.; Caciotti, B.; Sugherini, L.; Ciccoli, L.; Giachetti, D. & Comporti, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, v. 416, p. 123-129, 1997.
- Feucht, W; Treutter, D. & Polster, J. Flavanol binding of nuclei from tree species. *Plant Cell Reports*, v. 22, p. 430-436, 2004.
- Foyer, C.H. & Halliwell, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, v. 133, p. 21-25, 1976.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, v. 119, p. 355-364, 2003.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, v. 155, p. 2-18, 2011.
- Foyer, C.H. & Shigeoka, S. Update: Understanding oxidative stress and antioxidant functions in order to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, v. 155, n. 1, p. 93-100, 2011.
- Furlan, C.M. (2004). Efeitos de poluentes atmosféricos na composição química de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. e *Psidium guajava* L.. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Furlan, C.M.; Santos, D.Y.A.C.; Motta, L.B.; Domingos, M. & Salatino, A. Guava flavonoids and the effects of industrial air pollutants. *Atmospheric Pollution Research*, v. 1, p. 30-35, 2010.
- Gagné, S.; Saucier, C. & Géný, L. Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, p. 54, p. 9465-9471, 2006.
- Gerlach, D. 1984 *Botanische Mikrotechnik: eine Einführung*. 3rd ed., Stuttgart, Georg Thieme.
- Gillespie, K.M.; Rogers, A. & Ainsworth, E.A. Growth at elevated ozone or elevated carbon dioxide concentration alters antioxidant capacity and response to acute oxidative stress in soybean (*Glycine max*). *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 2667-2678, 2011.
- Grace, S.C. & Logan, B.A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 355, p. 1499–1510, 2000.
- Groppa, M.D. & Benavides, M.P. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, v. 34, p. 35-45, 2008.
- Groppa, M.D.; Tomaro, M.L. & Benavides, M.P. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science*, v. 161, p. 481-488, 2001.
- Haikio, E.; Makkonen, M.; Julkunen-Tiitto, R.; Sitte, J.; Freiwald, V.; Silfver, T.; Pandey, V.; Beuker, E.; Holopainen, T. & Oksanen, E. Performance and secondary chemistry of two hybrid Aspen (*Populus*

- tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) clones in long-term elevated ozone exposure. *Journal of Chemical Ecology*, v. 35, n. 6, p. 664-678, 2009.
- Hall, M.C.; Stiling, P.; Hungate, B.A.; Drake, B.G. & Hunter, M.D. Effects of elevated CO₂ and herbivore damage on litter quality in a scrub oak ecosystem. *Journal of Chemical Ecology*, v. 31, p. 2343-2356, 2005.
- Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v. 141, p. 312-322, 2006.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.
- Hartley, S.E.; Jones, C.G.; Couper, G.C. & Jones, T.H. Biosynthesis of plant phenolic compounds in elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology*, v. 6, p. 497-506, 2000.
- Hättenschwiler, S. & Schafellner, C. Gypsy moth feeding in the canopy of a CO₂-enriched mature forest. *Global Change Biology*, v. 10, p. 1899-1908, 2004.
- Hernández, I. & van Breusegem, F. Opinion on the possible role of flavonoides as energy escape valves: Novel tools for nature's swiss army knife? *Plant Science*, v. 179, p. 297-301, 2010.
- Hernández, I.; Alegre, L. & Munné-Bosch, S. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiology*, v. 24, p. 1303-1311, 2004.
- Hernández, I.; Alegre, L.; Van Breusegem, F. & Munné-Bosch, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, v.14, n. 3, p. 125-132, 2009.
- Hichri, I.; Barrieu, F.; Bogs, J.; Kappel, C.; Delrot, S. & Lauvergeat, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n.8, p. 2465-2483, 2011.
- Hirano, R.; Sasamoto, W.; Matsumoto, A.; Itakura, H.; Igarashi, O. & Kondo, K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 47, p. 357-362, 2001.
- Hovenden, M.J. & Williams, A.L. The impacts of rising CO₂ concentrations on Australian terrestrial species and ecosystems. *Austral Ecology*, v. 35, p. 665-684, 2010.
- Hrazdina, G. & Wagner, G.J. Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 237, p. 88-100, 1985.
- Hutzler, P.; Fischbach, R.; Heller, W.; Jungblut, T.P.; Reuber, S.; Schmitz, R.; Veit, M.; Weissenböck, G. & Schnitzler, J.P. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*, v. 49, p. 953-965, 1998.
- Israr, M.; Sahi, S.; Datta, R. & Sarkar, D. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere*, v. 65, p. 591-598, 2006.

- Jia, Y.; Tang, S.R.; Wang, R.G.; Ju, X.H.; Ding, Y.Z.; Tu, S.X. & Smith, D.L. Effects of elevated CO₂ on growth, photosynthesis, elemental composition, antioxidant level, and phytochelatin concentration in *Lolium mutiforum* and *Lolium perenne* under Cd stress. *Journal of Hazardous Materials*, v. 180, p. 384-394, 2010.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York, 523p
- Kanowski, J. Effects of elevated CO₂ on the foliar chemistry of seedlings of two rainforest trees from north-east Australia: Implications for folivorous marsupials. *Austral Ecology*, v. 26, p. 165-172, 2001.
- Kelly, J.J.; Bansal, A.; Winkelman, J.; Janus, L.R.; Hell, S.; Wencel, M.; Belt, P.; Kuehn, A.; Rier, S.T. & Tuchman, N.C. Growth of Trees under Elevated Atmospheric CO₂ Alters Microbial Communities Colonizing Leaf Litter in a Temperate Woodland Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 4950-4959, 2010.
- Khan, I.; Sangwan, P.L.; Abdullah, S.T.; Gupta, B.D.; Dhar, J.K.; Manickavasagar, R. & Koul, S. Ten marker compounds-based comparative study of green tea and guava leaf by HPTLC densitometry methods: Antioxidant activity profiling. *Journal of Separation Science*, v. 34, p. 749-760, 2011.
- Kinney, K.K.; Lindroth, R.L.; Jung, S.M. & Nordheim, E.V. Effects of CO₂ and NO₃ availability on deciduous trees, phytochemistry and insect performance. *Ecology*, v. 78, p. 215-230, 1997.
- Kirakosyan, A.; Seymour, E.; Kaufman, P.B.; Warber, S.; Bolling, S. & Chang, S.C. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 51, p. 3973-3976, 2003.
- Koike, T.; Tobita, H.; Shibata, T.; Matsuki, S.; Konno, K.; Kitao, M.; Yamashita, N., & Maruyama, Y. Defense characteristics of seral deciduous broad-leaved tree seedlings grown under differing levels of CO₂ and nitrogen. *Population Ecology*, v. 48, p. 23-29, 2006.
- Koricheva, J.; Larsson, S.; Haukioja, E. & Keinänen, M. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*, v. 83, p. 212-226, 1998.
- Kotzabasis, K.; Strasser, B.; Navakoudis, E.; Senger, H. & Dörnemann, D. The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 50, p. 45-52, 1999.
- Krieger-Liszkay, A. & Trebst, A. Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 8, p. 1677-1684, 2006.
- Kuokkanen, K.; Julkunen-Titto, R.; Keinänen, M.; Niemela, P. & Tahvanainen, J. The effect of elevated CO₂ and temperature on the secondary chemistry of *Betula pendula* seedlings. *Trees- structure and function*, v. 15, p. 378-384, 2001.

- Kuokkanen, K.; Yan, S. & Niemela, P. Effects of elevated CO₂ and temperature on the leaf chemistry of birch *Betula pendula* (Roth) and the feeding behavior of the weevil *Phyllobius maculicornis*. *Agricultural and Forest Entomology*, v. 5, p. 209-217, 2003.
- Kuras, M.; Stefanowska-Wronka, M.; Lynch, J.M. & Zobel, A.M. Cytochemical localization of phenolic compounds in columella cells of the root cap in seeds of *Brassica napus*. Changes in the localization of phenolic compounds during germination. *Annals of Botany*, v. 84, p. 135-143, 1999.
- Kusano, T.; Berberich, T.; Tateda, C. & Takahashi, Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, v. 228, p. 367-381, 2008.
- Kuznetsov, V.; Radyukina, N.L. & Shevyakova, N.I. Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 53, v. 5, p. 583-604, 2006.
- Langebartels, C.; Kerner, K.; Leonardi, S.; Schraudner, M.; Trost, M.; Heller, W. & Sandermann, H. Jr. Biochemical plant responses to ozone. I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, v. 95, p. 882-889, 1991.
- Larcher, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RIMA, 2006. 531p.
- Lavola, A. & Julken-Titto, R. The effect of elevated carbon dioxide and fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). *Oecologia*, v.99, p. 315-321, 1994
- Lawler, I.R.; Foley, W. J.; Woodrow, I.E. & Cork, S.J. The effects of elevated CO₂ atmospheres on the nutritional quality of *Eucalyptus* foliage and its interaction with soil nutrient and light availability. *Oecologia*, v. 109, p. 59-68, 1997.
- Levine, M.; Daruwala, R.C. & Park, J.B. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature*, v.395, p. 231-232, 1998.
- Liang, Q.; Qian, H. & Yao, W. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *Journal European of Mass Spectrometry*, v. 11, p. 93-101, 2005.
- Lillie, R.D. 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3rd ed., McGraw-Hill, New York, 501p.
- Lincoln, D.E.; Fajer, E.D. & Johnson, E.H. Plant-insect herbivore interactions in elevated CO₂ environments. *Trends Ecological Evolution*, v. 8, p. 64-68, 1993.
- Lindroth, R.L. Impacts of elevated atmospheric CO₂ and O₃ on forests: phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. *Journal of Chemical Ecology*, v. 36, p. 2-21, 2010.
- Lindroth, R.L.; Arteel, G.E. & Kinney, K.K. Responses of three saturniid species to paper birch grown under enriched CO₂ atmospheres. *Functional Ecology*, v. 9, p. 306-311, 1995.
- Maeda, H. & Dudavera, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Reviews of Plant Biology*, v. 63, p. 73-105, 2012.
- Marais, J.P.J.; Deavours, B.; Dixon, R.A. & Ferreira, D. The stereochemistry of flavonoids. In: Grotewold E, (ed.). *The science of flavonoids* - Berlin, p. 1-46, 2006.

- McKee, I.F.; Eiblmeier, M. & Polle A. Enhanced ozone tolerance in wheat grown at an elevated CO₂ concentration: ozone exclusion and detoxification. *The New Phytologist*, v. 137, p. 275-284, 1997.
- McKee, I.F.; Mulholland, B.J.; Craigan, J.; Black, C.R. & Long, S.P. Elevated concentrations of atmospheric CO₂ protect against and compensate for O₃ damage to photosynthetic tissues of field-grown wheat. *The New Phytologist*, v. 146, p. 427-435, 2000.
- McKiernan, A. B.; O'Reilly-Wapstra, J.M.; Price, C.; Davies, N. W.; Potts, B.M. & Hovenden, M.J. Stability of plant defensive traits among populations in two *Eucalyptus* species under elevated carbon dioxide. *Journal of Chemical Ecology*, v. 38, p. 204-212, 2012.
- Mehler, A.H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 33, p. 65-77, 1951.
- Melidou, M.; Riganakos, K. & Galaris, D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 39, p. 1591-1600, 2005.
- Monaghan, P.; Metcalfe, N.B. & Torres, R. Oxidative stress as a mediator of life history trades-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, v. 12, p. 75-92, 2009.
- Moraes, R.M.; Furlan, C.M.; Meirelles, S.T.; Santos, D.Y.A.C.; Souza, S.R.; Viola, S.R.A.; Rezende, F.M.; Barbosa, J.M. & Domingos, R.L. Avaliação da sensibilidade da goiabeira 'Pedro Sato' ao ozônio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, p. 971-978, 2011.
- Moraes, R.M.; Klumpp, A.; Furlan, C.M.; Klumpp, G.; Domingos, M.; Rinaldi, M.C.S. & Modesto, I.F. Tropical fruit trees as bioindicators of industrial air pollution in southeast Brazil. *Environment International*, v. 28, p. 367-374, 2002.
- Patel, R.P.; McAndrew, J.; Sellak, H.; White, C.R.; Jo, H.; Freeman, B.A. & Darley-Usmar, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1411, p.385-400, 1999.
- Peltonen, P.A.; Vapaavuori, E. & Julkunen-tiitto, R. Accumulation of phenolic compounds in birch leaves is changed by elevated carbon dioxide and ozone. *Global Change Biology*, v. 11, p. 1305-1324, 2005.
- Peñuelas, J.; Estiarte, M.; Kimball, B.A.; Idso, S.B.; Pinter, P.J.; Wall, G.W.; Garcia, R.L.; Hansaker, D.J.; Lamorte, R.L., & Hendrix, D.L. Variety of responses of plant phenolic concentration to CO₂ enrichment. *Journal of Experimental Botany*, v. 47, p. 1463-1467, 1996.
- Polster, J.; Dithmar, H.; Burgemeister, R.; Friedemann, G. & Feucht, W. Flavonoids in plant nuclei: detection by laser microdissection and pressure catapulting (LMPC), in vivo staining, and UV-visible spectroscopic titration. *Physiologia Plantarum*, v. 128, p. 163-174, 2006.
- Porter, N.A. Chemistry of Lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v.105, p.273-282, 1984.
- Posch, S.; Warren, C.R.; Adams, M.A. & Guttenberger, H. Photoprotective carotenoids and antioxidants are more affected by canopy position than by nitrogen supply in 21-year-old *Pinus radiata*. *Functional Plant Biology*, v. 35, p. 470-482, 2008.

- Prabhu, P.R. & Hudson, A.O. Identification and partial characterization of an L-tyrosine aminotransferase (TAT) from *Arabidopsis thaliana*. Biochemistry Research International, ID-549572, 2010.
- Prabu, G.R.; Gnanamani, A. & Sadulla, S. Guaijaverin a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. Journal of Applied Microbiology, v. 101, p. 487-495, 2006.
- Qiu, Q.S.; Huber, J.L.; Booker, F.L.; Jain, V.; Leahey, A.D.B.; Fiscus, E.L.; Yau, P.M.; Ort, D.R. & Huber, S.C. Increased protein carbonylation in leaves of *Arabidopsis* and soybean in response to elevated [CO₂]. Photosynthesis Research, v. 97, p. 155-166, 2008.
- Raab, M.M. & Weinstein, L.H. Polyamine and ethylene metabolism in *Triticum aestivum* (var. vona). In Flores, H.E.; Arteca, R.N. & Shannon, J.C., eds, Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions. American Society of Plant Physiologists, pp 408-410, 1990.
- Rao, M.V. & De Kok, L.J. Interactive effects of high CO₂ and SO₂ on growth and antioxidant levels in wheat. Phytion Annales Rei Botanicae, v. 34, p. 279-290, 1994.
- Razal, R.A.; Ellis, S.; Singh, S.; Lewis, N.G. & Towers, G.H.N. Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. Phytochemistry, v. 41, p. 31-35, 1996.
- Rezende, F.M. & Furlan, C.M. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. Chemosphere, v. 76, p. 1445-1450, 2009.
- Robinson, J.M. & Sicher, R.C. Antioxidant levels decrease in primary leaves of barley during growth at ambient and elevated carbon dioxide levels. International Journal of Plant Sciences, v. 165, p. 965-972, 2004.
- Rowland-Bamford, A.J.; Borland, A.M.; Lea, P.J. & Mansfield, T.A. The role of arginine decarboxylase in modulating the sensitivity of barley to ozone. Environmental Pollution, v. 61, p. 95-106, 1989.
- Sandermann, H.; Schmitt, R.; Heller, W.; Rosemann, D. & Langebartels, C. Ozone-induced early biochemical reactions in conifers. In Longhurst, J.W.S., ed, Acid Deposition. Sources, Effects and Controls. British Library, London, p 243-254, 1989.
- Sies, H. Strategies of antioxidant defense. European Journal of Biochemistry, v. 215, p. 213-219, 1993.
- Silveira, V.; Floh, E.I.S.; Handro, W. & Guerra, M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 76; p. 53-60, 2004.
- Sircelj, H.; Tausz, M.; Grill, D. & Batic, F. Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. Journal of Plant Physiology, v. 162, p. 1308-1318, 2005.
- Smith, T.A. Polyamines. Annual Review Plant Physiology, v. 36, p. 117-143, 1985.
- Tadolini, B. Polyamine inhibition of lipoperoxidation. Biochemical Journal, v. 249, p. 33-36, 1988.
- Takahashi, T. & Kakehi, J.I. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. Annals of Botany, v. 105, p. 1-6, 2010.

- Tallis, M.J.; Lin, Y.; Rogers, A.; Zhang, J.; Street, N.R.; Miglietta, F.; Karnosky, D.F.; De Angelis, P.; Calfapietra, C. & Taylor, G. The transcriptome of *Populus* in elevated CO₂ reveals increased anthocyanin biosynthesis during delayed autumnal senescence. *New Phytologist*, v. 186, p. 415-428, 2010.
- Tausz-Posch, S.; Borowiak, K.; Dempsey, R.W.; Norton, R.M.; Seneweera, S.; Fitzgerald, G.J. & Tausz, M. The effect of elevated CO₂ on photochemistry and antioxidative defence capacity in wheat depends on environmental growing conditions- A FACE study. *Environmental and Experimental Botany*, v. 88, p. 81-92, 2013.
- Tegelberg, R.; Julkunen-Tiitto, R.; Vartiainen, M.; Paunonen, R.; Rousi, M. & Kellomäki, S. Exposures to elevated CO₂, elevated temperature and enhanced UV-B radiation modify activities of polyphenol oxidase and guaiacol peroxidase and concentrations of chlorophylls, polyamines and soluble proteins in the leaves of *Betula pendula* seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, v. 62, p. 308-315, 2008.
- Tun, N.N.; Santa-Catarina, C.; Begum, T.; Silveira, V.; Handro, S.; Floh, E.L.S. & Scherer, G.F.E. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiology*, v. 47, p. 346-354, 2006.
- Urano, K.; Hobo, T. & Shinozaki, K. *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Letters*, v. 579, p. 1557-1564, 2005.
- Urano, K.; Yoshida, Y.; Nanjo, T.; Ito, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 313, p. 369-375, 2004.
- Vanderauwera, S.; Zimmermann, P.; Rombauts, S.; Vandenabeele, S.; Langebartels, C.; Grisebach, W.; Inzé, D. & Van Breusegem, F. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology*, v. 139, p. 806-821, 2005.
- Verma, S. & Mishra, S.N. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology*, v. 162, p. 669-677, 2005.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. *Phenolic Compound Biochemistry*. Editora Springer. 2006. 285p.
- Walden, R.; Cordeiro, A. & Tiburcio, A.F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiology*, v. 113, p. 1009-1013, 1997.
- Watanabe, T.; Rozane, D.E.; Natale, W. & Furlan, C.M. Avaliação da influência de substâncias fenólicas e carotenoides na anomalia do epicarpo da goiaba, "anelamento". *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 1, p. 008-013, 2011.
- Weiss, U. Early research on the shikimate pathway: some personal remarks and reminiscences. In Conn, E.E., ed., *The Shikimic Acid Pathway, Recent Advances in Phytochemistry*, v. 20, p. 1-12, 1986.

- Wu, G.; Chen, F.J.; Ge, F. & Xiao, N.W. Impacts of elevated CO₂ on expression of plant defensive compounds in Bt-transgenic cotton in response to infestation by cotton bollworm. *Agricultural and Forest Entomology*, v. 13, p. 77-82, 2011.
- Wustman, B.A.; Oksanen, E.; Karnosky, D.F.; Noormets, A.; Isebrands, J.G.; Pregitzer, K.S.; Hendrey, G.R.; Sober, J. & Podila, G.K. Effects of elevated CO₂ and O₃ on aspen clones varying in O₃ sensitivity: can CO₂ ameliorate the harmful effects of O₃? *Environmental Pollution*, v. 115, p. 473-481, 2001.
- Zhao, J. & Dixon, R.A. The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, v.15, n.2, p. 72-80, 2009.
- Zvereva, E. L. & Kozlov, M. V. Consequences of simultaneous elevation of carbon dioxide and temperature for plant–herbivore interactions: a metaanalysis. *Global Change Biology*, v. 12, p. 27-41, 2006.

Capítulo 4- Considerações finais

A alta disponibilidade de carbono para mudas de *Psidium guajava* cv. Pedro Sato caracterizou acúmulo de substâncias provenientes do metabolismo primário (como amido), bem como uma tendência no incremento em biomassa, e aumento na razão C/N. Aparentemente, a maior disponibilidade de carbono não resultou em um incremento notável em crescimento, mas sim em acúmulo de substâncias carbonadas não estruturais. A pouca alocação de biomassa da planta pode ser relacionada com a pouca quantidade de açúcares solúveis, como glicose e sacarose, que são translocadas entre compartimentos celulares e órgãos. Os resultados sugerem pouca translocação entre os órgãos, de forma que grandes quantidades de amido são acumuladas na folha, o órgão fonte. Esse amido transitório, armazenado na folha, poderá ser degradado gerando substratos para a síntese de sacarose, este açúcar proverá esqueleto tanto para células foliares, quanto para tecidos não fotossintetizantes.

Quanto aos metabólitos secundários, observou-se uma tendência no acúmulo de substâncias fenólicas, para todas as classes analisadas em tecido foliar, sendo os taninos os únicos a apresentarem incremento significativo em seu conteúdo como um efeito do tratamento de elevado CO₂, e isso após 90 dias de fumigação. Essas substâncias são importantes na defesa contra ERO e, apesar desse aumento indicar alterações de defesas antioxidantes, analisando outras substâncias com papéis importantes nesse processo (como poliaminas, AA e GSH), não foram observadas alterações no estado redox das plantas. Se por um lado houve aumento no conteúdo de taninos, tendência ao aumento de flavonoides, proantocianidinas e fenóis, e alterações nas quantidades de algumas poliaminas na forma livre, por outro lado, não foram encontrados desbalanços nos níveis de AA, GSH e poliaminas conjugadas.

As análises de doseamento de substâncias fenólicas em caules e raízes foram antagônicas ao final do experimento (após 3 meses de fumigação). Como efeito do tratamento, foi observada redução no teor de taninos totais e proantocianidinas e aumento no teor de fenóis e flavonoides totais no caule. O inverso foi observado para as raízes. As análises de fração de massa sugerem que, ao final do experimento, ocorra uma menor alocação de massa para a raiz, o que coincide com a redução de fenóis totais observada nesse órgão. Para a raiz, este foi o componente majoritário, sugerindo uma importância de substâncias fenólicas como defesas químicas desse órgão. Para algumas espécies vegetais, já se tem relatada a importância dessas substâncias fenólicas presentes na raiz como defesas antimicrobianas. Para outras espécies, substâncias fenólicas são exsudadas e tem efeito alelopático. A produção de metabólitos secundários parece se relacionar com a alocação de massa entre os órgãos vegetais.

Foram analisadas as correlações entre as 46 variáveis aqui estudadas. A tabela 4.1 traz os coeficientes de correlação entre as variáveis, mostrando em negrito as correlações que se mostraram significativas ($p < 0,05$). Algumas correlações são especialmente interessantes para serem discutidas. Os teores de carbono apresentam correlação significativa com a massa seca de folhas e massa seca total, porém, interessante, essa correlação é negativa, mesmo se observarmos os coeficientes encontrados entre esse parâmetro e a massa seca de caules e raízes. Esse resultado sugere, mais uma vez, que a goiabeira parece não alocar o carbono excedente em substâncias carbonadas estruturais. De certa forma, as correlações positivas entre os teores de amido em folhas e as massas secas de caule e raízes, podem indicar que há intensa produção de amido e, que este, além de se acumular, também é metabolizado em glicose e sacarose que são translocadas para os órgãos dreno, mas não são estocados na forma de amido. As correlações positivas encontradas para os teores de carbono em folhas e todas as classes analisadas de substâncias fenólicas, tanto em folha quanto em caules, e as correlações positivas entre os teores de amido em folha e todas as classes de substâncias fenólicas analisadas em caules e raízes, embora algumas não significativas, sugerem que o carbono excedente deve ser estocado na forma de substâncias secundárias nesta espécie. Isso pode ser novamente suposto, se analisarmos as correlações positivas entre as massas secas de caules e raízes e os teores de substâncias fenólicas, onde há correlações positivas e significantes entre esses parâmetros. Para o caule, a massa seca produzida parece estar diretamente relacionada ao acúmulo de taninos e substâncias fenólicas em geral (fenóis totais). Já, para a raiz, a massa seca parece se relacionar, principalmente, ao acúmulo de flavonoides e ligninas.

A análise de componente principal com todas as 46 variáveis analisadas nesse trabalho revelou que 36% da variabilidade encontrada nos dados pode ser explicada pelos eixos 1 e 2. Ao longo do eixo 1, estão distribuídas as amostras de acordo com as coletas (tempo de exposição). No lado negativo desse eixo, estão posicionadas as amostras coletadas aos 30 dias de fumigação e, no lado positivo, encontram-se as amostras coletadas após 90 dias. A distribuição das amostras ao longo deste eixo foi influenciada, principalmente, pelos valores de massa seca de caule e raiz, amido no caule e alguns flavonoides quantificados em folhas (rutina, o flavonoide 3 e guajaverina).

Tabela 4.1- Correlações de Pearson entre as 46 variáveis analisadas neste estudo: Em negrito, correlações significativas ($p < 0,05$). Em destaque as correlações discutidas no texto.

	C-F	C-R	C-C	MS-R	MS-C	MS-F	MS-T	Am-F	Am-C	Am-R	AçS-R	AçS-C
C-F		-0,156	0,213	-0,212	-0,211	-0,504	-0,555	-0,046	-0,498	-0,263	-0,573	0,154
C-R	-0,156		0,094	-0,118	0,161	0,294	0,474	-0,133	0,610	0,372	0,191	0,312
C-C	0,213	0,094		-0,178	0,038	-0,195	-0,127	0,193	-0,264	-0,214	-0,049	0,224
MS-R	-0,212	-0,118	-0,178		0,745	0,516	0,033	0,758	0,321	-0,472	-0,179	-0,374
MS-C	-0,211	0,161	0,038	0,745		0,622	0,389	0,543	0,163	-0,329	0,021	-0,095
MS-F	-0,504	0,294	-0,195	0,516	0,622		0,543	0,196	0,427	-0,028	0,465	0,049
MS-T	-0,555	0,474	-0,127	0,033	0,389	0,543		0,070	0,360	0,174	0,601	0,060
Am-F	-0,046	-0,133	0,193	0,758	0,543	0,196	0,070		0,197	-0,477	-0,182	-0,443
Am-C	-0,498	0,610	-0,264	0,321	0,163	0,427	0,360	0,197		0,223	0,193	-0,136
Am-R	-0,263	0,372	-0,214	-0,472	-0,329	-0,028	0,174	-0,477	0,223		0,397	0,301
AçS-R	-0,573	0,191	-0,049	-0,179	0,021	0,465	0,601	-0,182	0,193	0,397		0,009
AçS-C	0,154	0,312	0,224	-0,374	-0,095	0,049	0,060	-0,443	-0,136	0,301	0,009	
AçS-F	-0,177	-0,581	-0,247	0,196	0,068	0,104	0,061	0,247	-0,132	-0,149	0,113	-0,259
FT-F	0,298	0,323	-0,017	-0,268	-0,096	0,104	0,066	-0,139	-0,012	0,184	0,023	0,459
FIT-F	0,158	-0,108	-0,141	-0,547	-0,508	-0,373	-0,154	-0,419	-0,393	0,457	-0,119	0,392
TT-F	0,226	0,122	-0,257	0,152	0,359	0,240	0,257	0,195	-0,138	-0,083	-0,077	0,223
PrT-F	0,197	0,141	-0,376	0,186	0,357	0,246	0,321	0,174	-0,040	-0,113	-0,079	0,188
Lig-F	0,397	-0,551	-0,499	0,078	-0,323	-0,394	-0,493	-0,048	-0,234	-0,223	-0,381	-0,337
FT-C	0,266	-0,254	0,161	0,258	0,471	-0,047	-0,102	0,215	-0,503	-0,455	-0,308	0,110
FIT-C	0,394	-0,067	0,049	0,143	0,192	-0,026	-0,100	0,109	-0,401	-0,311	-0,091	0,023
PrT-C	0,157	-0,195	-0,108	0,589	0,507	0,043	0,013	0,711	0,022	-0,435	-0,254	-0,574
TT-C	0,161	0,000	-0,354	0,560	0,466	-0,018	-0,010	0,447	0,144	-0,247	-0,333	-0,465
Lig-C	-0,211	0,036	-0,012	-0,359	-0,204	-0,325	0,046	-0,501	-0,053	0,312	0,044	0,212
FT-R	0,257	-0,267	0,063	0,260	0,080	-0,402	-0,380	0,282	-0,217	-0,128	-0,308	-0,208
FIT-R	0,075	-0,100	0,003	0,587	0,567	-0,020	-0,177	0,487	-0,061	-0,189	-0,204	-0,350
PrT-R	-0,231	-0,025	0,083	0,342	0,219	-0,152	0,012	0,322	0,078	-0,193	0,036	-0,553
TT-R	-0,338	-0,237	-0,001	0,361	0,180	-0,119	0,038	0,307	0,004	-0,318	0,066	-0,623
Lig-R	-0,233	-0,061	-0,045	0,487	0,482	0,269	0,012	0,266	0,206	-0,179	0,178	-0,396
AA	0,185	0,550	0,207	-0,062	-0,053	-0,013	-0,056	-0,132	0,222	-0,021	-0,100	0,153
GSH	0,197	0,262	0,034	-0,383	-0,218	-0,440	0,072	-0,219	0,055	0,444	-0,104	0,151
GSSG	-0,182	0,292	-0,280	-0,110	0,095	0,072	0,041	-0,321	0,050	0,414	0,160	0,273
PUT	-0,015	0,370	-0,109	-0,073	0,285	0,458	0,394	-0,286	0,063	-0,014	0,216	-0,014
PUT-conj	-0,061	-0,326	-0,071	-0,028	-0,128	-0,015	-0,053	0,074	0,028	-0,016	0,138	-0,038
SPD	-0,313	0,236	0,225	-0,274	-0,055	0,273	0,254	-0,443	0,175	0,206	0,245	0,508
SPD-conj	0,498	-0,100	0,064	0,081	0,152	0,256	-0,171	-0,026	-0,185	-0,397	-0,106	-0,182
SPM	-0,321	-0,100	0,230	0,360	0,416	0,265	0,083	0,217	0,081	-0,216	0,194	-0,181
SPM-conj	0,188	0,031	-0,161	0,362	0,418	0,525	-0,074	0,071	-0,053	-0,314	-0,116	-0,125
Fl 1	0,026	-0,208	0,087	0,578	0,571	0,248	0,196	0,612	-0,019	-0,253	0,051	-0,265
Rut	-0,171	0,077	-0,199	0,654	0,670	0,617	0,334	0,455	0,301	-0,007	0,127	-0,034
Fl3	-0,178	0,186	-0,106	0,671	0,634	0,602	0,300	0,572	0,438	-0,104	0,072	-0,049
Qxil	-0,299	0,256	-0,177	0,586	0,577	0,625	0,419	0,441	0,398	0,129	0,226	0,049
Qara	-0,173	0,152	-0,174	0,671	0,656	0,591	0,333	0,503	0,317	0,045	0,137	-0,028
Qram	-0,284	0,058	0,023	0,336	0,431	0,545	0,422	0,328	0,080	0,117	0,365	-0,039
N-F	0,369	-0,210	-0,016	-0,236	-0,613	-0,517	-0,783	-0,284	-0,093	0,114	-0,299	-0,049
N-R	0,203	-0,082	0,282	-0,574	-0,510	-0,277	-0,090	-0,455	-0,524	-0,051	0,039	0,226
N-C	0,207	-0,544	-0,192	0,187	-0,280	-0,187	-0,590	0,132	-0,142	-0,222	-0,280	-0,547

Tabela 4.1- continuação.

	AçS-F	FT-F	FIT-F	TT-F	PrT-F	Lig-F	FT-C	FIT-C	PrT-C	TT-C	Lig-C	FT-R
C-F	-0,177	0,298	0,158	0,226	0,197	0,397	0,266	0,394	0,157	0,161	-0,211	0,257
C-R	-0,581	0,323	-0,108	0,122	0,141	-0,551	-0,254	-0,067	-0,195	0,000	0,036	-0,267
C-C	-0,247	-0,017	-0,141	-0,257	-0,376	-0,499	0,161	0,049	-0,108	-0,354	-0,012	0,063
MS-R	0,196	-0,268	-0,547	0,152	0,186	0,078	0,258	0,143	0,589	0,560	-0,359	0,260
MS-C	0,068	-0,096	-0,508	0,359	0,357	-0,323	0,471	0,192	0,507	0,466	-0,204	0,080
MS-F	0,104	0,104	-0,373	0,240	0,246	-0,394	-0,047	-0,026	0,043	-0,018	-0,325	-0,402
MS-T	0,061	0,066	-0,154	0,257	0,321	-0,493	-0,102	-0,100	0,013	-0,010	0,046	-0,380
Am-F	0,247	-0,139	-0,419	0,195	0,174	-0,048	0,215	0,109	0,711	0,447	-0,501	0,282
Am-C	-0,132	-0,012	-0,393	-0,138	-0,040	-0,234	-0,503	-0,401	0,022	0,144	-0,053	-0,217
Am-R	-0,149	0,184	0,457	-0,083	-0,113	-0,223	-0,455	-0,311	-0,435	-0,247	0,312	-0,128
AçS-R	0,113	0,023	-0,119	-0,077	-0,079	-0,381	-0,308	-0,091	-0,254	-0,333	0,044	-0,308
AçS-C	-0,259	0,459	0,392	0,223	0,188	-0,337	0,110	0,023	-0,574	-0,465	0,212	-0,208
AçS-F		-0,086	0,167	0,146	0,123	0,155	0,142	-0,152	0,307	0,124	-0,226	-0,126
F T-F	-0,086		0,527	0,701	0,660	-0,196	0,132	0,325	-0,007	-0,100	-0,532	-0,529
FIT-F	0,167	0,527		0,363	0,275	0,045	0,131	0,171	-0,218	-0,177	-0,035	-0,246
TT-F	0,146	0,701	0,363		0,959	-0,045	0,532	0,506	0,417	0,307	-0,529	-0,257
PrT-F	0,123	0,660	0,275	0,959		0,061	0,488	0,462	0,445	0,374	-0,484	-0,245
Lig-F	0,155	-0,196	0,045	-0,045	0,061		0,007	0,195	0,236	0,344	-0,083	0,289
FT-C	0,142	0,132	0,131	0,532	0,488	0,007		0,664	0,517	0,415	-0,235	0,221
FIT-C	-0,152	0,325	0,171	0,506	0,462	0,195	0,664		0,372	0,393	-0,493	0,180
PrT-C	0,307	-0,007	-0,218	0,417	0,445	0,236	0,517	0,372		0,829	-0,503	0,185
TT-C	0,124	-0,100	-0,177	0,307	0,374	0,344	0,415	0,393	0,829		-0,227	0,317
Lig-C	-0,226	-0,532	-0,035	-0,529	-0,484	-0,083	-0,235	-0,493	-0,503	-0,227		0,196
FT-R	-0,126	-0,529	-0,246	-0,257	-0,245	0,289	0,221	0,180	0,185	0,317	0,196	
FIT-R	0,012	-0,347	-0,320	0,101	0,102	0,103	0,545	0,342	0,618	0,667	-0,086	0,706
PrT-R	0,007	-0,563	-0,307	-0,278	-0,270	0,075	0,189	0,274	0,324	0,434	0,062	0,511
TT-R	0,168	-0,600	-0,285	-0,321	-0,305	0,137	0,138	0,219	0,280	0,365	0,088	0,378
Lig-R	-0,025	-0,438	-0,668	-0,186	-0,159	0,026	-0,018	-0,060	0,117	0,100	0,039	0,324
AA	-0,948	0,054	-0,310	-0,182	-0,131	-0,094	-0,167	0,217	-0,226	-0,053	0,086	0,160
GSH	-0,261	-0,024	0,166	-0,160	-0,132	-0,216	-0,191	-0,217	-0,160	0,060	0,509	0,305
GSSG	-0,115	0,404	0,383	0,334	0,273	-0,088	0,107	0,189	-0,098	0,161	0,048	-0,232
PUT	-0,001	0,305	-0,018	0,247	0,252	-0,364	0,106	0,177	0,031	0,119	-0,169	-0,467
PUT-conj	0,040	0,105	-0,117	-0,025	0,018	0,284	-0,275	-0,224	-0,025	-0,243	-0,043	-0,272
SPD	-0,035	0,102	0,040	-0,252	-0,188	-0,388	-0,212	-0,407	-0,533	-0,538	0,297	-0,594
SPD-conj	0,049	0,176	-0,267	0,128	0,109	0,088	0,110	0,245	0,158	0,040	-0,432	-0,158
SPM	0,332	-0,367	-0,395	-0,319	-0,327	-0,119	0,008	-0,186	0,128	0,146	0,094	-0,121
SPM-conj	0,102	0,117	-0,198	0,297	0,240	-0,057	0,307	0,278	0,249	0,241	-0,442	-0,042
Fl 1	0,227	-0,213	-0,382	0,165	0,245	0,115	0,382	0,267	0,638	0,447	-0,308	0,295
Rut	0,183	0,084	-0,324	0,266	0,363	-0,096	0,048	-0,009	0,338	0,307	-0,314	-0,010
Fl3	0,157	0,258	-0,302	0,350	0,427	-0,144	0,092	0,113	0,392	0,297	-0,580	-0,060
Qxil	0,023	0,158	-0,212	0,322	0,365	-0,277	-0,040	0,064	0,140	0,128	-0,328	0,034
Qara	0,016	0,088	-0,301	0,308	0,374	-0,157	0,046	0,092	0,316	0,296	-0,298	0,087
Qram	-0,026	-0,090	-0,260	0,139	0,126	-0,395	-0,047	-0,055	0,012	-0,180	-0,124	0,129
N-F	-0,110	0,102	0,279	-0,318	-0,317	0,363	-0,209	-0,023	-0,173	-0,059	0,055	0,104
N-R	-0,253	0,140	0,432	-0,058	-0,162	-0,077	0,022	0,339	-0,475	-0,486	0,087	-0,167
N-C	0,054	-0,238	-0,130	-0,324	-0,315	0,548	-0,331	-0,147	0,101	0,036	-0,098	0,122

Tabela 4.1- continuação.

	FIT-R	PrT-R	TT-R	Lig-R	AA	GSH	GSSG	PUT	PUT-conj	SPD	SPD-conj	SPM
C-F	0,075	-0,231	-0,338	-0,233	0,185	0,197	-0,182	-0,015	-0,061	-0,313	0,498	-0,321
C-R	-0,100	-0,025	-0,237	-0,061	0,550	0,262	0,292	0,370	-0,326	0,236	-0,100	-0,100
C-C	0,003	0,083	-0,001	-0,045	0,207	0,034	-0,280	-0,109	-0,071	0,225	0,064	0,230
MS-R	0,587	0,342	0,361	0,487	-0,062	-0,383	-0,110	-0,073	-0,028	-0,274	0,081	0,360
MS-C	0,567	0,219	0,180	0,482	-0,053	-0,218	0,095	0,285	-0,128	-0,055	0,152	0,416
MS-F	-0,020	-0,152	-0,119	0,269	-0,013	-0,440	0,072	0,458	-0,015	0,273	0,256	0,265
MS-T	-0,177	0,012	0,038	0,012	-0,056	0,072	0,041	0,394	-0,053	0,254	-0,171	0,083
Am-F	0,487	0,322	0,307	0,266	-0,132	-0,219	-0,321	-0,286	0,074	-0,443	-0,026	0,217
Am-C	-0,061	0,078	0,004	0,206	0,222	0,055	0,050	0,063	0,028	0,175	-0,185	0,081
Am-R	-0,189	-0,193	-0,318	-0,179	-0,021	0,444	0,414	-0,014	-0,016	0,206	-0,397	-0,216
AçS-R	-0,204	0,036	0,066	0,178	-0,100	-0,104	0,160	0,216	0,138	0,245	-0,106	0,194
AçS-C	-0,350	-0,553	-0,623	-0,396	0,153	0,151	0,273	-0,014	-0,038	0,508	-0,182	-0,181
AçS-F	0,012	0,007	0,168	-0,025	-0,948	-0,261	-0,115	-0,001	0,040	-0,035	0,049	0,332
F T-F	-0,347	-0,563	-0,600	-0,438	0,054	-0,024	0,404	0,305	0,105	0,102	0,176	-0,367
FIT-F	-0,320	-0,307	-0,285	-0,668	-0,310	0,166	0,383	-0,018	-0,117	0,040	-0,267	-0,395
TT-F	0,101	-0,278	-0,321	-0,186	-0,182	-0,160	0,334	0,247	-0,025	-0,252	0,128	-0,319
PrT-F	0,102	-0,270	-0,305	-0,159	-0,131	-0,132	0,273	0,252	0,018	-0,188	0,109	-0,327
Lig-F	0,103	0,075	0,137	0,026	-0,094	-0,216	-0,088	-0,364	0,284	-0,388	0,088	-0,119
FT-C	0,545	0,189	0,138	-0,018	-0,167	-0,191	0,107	0,106	-0,275	-0,212	0,110	0,008
FIT-C	0,342	0,274	0,219	-0,060	0,217	-0,217	0,189	0,177	-0,224	-0,407	0,245	-0,186
PrT-C	0,618	0,324	0,280	0,117	-0,226	-0,160	-0,098	0,031	-0,025	-0,533	0,158	0,128
TT-C	0,667	0,434	0,365	0,100	-0,053	0,060	0,161	0,119	-0,243	-0,538	0,040	0,146
Lig-C	-0,086	0,062	0,088	0,039	0,086	0,509	0,048	-0,169	-0,043	0,297	-0,432	0,094
FT-R	0,706	0,511	0,378	0,324	0,160	0,305	-0,232	-0,467	-0,272	-0,594	-0,158	-0,121
FIT-R		0,638	0,449	0,500	-0,015	0,003	0,034	-0,133	-0,371	-0,505	-0,039	0,187
PrT-R	0,638		0,922	0,496	0,029	-0,060	-0,042	-0,115	-0,414	-0,334	-0,211	0,341
TT-R	0,449	0,922		0,450	-0,104	-0,146	-0,053	-0,093	-0,243	-0,281	-0,204	0,429
Lig-R	0,500	0,496	0,450		0,022	-0,230	-0,062	-0,070	0,112	-0,097	0,152	0,351
AA	-0,015	0,029	-0,104	0,022		0,193	-0,025	0,043	-0,068	-0,042	0,068	-0,332
GSH	0,003	-0,060	-0,146	-0,230	0,193		-0,080	0,051	-0,216	-0,071	-0,169	-0,386
GSSG	0,034	-0,042	-0,053	-0,062	-0,025	-0,080		0,131	0,004	-0,009	-0,344	0,166
PUT	-0,133	-0,115	-0,093	-0,070	0,043	0,051	0,131		-0,425	0,245	0,608	0,067
PUT-conj	-0,371	-0,414	-0,243	0,112	-0,068	-0,216	0,004	-0,425		0,107	-0,103	0,024
SPD	-0,505	-0,334	-0,281	-0,097	-0,042	-0,071	-0,009	0,245	0,107		-0,025	0,314
SPD-conj	-0,039	-0,211	-0,204	0,152	0,068	-0,169	-0,344	0,608	-0,103	-0,025		-0,041
SPM	0,187	0,341	0,429	0,351	-0,332	-0,386	0,166	0,067	0,024	0,314	-0,041	
SPM-conj	0,235	-0,114	-0,154	0,098	0,016	-0,299	-0,045	0,622	-0,433	-0,191	0,733	-0,020
Fl 1	0,588	0,321	0,234	0,358	-0,173	-0,148	-0,388	-0,096	0,053	-0,103	0,124	0,234
Rut	0,319	-0,035	-0,048	0,367	-0,139	-0,107	-0,051	0,169	0,098	0,140	0,152	0,281
Fl3	0,284	0,023	-0,016	0,343	-0,072	-0,244	-0,001	0,127	0,094	0,068	0,132	0,208
Qxil	0,259	0,070	0,023	0,408	0,010	-0,047	0,003	0,093	-0,007	0,049	-0,008	0,042
Qara	0,375	0,046	-0,002	0,398	0,021	-0,024	-0,057	0,089	0,060	0,010	0,077	0,115
Qram	0,194	-0,010	-0,052	0,374	0,035	0,053	-0,359	0,094	-0,020	-0,008	0,130	-0,171
N-F	-0,051	0,000	-0,015	-0,114	0,110	0,118	0,061	-0,203	0,006	-0,013	0,070	-0,094
N-R	-0,482	-0,066	0,031	-0,410	0,242	0,028	-0,091	0,153	-0,165	0,065	0,126	-0,342
N-C	-0,034	-0,029	0,126	0,159	0,013	-0,162	-0,261	-0,224	0,361	-0,284	0,286	0,009

Tabela 4.1- continuação.

	SPM- conj	FI 1	Rut	FI3	Qxil	Qara	Qram	N-F	N-R	N-C
C-F	0,188	0,026	-0,171	-0,178	-0,299	-0,173	-0,284	0,369	0,203	0,207
C-R	0,031	-0,208	0,077	0,186	0,256	0,152	0,058	-0,210	-0,082	-0,544
C-C	-0,161	0,087	-0,199	-0,106	-0,177	-0,174	0,023	-0,016	0,282	-0,192
MS-R	0,362	0,578	0,654	0,671	0,586	0,671	0,336	-0,236	-0,574	0,187
MS-C	0,418	0,571	0,670	0,634	0,577	0,656	0,431	-0,613	-0,510	-0,280
MS-F	0,525	0,248	0,617	0,602	0,625	0,591	0,545	-0,517	-0,277	-0,187
MS-T	-0,074	0,196	0,334	0,300	0,419	0,333	0,422	-0,783	-0,090	-0,590
Am-F	0,071	0,612	0,455	0,572	0,441	0,503	0,328	-0,284	-0,455	0,132
Am-C	-0,053	-0,019	0,301	0,438	0,398	0,317	0,080	-0,093	-0,524	-0,142
Am-R	-0,314	-0,253	-0,007	-0,104	0,129	0,045	0,117	0,114	-0,051	-0,222
AçS-R	-0,116	0,051	0,127	0,072	0,226	0,137	0,365	-0,299	0,039	-0,280
AçS-C	-0,125	-0,265	-0,034	-0,049	0,049	-0,028	-0,039	-0,049	0,226	-0,547
AçS-F	0,102	0,227	0,183	0,157	0,023	0,016	-0,026	-0,110	-0,253	0,054
F T-F	0,117	-0,213	0,084	0,258	0,158	0,088	-0,090	0,102	0,140	-0,238
FIT-F	-0,198	-0,382	-0,324	-0,302	-0,212	-0,301	-0,260	0,279	0,432	-0,130
TT-F	0,297	0,165	0,266	0,350	0,322	0,308	0,139	-0,318	-0,058	-0,324
PrT-F	0,240	0,245	0,363	0,427	0,365	0,374	0,126	-0,317	-0,162	-0,315
Lig-F	-0,057	0,115	-0,096	-0,144	-0,277	-0,157	-0,395	0,363	-0,077	0,548
FT-C	0,307	0,382	0,048	0,092	-0,040	0,046	-0,047	-0,209	0,022	-0,331
FIT-C	0,278	0,267	-0,009	0,113	0,064	0,092	-0,055	-0,023	0,339	-0,147
PrT-C	0,249	0,638	0,338	0,392	0,140	0,316	0,012	-0,173	-0,475	0,101
TT-C	0,241	0,447	0,307	0,297	0,128	0,296	-0,180	-0,059	-0,486	0,036
Lig-C	-0,442	-0,308	-0,314	-0,580	-0,328	-0,298	-0,124	0,055	0,087	-0,098
FT-R	-0,042	0,295	-0,010	-0,060	0,034	0,087	0,129	0,104	-0,167	0,122
FIT-R	0,235	0,588	0,319	0,284	0,259	0,375	0,194	-0,051	-0,482	-0,034
PrT-R	-0,114	0,321	-0,035	0,023	0,070	0,046	-0,010	0,000	-0,066	-0,029
TT-R	-0,154	0,234	-0,048	-0,016	0,023	-0,002	-0,052	-0,015	0,031	0,126
Lig-R	0,098	0,358	0,367	0,343	0,408	0,398	0,374	-0,114	-0,410	0,159
AA	0,016	-0,173	-0,139	-0,072	0,010	0,021	0,035	0,110	0,242	0,013
GSH	-0,299	-0,148	-0,107	-0,244	-0,047	-0,024	0,053	0,118	0,028	-0,162
GSSG	-0,045	-0,388	-0,051	-0,001	0,003	-0,057	-0,359	0,061	-0,091	-0,261
PUT	0,622	-0,096	0,169	0,127	0,093	0,089	0,094	-0,203	0,153	-0,224
PUT-conj	-0,433	0,053	0,098	0,094	-0,007	0,060	-0,020	0,006	-0,165	0,361
SPD	-0,191	-0,103	0,140	0,068	0,049	0,010	-0,008	-0,013	0,065	-0,284
SPD-conj	0,733	0,124	0,152	0,132	-0,008	0,077	0,130	0,070	0,126	0,286
SPM	-0,020	0,234	0,281	0,208	0,042	0,115	-0,171	-0,094	-0,342	0,009
SPM-conj		0,054	0,205	0,210	0,116	0,156	0,194	-0,138	-0,051	0,070
FI 1	0,054		0,686	0,599	0,511	0,671	0,476	-0,323	-0,461	-0,046
Rut	0,205	0,686		0,895	0,865	0,945	0,580	-0,300	-0,626	-0,011
FI3	0,210	0,599	0,895		0,857	0,848	0,454	-0,302	-0,606	-0,117
Qxil	0,116	0,511	0,865	0,857		0,941	0,735	-0,331	-0,411	-0,133
Qara	0,156	0,671	0,945	0,848	0,941		0,707	-0,281	-0,511	-0,003
Qram	0,194	0,476	0,580	0,454	0,735	0,707		-0,442	-0,105	-0,032
N-F	-0,138	-0,323	-0,300	-0,302	-0,331	-0,281	-0,442		0,151	0,561
N-R	-0,051	-0,461	-0,626	-0,606	-0,411	-0,511	-0,105	0,151		0,025
N-C	0,070	-0,046	-0,011	-0,117	-0,133	-0,003	-0,032	0,561	0,025	

C- % de carbono, N- % de nitrogênio, Lig- % de ligninas, MS- massa seca, Am- amido, AçS- açúcares solúveis, DHA- dehidroascórbico, AAT- ácido ascórbico total; AA- ácido ascórbico; FT- fenois totais; FIT- flavonoides totais; TT- taninos totais; PrT- proantocianidinas; GSH- glutathione reduzida; Gt- glutathione total; GSSG- glutathione oxidada; PUT- putrescina livre; PUTconj- putrescina conjugada; SPD- espermidina livre; SPDconj- espermidina conjugada; SPM- espermina livre; SPMconj- espermina conjugada; FI1- flavonoide 1 (NI); Rut- rutina; FI3- flavonoide 3 (NI); Qxil- quercetina 3-O-xilosídeo; Qara- guajaverina; Qram- Quercitrina; F- folhas, C- caule, R-raíz.

O eixo 2 foi responsável pela separação das amostras pelo tratamento aplicado. Para este eixo, as amostras provenientes do tratamento com ar ambiente aparecem no lado negativo do eixo, enquanto as amostras provenientes do tratamento de elevado CO₂ estão posicionadas no lado positivo desse eixo. Para essa distribuição de amostras ao longo do eixo 2, os teores de carbono e amido foram os que apresentaram maiores correlação positiva com o eixo, enquanto ligninas em folhas e fenois totais na raiz se correlacionam negativamente com esse eixo.

É inegável que o aumento de CO₂ afeta a produção de compostos primários e secundários de plantas, porém as respostas podem variar de acordo com a espécie, local e tempo de exposição. Observando os dados disponíveis na literatura, vê-se a necessidade de expansão de análises que incluam espécies arbóreas e de zonas tropicais, inter-relacionando respostas de parâmetros avaliadores do metabolismo primário e do secundário.

Neste estudo viu-se que a situação de elevado CO₂ em mudas de *P. guajava* é favorável, visto que ocorre acúmulo de amido e de substâncias anti-herbivóricas (taninos) e, aparentemente, não há alteração no balanço redox da planta, pelo menos para 90 dias de exposição a elevado CO₂. Contudo, é de extrema importância estudos que avaliem alterações concomitantes de parâmetros ambientais, como aumento de temperatura, disponibilidade de água, ozônio e elevado CO₂.

A goiabeira apresenta grande importância econômica, relacionada à produção e qualidade de seus frutos e, dessa forma, são necessários estudos que avaliem o efeito do aumento do CO₂ na quantidade e qualidade de frutos produzidos por esta espécie. Por ser uma espécie de crescimento lento, períodos de exposição mais longos são aconselháveis para uma melhor análise da susceptibilidade dessa espécie ao elevado CO₂.

B.

Variáveis	Eixo01	Eixo02	Variáveis	Eixo01	Eixo02
C-F	-0,0625	-0,1449	PrT-F	0,1254	0,1238
N-F	-0,1439	-0,1545	FT-C	0,1079	-0,0953
C-R	0,0039	0,2409	FIT-C	0,0759	-0,0792
N-R	-0,1951	-0,0035	PrT-C	0,2175	-0,1525
C-C	-0,0452	-0,0201	TT-C	0,1842	-0,1529
N-C	-0,0174	-0,2062	FT-R	0,0571	-0,2522
Lig-F	-0,0194	-0,2435	FIT-R	0,2000	-0,1863
Lig-C	-0,1479	-0,0152	PrT-R	0,1085	-0,1999
Lig-R	0,1670	-0,0713	TT-R	0,0949	-0,2070
MS-R	0,2776	-0,0760	GSH	-0,0945	0,0209
MS-C	0,2713	0,0614	GSSG	-0,0307	0,1079
MS-F	0,1872	0,2348	PUT	0,0438	0,1694
MS-T	0,1000	0,2561	PUT-conj	-0,0217	0,0173
Am-F	0,2348	-0,1047	SPD	-0,0771	0,2235
Am-C	0,0883	0,1475	SPD-conj	0,0565	-0,0152
Am-R	-0,1091	0,1805	SPM	0,0999	-0,0335
AçS-R	0,0167	0,1953	SPM-conj	0,1194	0,0171
AçS-C	-0,1164	0,2166	Fl 1	0,2428	-0,0627
AçS-F	0,0758	-0,0508	Rut	0,2522	0,1215
AA	-0,0443	0,0288	Fl3	0,2560	0,1249
F T-F	-0,0333	0,2058	Qxil	0,2275	0,1675
FIT-F	-0,1634	0,0583	Qara	0,2511	0,1176
TT-F	0,1104	0,1219	Qram	0,1607	0,1326

C.

CP	% de variância	% de variância acumulada	% de variância esperada
1	21,758	21,758	17,989
2	14,737	36,494	12,989
3	12,029	48,523	10,489
4	7,688	56,211	8,822

Figura 4.1 - Análise de componente principal de 46 variáveis (C- % de carbono, N- % de nitrogênio, Lig- % de ligninas, MS- massa seca, Am- amido, AçS- açúcares solúveis, DHA- dehidroascórbico, AAt- ácido ascórbico total; AA- ácido ascórbico; FT- fenois totais; FIT- flavonoides totais; TT- taninos totais; PrT- proantocianidinas; GSH- glutatona reduzida; Gt- glutatona total; GSSG- glutatona oxidada; PUT- putrescina livre; PUTconj- putrescina conjugada; SPD- espermidina livre; SPDconj- espermidina conjugada; SPM- espermina livre; SPMconj- espermina conjugada; Fl1- flavonoide 1 (NI); Rut- rutina; Fl3- flavonoide 3 (NI); Qxil- quercetina 3-O-xilosídeo; Qara- guajaverina; Qram- Quercitrina; F- folhas, C- caule, R- raiz) relacionadas a todas as análises realizadas nesse trabalho com *P. guajava* cv. Pedro Sato , ao longo dos dias de exposição ao elevado CO₂ : 30 dias (●), 90 dias (■). Mantidas em ar ambiente (azul) e elevado CO₂ (vermelho). B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Resumo

A fim de avaliar como *Psidium guajava* estoca o carbono excedente, e se a alta concentração de CO₂ poderia significar uma situação estressante para a espécie, foi realizada uma fumigação de 130 mudas de *P. guajava* cv. Pedro Sato em quatro câmaras de topo aberto: duas com ar ambiente (~390 ppm) e duas com atmosfera enriquecida com CO₂ (~720 ppm). Foram realizadas coletas quinzenais, retirando-se cinco indivíduos de cada câmara, aleatoriamente, que foram separados em raiz, caule e folhas e imediatamente congelados com nitrogênio líquido. Foram analisados componentes relacionados à sinalização e inativação de espécies reativas de oxigênio em folhas: os teores de poliaminas solúveis, ácido ascórbico e glutatona, além de fenóis, flavonoides, proantocianidinas e taninos totais. Além disso, os extratos metanólicos de folhas foram submetidos à CLAE para análises quali e quantitativas dos principais flavonoides. Parâmetros relacionados ao desenvolvimento da planta também foram analisados, como incremento em altura, massa seca, fração de massa, acúmulo de carbono, açúcares solúveis e amido. As análises de poliaminas, ácido ascórbico, glutatona, e compostos fenólicos de folhas não revelaram alterações significativas entre os tratamentos, exceto para a análise de taninos totais onde foi observado um aumento significativo dessas substâncias nas plantas mantidas a elevado CO₂ e após 90 dias de fumigação. A análise por CLAE revelou que a maioria dos flavonoides dessa espécie é derivada de quercetina. Com relação aos parâmetros de crescimento, *P. guajava* não apresentou diferenças significativas de incremento em altura e massa seca, mas apresentaram acúmulo de amido nas folhas. Análises multivariadas foram utilizadas para integrar as 46 variáveis analisadas. Neste estudo viu-se que a situação de elevado CO₂ em mudas de *P. guajava* é favorável, visto que ocorre acúmulo de amido, substâncias anti-herbivóricas (taninos) e, aparentemente, não há alteração no balanço redox. Contudo, é de extrema importância estudos que avaliem alterações concomitantes de parâmetros ambientais, como aumento de temperatura, disponibilidade de água, ozônio e elevado CO₂. A goiabeira apresenta grande importância econômica relacionada à produção e qualidade de seus frutos, dessa forma são necessários estudos que avaliem o efeito do aumento do CO₂ na quantidade e qualidade de frutos produzidos por esta espécie. Por ser uma espécie de crescimento lento, períodos de exposição mais longos são aconselháveis para uma melhor análise da susceptibilidade dessa espécie ao elevado CO₂.

Abstract

In order to assess whether the high CO₂ would be a stressful situation and how this specie invest the surplus carbon, we performed a fumigation experiment using 130 seedlings of *P. guajava* cv. Pedro Sato in four open-top chambers: two with ambient air (~ 390 ppm CO₂) and two with elevated CO₂ (~ 720 ppm). Biweekly, five individuals of each chamber were randomly collected, separated into root, stem and leaves and immediately frozen with liquid nitrogen. Were analyzed parameters related to signaling and inactivation of reactive oxygen species in leaves: levels of soluble polyamines, ascorbate and glutathione, as well as contents of phenols, flavonoids, tannins and proanthocyanidins. Furthermore, the methanol extracts were subjected to HPLC for quantitative and qualitative analysis of the major flavonoids. Parameters related to the development of the plant were also analyzed, as height increment, dry mass, mass fraction, carbon accumulation, soluble sugars and starch accumulation. The analysis of polyamines, ascorbate, glutathione and phenolic compounds of leaves, showed no significant changes when comparing treatments, except for the analysis of tannins which was observed a significant increase of these substances in plants at high CO₂ after 90 days of fumigation. HPLC analysis revealed that most of flavonoid composition is quercetin derivatives. The growth parameters showed no significant differences in height increment and dry mass, but the leaves showed accumulation of starch after CO₂ fumigation. Multivariate analyzes were used to integrate the 46 variables analyzed. In this study it was seen that the elevated CO₂ seem to be favorable to seedlings of *P. guajava*, once there is an accumulation of starch, antiherbivore substances (tannins) and, apparently, there was no change in the redox balance. However, it is extremely important to perform studies that evaluate concomitant changes in environmental conditions, such as increased temperature, availability of water, ozone and elevated CO₂. Guava has great economic importance in Brazil, fact related to the production and quality of its fruits, so more studies are needed to assess the effect of increased CO₂ in the quantity and quality of fruits produced by this species. As a slow-growing species, longer exposure periods are recommended to better analyze the susceptibility of this species to elevated CO₂.

Anexo

A1- Curvas de calibração utilizadas nas análises quantitativas.

Substância referência	Equação da reta	R ²	Concentração min. e máx.	Equipamento
Ácido Ascórbico	$y = 4302,6x - 17,666$	0,997	100µg-18 mg. mL ⁻¹	CLAE
Ácido tânico	$y = 2,8936x - 0,022$	0,991	100-285 µg.mL ⁻¹	Espectro
Açúcares solúveis	$y = 0,0221x - 0,0064$	0,994	23-700 ug. mL ⁻¹	ELISA
Amido	$y = 0,0753x + 0,0867$	0,999	20-300 µg.mL ⁻¹	ELISA
Espermidina	$y = 177423x + 59431$	0,999	1- 50 nmol	CLAE
Espermina	$y = 204599x - 143658$	0,995	1- 50 nmol	CLAE
Glutationa	$y = 0,1236x + 0,0009$	0,998	10- 18 mg.mL ⁻¹	ELISA
<i>p</i> -cumárico	$Y = 0,01684x + 0,0495$	0,995	100-700µg. mL ⁻¹	Espectro
Putrescina	$y = 112382x - 15840$	0,999	1- 50 nmol	CLAE
Quercetina	$y = 10,926x + 1,0661$	0,998	1,5-60µg. mL ⁻¹	CLAE
Quercitrina	$y = 7,1535x - 14,157$	0,999	1,5-60µg. mL ⁻¹	CLAE
Rutina	$y = 5,5751x + 13,106$	0,999	1,5-60µg. mL ⁻¹	CLAE
Rutina	$y = 0,0315x + 0,0007$	0,999	3-120µg. mL ⁻¹	Espectro
Tanino quebracho	$y = 1,7585x + 0,037$	0,991	300 µg-3 mg.mL ⁻¹	Espectro