

PEDRO IVO LEMBO SILVEIRA DE ASSIS

**Fluxo estomático de ozônio e sintomas foliares
visíveis em *Psidium guajava* L. ‘Paluma’**

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

SÃO PAULO

2014

PEDRO IVO LEMBO SILVEIRA DE ASSIS

**Fluxo estomático de ozônio e sintomas foliares
visíveis em *Psidium guajava* L. ‘Paluma’**

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

ORIENTADORA: DRA. REGINA MARIA DE MORAES

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

Assis, Pedro Ivo Lembo Silveira de
A848f Fluxo estomático de ozônio e sintomas foliares visíveis em *Psidium guajava* L.
'Paluma' / Pedro Ivo Lembo Silveira de Assis -- São Paulo, 2014.
110 p. il.

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

1. Myrtaceae. 2. Ozônio. 3. Poluição atmosférica. I. Título.

CDU: 582.883

Aos meus pais, Carlos e Emília, pelo amor, carinho e educação passados, e por nunca deixarem de investir em meus estudos, mesmo nos momentos mais difíceis.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente por todo esforço na criação e manutenção do curso e pelo empenho em sempre buscar a sua melhora.

Ao Instituto de Botânica (IBt) e ao Núcleo de Pesquisa em Ecologia pela infraestrutura fornecida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida (Processo: 131830/2012-0).

Ao CNPq (Processo: 4738931/2011-8) e à Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP) (Processo: 2011/51233-0) pelos auxílios prestados ao projeto.

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por conceder permissão ao uso da área para a realização da parte experimental deste estudo.

Aos pesquisadores e funcionários da Estação Meteorológica do IAG situada no PEFI e do Grupo de Micrometeorologia do IAG pelo fornecimento dos dados meteorológicos.

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

À pesquisadora e Dra. Regina Maria de Moraes, minha orientadora, por ter confiado a mim este projeto, por todo o conhecimento transmitido desde a iniciação científica, pelo convívio mais que agradável, pela amizade e compreensão em momentos difíceis. Sou e sempre serei grato a você.

Às pesquisadoras do Núcleo de Ecologia Dra. Marisa Domingos, Dra. Mirian Rinaldi, Dra. Sílvia Ribeiro, Dra. Carla Zuliani, Dra. Maria Teresa Gromboni-Guaratini e Dra. Márcia Lopes pelas trocas de conhecimento em diversos momentos desde a iniciação científica e conversas agradáveis.

À pesquisadora e Dra. Patrícia Bulbovas, por ter contribuído em minha formação como biólogo, pela confiança demonstrada ao me indicar no Instituto de Botânica e pela amizade feita durante esses anos de convívio.

Às “Panteras” Amariles, Valdenice, Dorinha e Marli, pelas ajudas prestadas e por fazerem das atividades (plantio, saídas de campo) mais agradáveis e divertidas.

Às amigas e aos amigos que participam ou participaram do projeto, Jéssica Cassimiro, Francine Fernandes, Jéssica Picolli, Daniela Faria, Giselle Pedrosa, Wilton Sala e Josemir Santos por diversos momentos de descontração e risadas, ótimo entrosamento, troca de conhecimentos e ajudas prestadas durante todo o período do mestrado.

Às amigas e amigos Ane Aguiar, Patrícia Giampaoli, Andressa Ribeiro, Ana Paula, Marcelle Dafré, Jéssica Nobre, Simone da Silva, Marisia Esposito, Marcela Engela, Sol, Priscilla Denise, Ricardo Nakazato, Leonardo Fujita, Maurício Akio e Bruno Aguiar também por trocaram conhecimentos, amizade, conversas, incentivos e por tornarem o mestrado mais divertido.

À minha amiga Daiane Teixeira da Silva pela amizade, por momentos divertidíssimos passados juntos, por mais domingos de “slackline” e por toda ajuda concedida no preparo das referências bibliográficas.

À minha amiga Kássia Mantovan Fardin pela amizade sincera, carinho, conversas, risadas, ajuda e força em momentos considerados difíceis tanto na vida pessoal quanto na profissional como representantes da PG.

Aos amigos de infância, em especial aos “Xiko’s Men” Rafael Sanches, Ricardo Martins e Fábio Shimizo por muito mais que uma simples amizade, por bons momentos compartilhados em saídas de finais de semana e viagens, pelo suporte em alguns momentos, pelas risadas, conversas e irmandade.

Aos meus irmãos Paulo Victor e Tatiana por estarem sempre ao meu lado me incentivando, pelas conversas, risadas e pelos conselhos dado. Amo vocês.

Aos meus cunhados Sheila e Diego pelas conversas, compreensão e momentos divertidos passado ao lado de vocês.

À toda a minha família, em especial a minha avó Ângela Lembo Silveira, por ter grande participação em minha formação pessoal, transmitindo carinho, amor, educação, ensinamentos e sempre desejar o melhor para mim.

Aos meus tios Cláudia Pacheco e Aldo Silveira por bons momentos vividos, além do suporte, carinho e educação transmitidos.

À minha dinda querida Lígia Maria Lembo Duarte e ao meu tio Alexandre Levi Chaves que sempre estiveram presentes nos momentos em que mais precisei, por proporcionar enriquecimento ao meu currículo. Vocês são um grande exemplo para mim.

Por fim, e, com certeza, não menos importante agradeço aos meus pais Carlos Roberto Roseira de Assis e Emília Maria Lembo Silveira de Assis, por tudo o que eles representam para mim, sendo a minha fortaleza, meu ombro amigo, meu braço direito, etc.. Por toda a educação, todo o amor, carinho, respeito, broncas (quando necessárias), conselhos, trocas de experiências e valores passados durante todos estes meus 25 anos de vida, fazendo-me tornar o homem que sou hoje, e por sempre me proporcionarem o melhor, mesmo em momentos difíceis de nossas vidas, para que pudesse chegar onde estou. Amo vocês eternamente.

Índice

<i>Resumo</i>	i
<i>Abstract</i>	ii
1. INTRODUÇÃO	1
Justificativa.....	10
Pergunta e hipótese do trabalho	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivo específico.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Caracterizações do local de estudo, da espécie estudada e do modo de cultivo e exposição das plantas	15
3.1.1 Local de estudo.....	15
3.1.2 Espécie estudada.....	16
3.1.3 Modo de cultivo e exposição.....	17
3.2 Monitoramento das condições meteorológicas, da concentração de ozônio e cálculo da EAO40	19
3.2.1 Condições meteorológicas	19
3.2.2 Poluentes atmosféricos	22
3.3 Cursos diários de condutância estomática para ‘Paluma’	22
3.4 Obtenção da condutância estomática modelada.....	23
3.4.1 Condutância estomática máxima, mínima e relativa	24
3.4.2 Parametrização da condutância estomática de ‘Paluma’	24
3.4.3 Condutância estomática modelada	27
3.5 Cálculo do fluxo estomático de ozônio	28
3.6 Variáveis–resposta	29
3.6.1 Sintomas foliares visíveis	29
3.6.2 Crescimento	31
3.7 Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS	33
4.1 Caracterização das condições meteorológicas e dos poluentes atmosféricos	33
4.1.1 Condições meteorológicas	33
4.1.2 Qualidade do ar	38
4.2 Condutância estomática de ‘Paluma’	44

4.2.1 Condutância máxima, mínima e parametrização da condutância estomática de <i>Psidium guajava</i> ‘Paluma’ segundo o modelo DO ₃ SE	44
4.2.2 Condutância estomática modelada	48
4.3 Fluxo estomático de ozônio para ‘Paluma’	49
4.3.1 Ambiente aberto e não controlado	49
4.3.2 Ambiente fechado e semi-controlado	51
4.4 Variáveis-resposta	51
4.4.1 Sintomas foliares visíveis	51
4.4.2 Crescimento em altura, diâmetro, número de folhas e massa seca	56
4.5 Análise de regressão e comparação entre o modelo de fluxo estomático e a EAO40	63
4.5.1 Ambiente aberto e não controlado	63
4.5.2 Ambiente fechado e semi-controlado	70
5. DISCUSSÃO	72
5.1 Análise conjunta das condições meteorológicas e da qualidade do ar	72
5.2 Variação diurna e parametrização da condutância estomática	74
5.3 Modelo de condutância estomática	78
5.4 FAO ₃ e sua capacidade preditiva para os sintomas foliares e respostas de crescimento, comparada a EAO40.	81
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
7. CONCLUSÃO	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

Resumo

As concentrações de ozônio (O_3) têm aumentado anualmente na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP). O O_3 pode induzir danos às espécies vegetais, comunidades e ecossistemas. Recentemente, níveis críticos baseados no fluxo de ozônio para o interior da folha através dos estômatos têm sido adotados para algumas espécies do hemisfério norte, visando a proteção destas. O fluxo de ozônio tem explicado melhor a variação das respostas da planta do que a exposição acumulada de ozônio acima de 40 ppb (EAO40), que é o nível crítico mais empregado. No Brasil, entretanto, não existe nenhum índice ou nível crítico para a proteção da vegetação. O objetivo deste estudo foi avaliar o modelo de fluxo estomático acumulado de O_3 (DO_3SE) para *Psidium guajava* L. 'Paluma', espécie arbórea de clima tropical e sensível ao O_3 , sob as condições ambientais da RMSP e compará-lo à EAO40 quanto à sua capacidade preditiva. Além disso, procurou-se saber qual variável-resposta seria mais adequada. Foram realizadas 5 exposições com duração de três meses cada de maio/2012 a agosto/2013. Medidas de condutância estomática (g_s) foram feitas semanalmente. Como parte central do modelo, foi feita a parametrização desta para 'Paluma', obtendo-se sua condutância máxima (g_{max}) e mínima (f_{min}) e sua relação com a temperatura (f_{temp}), a radiação fotossinteticamente ativa (f_{RFA}), o déficit de pressão de vapor (f_{DPV}), a umidade do solo (f_{US}) e os dias do ano (f_{DA}). Em seguida, a força do modelo de g_s foi avaliada pela relação entre a g_s medida e a modelada pelos parâmetros mencionados. Analisaram-se sintomas foliares e crescimento ao longo do estudo, os quais foram relacionados com o fluxo acumulado de O_3 (FAO_3) e a EAO40. O modelo de g_s foi considerado satisfatório e significativo ($R^2 = 0,56$; $P < 0,0001$), além de ter uma boa precisão (RQME = 116). Apesar do maior FAO_3 nem sempre corresponder a mais sintomas, este apresentou uma capacidade preditiva maior do que a EAO40. A relação entre os parâmetros de crescimento com o O_3 não foi significativa. Por fim, concluiu-se que o modelo DO_3SE é aplicável para 'Paluma' na RMSP. Os sintomas foliares foram a variável-resposta melhor explicada pelo fluxo e, portanto, é a mais adequada. Apesar dos resultados promissores, o modelo pode ser melhorado ao incluir novas funções que representem, por exemplo, os efeitos da concentração de O_3 e da hora do dia sobre g_s . Além disso, também se devem testar diferentes doses absorvidas para a verificação da existência de um fluxo limite a partir do qual os sintomas foliares surgiriam. A partir disso, a proposição de um índice para a proteção da vegetação estará mais próxima.

Abstract

Ozone concentrations (O_3) have increased in the city of São Paulo annually. Ozone can affect plant species, communities and ecosystems. Recently, ozone flux-based critical levels into the leaves through stomata have been adopted for some northern hemisphere species, aiming its protection. Ozone-flux has better explained the variation of plant responses than accumulated ozone exposure above a threshold of 40 ppb (AOT40), which is the most employed critical level. In Brazil, however, there is not any index or critical level for the protection of vegetation. The aim of this study was to assess the ozone stomatal flux model (DO_3SE) for *Psidium guajava* L. 'Paluma', a tropical and O_3 sensitive tree species, under environmental conditions of São Paulo and compare it to AOT40 for their predictive ability. Furthermore, we tried to find out which of the variable-response would be the most appropriate. Five exposures of three months each were conducted from May 2012 to August 2013. Stomatal conductance (g_s) measurements were taken on a weekly basis. As a central part of the model, the g_s parameterization for 'Paluma' was done, obtaining its maximum and minimum g_s and also the functions that describe its relationship with temperature (f_{temp}), photosynthetically active radiation (f_{PAR}), vapour pressure deficit (f_{VPD}), soil moisture (f_{SM}) and plant phenology (f_{phen}). Then, the strength of the model was assessed by the relationship between the measured and modeled g_s . The foliar symptoms and growth parameters were analyzed throughout the study, which were related against the accumulated ozone flux (AF_{st}) and AOT40. The g_s model was considered satisfactory and significant ($R^2 = 0,56$; $P < 0,0001$), in addition to present a good precision ($RMSE = 116$). Despite the higher AF_{st} not always account for more symptoms, this one showed a better fit with this response than AOT40. The relationship between growth parameters and O_3 was not significant. Finally, it was concluded that the DO_3SE model is applicable to 'Paluma' in the city of São Paulo, with AF_{st} showing a better fit than AOT40. The foliar symptoms were the best explained variable-response by AF_{st} . Despite promising results, the model still can be improved by including new functions that represents the effects of the ozone concentrations and time of day on maximum g_s . Moreover, different absorbed doses should also be tested to verify the existence of a threshold ozone flux from which foliar symptoms arise. From this, a proposition of an index for the protection of vegetation will be more plausible.

1. INTRODUÇÃO

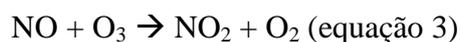
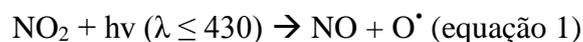
A atividade antrópica tem causado o aumento das concentrações de vários poluentes atmosféricos, conduzindo a uma má qualidade do ar. Os poluentes atmosféricos são definidos pela Resolução CONAMA nº 03 de 28/06/1990, em seu Parágrafo I, como “qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos em legislação, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade”. Designação equivalente é dada por Freedman (1995), o qual define poluente atmosférico como qualquer substância adicionada à atmosfera em concentrações suficientemente altas para causar efeitos mensuráveis nos seres vivos e em materiais.

A má qualidade do ar vem se tornando cada vez mais evidente, principalmente em países mais pobres e em desenvolvimento, onde a legislação de controle de emissões destes muitas vezes é permissiva ou inexistente. As mudanças no padrão espacial da qualidade do ar não se devem apenas à variabilidade do clima e do tempo, mas também à mudança demográfica, entendendo-se por isso o aumento da população, seguido por mudanças na sua distribuição espacial, aumento das áreas urbanas e o surgimento e movimento de indústrias e veículos, respectivamente. Além destes, o uso da terra para atividades como pecuária e agricultura e o crescimento econômico a qualquer custo geram alta demanda energética, o que também tem contribuído para o aumento na concentração de diversos poluentes, dentre eles o ozônio (O₃) (Karnosky *et al.* 2003)

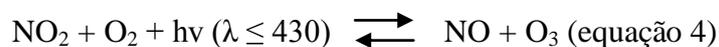
Este poluente pode afetar negativamente a saúde humana e o meio ambiente. Segundo Ainsworth *et al.* (2012), estima-se uma perda econômica global entre 14 e 26 milhões de dólares devido à redução da produtividade agrícola associada à poluição por O₃. Além disso, o O₃ é um gás-estufa, responsável por 5 a 16% da variação da temperatura em relação ao período pré-industrial e é o segundo principal poluente a afetar a saúde humana, sendo relacionado a 700 mil mortes anuais no planeta (Ainsworth *et al.* 2012).

O ozônio é um poluente gasoso secundário, ou seja, formado na atmosfera por meio de reações envolvendo poluentes primários (emitidos diretamente das fontes de emissão) e constituintes naturais da atmosfera (CETESB 2012).

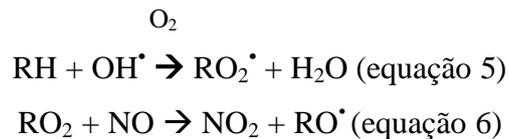
Em uma atmosfera não poluída, sua formação ocorre na presença de luz solar junto aos óxidos de nitrogênio (NO_x). A primeira reação deste processo se dá pela decomposição do dióxido de nitrogênio (NO_2) por meio da luz solar, gerando monóxido de nitrogênio (NO) e oxigênio atômico (O^*) (equação 1). Na presença de uma molécula inerte que absorve energia (M), a molécula de gás oxigênio (O_2) reage com o oxigênio atômico produzindo O_3 (equação 2). Por sua vez, o NO reage com o O_3 regenerando o NO_2 e o O_2 (equação 3).



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



Entretanto, o mesmo não ocorre em locais onde a atmosfera é poluída. Nestes locais, a formação e o aumento das concentrações de ozônio troposférico se devem à perda do equilíbrio fotoestacionário devido a reações com outros poluentes primários. A reação mais comum ocorre com compostos orgânicos voláteis (COVs) não metânicos, cuja origem é predominantemente a emissão veicular (Ashmore 2005). Na presença de luz solar, o radical hidroxila (OH^*), naturalmente presente na atmosfera, reage com os hidrocarbonetos (RH , notação simplificada onde R é um grupo orgânico) produzindo radical peróxi (RO_2^*) (equação 5). O radical peróxi oxida NO a NO_2 (equação 6), sem que ocorra o consumo de O_3 exposto na equação 3. Nessas condições, a subsequente fotólise do NO_2 , apresentada na equação 1, seguida da reação com o O_2 , retratada na equação 2, são uma fonte líquida de produção de O_3 troposférico (Krupa & Manning 1988, Jacob 1999).



As concentrações de fundo de O₃ na baixa atmosfera, aquelas registradas em locais onde não há emissão antropogênica de poluentes precursores, têm aumentado globalmente à taxa de 1,5% ao ano (Karnosky *et al.* 2003, Bermejo *et al.* 2010). Os autores afirmam que esse aumento ocorre de duas formas. A primeira é a sua produção sobre regiões onde há a emissão de precursores, seguida pela exportação de uma fração de O₃ produzido à atmosfera global. Já a segunda se dá pela exportação de precursores de O₃ seguido pela sua produção em regiões remotas das fontes emissoras.

A Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), mesmo com diversas políticas adotadas para o controle e redução das emissões de poluentes, dentre eles os precursores de O₃, ainda sofre com picos de concentração de O₃ (CETESB 2012). Uma das principais causas, certamente, é o aumento ano após ano da frota veicular paulistana, já contabilizando mais de sete milhões e meio de veículos, tanto leves (carros e motos) quanto pesados (ônibus e caminhões) (DETRAN-SP 2014), sendo este um dos motivos do O₃ ser um dos poluentes de mais difícil controle (EPA 2006).

A frota veicular da RMSP é responsável por cerca de 77% e 80% da emissão de hidrocarbonetos (HC) e óxidos de nitrogênio (NO_x), respectivamente (CETESB 2012), ambos importantíssimos nas reações de formação do O₃, como visto acima. Estudos feitos por Pereira *et al.* (2004) e Sánchez-Ccoyllo *et al.* (2006), relatam que os HC e os NO_x são os principais fatores limitantes para a formação de O₃ na RMSP, que aliados a fatores como a temperatura do ar, a velocidade do vento e a altitude em que as taxas de mistura dos poluentes ocorrem, determinam os elevados picos de concentração verificados na região. Os veículos leves são grandes emissores de HCs, grande parte por apresentarem idade média elevada, com cerca de 45% deles sendo anteriores ao ano 2000 (DETRAN-SP 2014). Veículos mais velhos tendem a emitir mais COVs por não apresentarem tecnologias de redução da emissão desses poluentes (CETESB 2012). Enquanto isso, os veículos pesados são responsáveis por 60% da emissão de NO_x.

Como dito anteriormente, o O₃ pode induzir efeitos nas espécies vegetais por ser um forte oxidante. Sua entrada na folha ocorre via estômato durante as trocas gasosas, sendo decomposto na presença de moléculas de água presentes no apoplasto, o que culmina na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Bermejo *et al.* 2010).

Segundo Soares & Machado (2004), as EROs também são formadas naturalmente em alguns processos metabólicos da planta (fotossíntese, respiração e fotorrespiração), sendo consideradas um sub-produto do metabolismo celular.

Algumas dessas espécies reativas de oxigênio são classificadas como radicais livres (Soares & Machado 2004), que de acordo com Ferreira & Matsubara (1997), são átomos ou moléculas altamente reativos que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, o que confere a alta reatividade. Inseridos neste grupo estão os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2^*) e hidroxila (OH^*). Além destes, existem também aqueles que não apresentam elétrons desemparelhados na última camada eletrônica e, portanto, não são radicais livres, porém entram no grupo das EROs, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (1O_2).

Quando as EROs produzidas pela solubilização do ozônio em água superam a capacidade de detoxificação do organismo vegetal, realizada pelo sistema antioxidante (Halliwell & Gutteridge 2007), a planta entra em estresse oxidativo. As EROs oxidam moléculas vitais, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Foyer & Noctor 2005). Logo, os primeiros efeitos induzidos pelo ozônio tem início em nível bioquímico, afetando processos do metabolismo primário e secundário (interferências na fotossíntese, respiração e biossíntese de lipídeos e proteínas, etc.), subsequentemente progredindo a nível ultra-estrutural (desorganização de membranas celulares) e então ao nível celular (parede celular, mesofilo e núcleo), podendo resultar em aceleração da senescência foliar e sintomas visíveis (cloroses e necroses nos tecidos foliares) em espécies sensíveis, diminuição do crescimento e da produtividade (Guidi *et al.* 2000, Krupa *et al.* 2001, Gimeno *et al.* 2004a,b, Ashmore 2005, Fiscus *et al.* 2005, Ainsworth *et al.* 2012). Genótipos mais sensíveis podem apresentar redução no vigor devido à menor capacidade de aquisição de recursos e de produção de sementes, o que pode acarretar exclusão competitiva e redução na abundância, alterando a estrutura e composição da comunidade (Gimeno *et al.* 2004b, Ashmore 2005).

Diversos estudos já mostraram que a ocorrência de concentrações fitotóxicas de O_3 também é frequente na cidade de São Paulo, SP (Pina & Moraes 2007, Sant'Anna *et al.* 2008, Esposito *et al.* 2009, Souza *et al.* 2009, Pina & Moraes 2010, Dafré-Martinelli *et al.* 2011, Dias *et al.* 2011, Moraes *et al.* 2011).

A redução da produtividade agrícola e o risco à vegetação natural tem motivado estudos em diversos países da América do Norte, Europa e Ásia (Karlsson *et al.* 2007, Gerosa *et al.* 2008, Emberson *et al.* 2009, Feng & Kobayashi 2009, Grunhage *et al.*

2012, González-Fernández *et al.* 2013, Emberson *et al.* 2013, Yamagushi *et al.* 2014) visando o estabelecimento de uma métrica do O₃ baseada nas respostas das espécies vegetais ao impacto negativo deste poluente.

Esses estudos são realizados no âmbito da Convention on Large Range Transboundary Air Pollution (LRTAP Convention) da United Nations Economic Commission for Europe (UNECE) com o objetivo de determinar os limites de concentração de O₃ que não devem ser superados de modo a garantir a integridade dos seres vivos (níveis críticos) e o estabelecimento de estratégias de redução da poluição que evitariam a superação dos níveis críticos (LRTAP Convention 2011). Apesar de propostos na Europa, estudos semelhantes são realizados também na América do Norte (Grulke *et al.* 2007). Nível crítico é definido como a concentração limite acima da qual ocorrem efeitos deletérios nos receptores sensíveis (LRTAP Convention 2011).

Em linhas gerais, é possível distinguir três gerações de índices empregados no estabelecimento de níveis críticos, segundo Pleijel *et al.* (2002):

1. índices de exposição baseados em concentrações médias;
2. índices de exposição baseados na concentração acumulada acima de um limite (AOT - *Accumulated exposure Over a Threshold*)
3. índices de concentrações absorvidas de O₃ por via estomática (AFst, *absorbed stomatal flux*).

Os índices de exposição baseados em concentrações médias começaram a ser usados nos EUA e Europa no final da década de 1980. São baseados no cálculo de médias de concentração do poluente durante períodos de tempo determinados (1, 7, 10, 12 ou 24 horas). Inicialmente, utilizava-se a média de 24h, entretanto, o O₃ apresenta um ciclo diário de formação e consumo com concentrações baixas no início da manhã, que aumentam gradualmente à medida que a radiação e a temperatura se elevam, atingindo seu pico por volta das 14-15h e caindo novamente. Assim, dado que as concentrações noturnas são iguais ou próximas à zero, passou-se ao emprego de médias de 7, 8, 10 ou 12h, conforme o regime das concentrações (EPA 2006). A CETESB, agência ambiental paulista, utiliza médias horárias para identificação da máxima horária por dia, mas a partir de abril de 2013 passou a utilizar médias de 8h (Decreto Estadual nº 59.113 de 23/04/2013), mesma métrica utilizada nos EUA (EPA 2006).

O problema mais importante dos índices baseados em médias é não distinguir as diferentes distribuições da concentração, uma vez que picos muito altos de concentração, durante um período de tempo curto, podem apresentar a mesma média

que concentrações baixas, mantidas de forma mais constante. Além disso, o índice assume que todas as concentrações incluídas na média têm um mesmo efeito sobre as plantas, o que não é verdade. Por isso, foram desenvolvidos em seguida os índices que consideram a exposição de O₃ acumulada. A AOT40 (accumulated ozone exposure over the threshold of 40 ppb) ou, traduzindo para o português, EAO40 (exposição acumulada de O₃ acima do limite de 40 ppb h) foi proposta em 1997 por Fuhrer e colaboradores, baseados em experimentos realizados com trigo. Este índice foi, a seguir, testado para várias espécies herbáceas e arbóreas e definidos valores máximos permitidos para estações de crescimento de três ou seis meses. Ainda é o índice mais empregado na Europa, tendo os seus similares nos EUA: SUM00, SUM40 e SUM60, respectivamente, a soma de todas as concentrações horárias de O₃, a soma das concentrações superiores a 40 ppb e a 60 ppb (EPA 2006). Outro índice proposto nos EUA é o W126. Trata-se de um índice cumulativo em que as concentrações mais altas ocorridas num intervalo de tempo determinado recebem pesos maiores, uma vez que seu potencial fitotóxico é mais alto. Este índice foi desenvolvido por pesquisadores da EPA (Lefohn *et al.* 1988, EPA 2006), mas não chegou a ser adotado pelo governo americano.

Embora os índices baseados na exposição acumulada se correlacionem mais fortemente com os efeitos induzidos pelo O₃ do que os índices baseados em médias, eles não contemplam a influência de diversos parâmetros que podem modular a fitotoxicidade do poluente, uma vez que concentrações elevadas podem ocorrer em períodos de condutância estomática baixa. Assim, verificou-se que a concentração de O₃ no ar é diferente da dose de poluente que efetivamente atinge o tecido vegetal, pois fatores como déficit de pressão de vapor de água, radiação, ventos e estado hídrico da planta, ao influírem nos movimentos estomáticos, influenciam também a entrada do poluente na planta (Emberson *et al.* 2000). Peñuelas *et al.* (1999) observaram que plantas de *Nicotiana tabacum* Bel-W3 quando expostas em lugares com ventos fortes, somente apresentaram injúrias quando foram alcançados valores de EAO40 elevados, enquanto nos locais onde havia ventos pouco intensos os danos surgiram com valores de EAO40 mais baixos. A baixa correlação entre EAO40 e efeitos induzidos pelo O₃ também foi verificada em estudos realizados no verão de 2003 (Low *et al.* 2006), que foi excepcionalmente quente e seco, condições que favoreceram a ocorrência de altas concentrações de O₃ e, portanto, alta EAO40, mas reduziram a condutância estomática.

Há 15 anos, em um Workshop em Gerzensee (Suíça), reconheceu-se a importância de se desenvolver um nível crítico baseado no fluxo de O₃ do exterior da

folha, passando pelo poro estomático até o local do dano, uma vez que as respostas da planta estão muito mais associadas ao ozônio absorvido do que à sua concentração no ambiente. Desde então, um novo conceito de nível crítico foi estabelecido baseado no fluxo estomático de ozônio e caracterizado como “fluxo estomático acumulado de poluentes atmosféricos, acima do qual efeitos diretos em organismos sensíveis podem ocorrer” (LRTAP Convention 2011).

De acordo com Mills *et al.* (2011), este tem uma base biológica mais forte do que o nível crítico baseado na EAO, uma vez que leva em consideração não só a concentração de O₃ na atmosfera, mas também a influência da temperatura do ar, déficit de pressão de vapor, disponibilidade hídrica do solo e estágio fenológico da planta na regulação da abertura e fechamento estomático e, conseqüentemente, na absorção do poluente pela planta (Emberson *et al.* 2000, LRTAP Convention 2011).

A avaliação do fluxo de ozônio para o interior da planta requer o desenvolvimento de um modelo matemático. Esse modelo deve representar a resposta estomática a fatores ambientais mencionados acima e dos obstáculos enfrentados pelo poluente desde a atmosfera até a sua absorção (Fowler *et al.* 1999, Bermejo *et al.* 2010). O fluxo de absorção de ozônio, assim como o do CO₂, pode ser estudado com uma analogia a um circuito de resistências elétricas (Angelocci 2002, González-Fernández 2009). Resistência, neste caso, pode ser entendida como a propriedade que o meio apresenta em dificultar a passagem do poluente, o contrário de condutância (Fares *et al.* 2008). Segundo Fowler *et al.* (1999) o fluxo depende da constante de difusão do gás no ar, sendo diretamente proporcional ao gradiente de concentração entre o interior e exterior da folha e inversamente proporcional às resistências enfrentadas pelo poluente.

As resistências enfrentadas pelo O₃ desde a atmosfera até a sua absorção são conhecidas como resistência aerodinâmica, resistência da camada limite e resistência estomática, em ordem sequencial.

A resistência aerodinâmica (r_a) é responsável por delimitar o caminho do gás desde a atmosfera até a camada de ar em contato com a superfície da vegetação. Logo, essa é dependente de fatores como altura da planta em relação ao solo, a estrutura do dossel, a velocidade do vento e a rugosidade da superfície (Fowler *et al.* 1999, Angelocci 2002, González-Fernández 2009, LRTAP Convention 2011).

Passando por este meio, o poluente chega a uma camada de ar estagnada próxima a superfície foliar, conhecida como camada limite. A resistência da camada limite (r_b) varia com a velocidade do vento e parâmetros morfológicos da folha como o tamanho,

forma e orientação (González-Fernández 2009). Segundo Angelocci (2002), a espessura efetiva dessa camada tende a aumentar com a maior dimensão da folha e diminuir com o aumento da velocidade do vento. Além destes, Bermejo *et al.* (2010) ressaltam que a temperatura também pode interferir na sua espessura. Quando a superfície foliar está mais aquecida do que o ar acima, haverá transferência de calor vertical, aumentando a quantidade de turbulência do ar presente, ou seja, aumentando o movimento aleatório do ar. Do contrário, esta camada tende a ficar mais estável, inibindo a mistura por turbulência e dificultando a difusão de gases.

Por fim, a fração da concentração de O₃ que entra em contato com a superfície foliar é determinada pela resistência de superfície (r_c), que apresenta dois componentes fundamentais. A primeira delas é a resistência cuticular (r_{ext}), que determina a taxa de reação do poluente com a superfície da cutícula, considerada uma via de alta resistência. A segunda é a resistência estomática (r_s), condicionada pelo número de estômatos, características anatômicas das células guarda e pelo grau de abertura do poro estomático, com este último variando ao longo de um dia devido a condições de demanda atmosférica e disponibilidade hídrica no solo (Fowler *et al.* 1999, Emberson *et al.* 2000, Angelocci 2002, González-Fernández 2009, Bermejo *et al.* 2010).

Todos esses fatores mencionados (condutância estomática, as resistências enfrentadas pelo poluente e a concentração de O₃) foram inseridos em um modelo desenvolvido por Emberson *et al.* (2000) denominado DO₃SE - *Deposition of Ozone for Stomatal Exchange* (Deposição de Ozônio por Troca Estomática) – o qual emprega um algoritmo matemático para o cálculo da condutância estomática modelada por parâmetros ambientais elaborado por Jarvis (1976) e baseado em Emberson *et al.* (2000), uma vez que esta é considerada a parte central do modelo. Desde então, vem sendo utilizado em diversos estudos nos países do hemisfério norte com o objetivo de estabelecer níveis críticos baseados na dose absorvida de O₃ por várias espécies arbóreas, herbáceas e cultivos (Musselman *et al.* 2006, Emberson *et al.* 2007, Karlsson *et al.* 2007, Alonso *et al.* 2008, Gerosa *et al.* 2008, entre outros).

O primeiro modelo elaborado por Emberson *et al.* (2000) procurou estimar o fluxo estomático de ozônio para as espécies *Fagus sylvatica* e *Triticum aestivum*, por serem as mais representativas da Europa, além de reconhecidas como sensíveis ao ozônio. Este trabalho teve o intuito de estimar e mapear o fluxo de ozônio para a Europa e compará-lo com a EAO40. Foi verificado que cada modelo produzia um mapeamento diferente, onde locais com baixos valores de EAO40 apresentavam um fluxo estomático

de ozônio alto e vice-versa. Tal resultado foi importante por mostrar que algumas políticas públicas para locais com baixa EAO40 poderiam não ser adequadas à vegetação local, expondo-a a possíveis riscos.

Após este estudo pioneiro, outros foram realizados com o intuito de adequar esse modelo para diferentes espécies, comparar a capacidade preditiva de ambos os índices quanto às respostas induzidas pelo ozônio à vegetação e também na tentativa de elaborar níveis críticos baseados na absorção efetiva do ozônio. Dentre algumas espécies estudadas estão o trigo e a batata (Pleijel *et al.* 2004, 2007), com este último trabalho calibrando o algoritmo matemático da condutância estomática para ambas as espécies e, com isso, obtendo melhoras na capacidade preditiva do fluxo acumulado de ozônio em relação à perda da produtividade, além de estabelecer um novo índice de nível crítico igual a 1 mmol m^{-2} e 2 mmol m^{-2} , respectivamente, considerando apenas doses absorvidas acima de um fluxo limiar de $6 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Espécies arbóreas do gênero *Prunus* spp., representando algumas florestas europeias, também foram estudadas por Karlsson *et al.* (2004, 2007), com o fluxo acumulado de ozônio apresentando uma melhor capacidade preditiva com relação a redução da biomassa, além de ser estabelecido um nível crítico de 8 mmol m^{-2} , considerando apenas doses absorvidas acima de um fluxo limiar de $1,6 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Gerosa *et al.* (2008) também constataram uma melhor explicabilidade pelo fluxo acumulado de ozônio quanto ao surgimento e desenvolvimento de injúrias foliares em espécies arbóreas de *Fagus sylvatica* e *Quercus robur*. Recentemente, oito níveis críticos foram revisados e atualizados para diferentes espécies agrícolas, florestas e vegetação semi-natural (Mills *et al.* 2011).

Atualmente, o modelo DO₃SE já vem sendo utilizado no Reino Unido com o propósito de auxiliar os estudos dos efeitos induzidos pelo ozônio sobre a saúde humana (Emberson *et al.* 2013). Neste trabalho foram relacionados as taxas de absorção do poluente pela vegetação com as taxas de mortalidade por problemas respiratórios induzidos pelo O₃. Embora seja um trabalho inicial, a conclusão foi que a capacidade de absorção de O₃ pela vegetação tem grande importância na determinação do risco à saúde humana imposto pelo poluente e que, ao retirar O₃ do ar, a vegetação pode reduzir consideravelmente o número de mortes antecipadas relacionadas a ele.

Apesar do melhor desempenho do índice baseado na dose absorvida de O₃ comparado a EAO40 e da importância que o modelo vem ganhando no cenário mundial, inclusive no auxílio à adoção de políticas públicas, o modelo DO₃SE deve estar sob

constante refinamento, com a inclusão ou retirada de novas funções do algoritmo matemático, e também incluir outros processos de degradação e deposição do O₃ antes da sua absorção via estômato, para que a estimativa do risco imposto pelo O₃ seja cada vez mais precisa e confiável (Matyssek *et al.* 2007). Uma das limitações ainda existentes com relação a esse modelo é a não medição do fluxo efetivo, ou seja, aquela concentração que irá efetivamente atingir as células e os tecidos (Musselman *et al.* 2006, Dizengremel *et al.* 2008), estimando-se apenas a quantidade total de ozônio absorvida. Tauzs *et al.* (2007) explicam que os efeitos do O₃ na planta resultam de três eventos em cadeia: a exposição, a absorção e o efeito biológico. Entretanto, o efeito biológico só ocorrerá após as EROs superarem a capacidade de defesa do sistema antioxidante, o qual não é levado em consideração no modelo. Por esse motivo, estudos com o fluxo acumulado de O₃ adotam um fluxo limiar a partir do qual poderão ser vistos efeitos induzidos pelo poluente, representando este mecanismo de defesa da planta (Gerosa *et al.* 2009b). Porém, este fluxo limiar nem sempre representa o funcionamento do sistema de defesa de forma adequada, uma vez que este apresenta uma sazonalidade, variando ao longo do ano, assim como a atividade metabólica da planta, ao menos em regiões tropicais e sub-tropicais (Bulbovas *et al.* 2005, Pina 2010).

A busca por um fluxo efetivo tem motivado diversos pesquisadores da área, gerando diversas publicações com a intenção de melhorar seus respectivos modelos. A modelagem dificilmente resultará em um valor real de O₃ absorvido pela planta, entretanto são extremamente necessários e úteis para um melhor entendimento das relações planta-poluente.

Justificativa

Os modelos de fluxo desenvolvidos até o momento foram baseados em espécies nativas das regiões temperadas, não havendo nenhum realizado com uma espécie tropical. Logo, a avaliação da aplicabilidade do modelo pode contribuir para a adoção de políticas públicas de proteção à vegetação, uma vez que no Brasil não existe nenhum tipo de índice de proteção da vegetação contra os efeitos induzidos pelo O₃. O padrão de qualidade do ar utilizado pela CETESB, a agência ambiental paulista, tem como objetivo a proteção da saúde humana, sendo baseado no proposto pela Organização Mundial de Saúde. A CETESB utilizou no período de 2001 a 2010 a EAO40, índice desenvolvido na Europa com base nas respostas do trigo ao O₃, portanto, de aplicação

limitada em nosso país e, depois disso, não foram feitas mais menções à proteção da vegetação contra o O₃ em seus relatórios anuais.

Considerado que a dinâmica meteorológica nesta latitude é totalmente diferente da observada na Europa e América do Norte e que as condições meteorológicas prevalentes no Estado de São Paulo são favoráveis à formação de O₃ durante praticamente o ano todo, interferindo diretamente na formação de O₃ e em sua captura pelas espécies vegetais, é possível que haja perda econômica em cultivos e que plantas e vegetação estejam sob risco.

O estudo foi realizado com *Psidium guajava* 'Paluma' espécie arbórea tropical identificada como sensível ao O₃, seguindo o conceito de De Temmerman *et al.* (2004), e uma das mais estudadas nesse âmbito (Furlan *et al.* 2007, Pina & Moraes 2007, Dias *et al.* 2008, Pina & Moraes 2010, Pina 2010, Moraes *et al.* 2011, Tresmondi & Alves 2011). Em estudo com esta cultivar na RMSP realizado por Pina (2010) foi observada uma fraca correlação entre os sintomas induzidos pelo O₃ e a EAO40, além de não existir um limiar fixo no que se refere a esse índice para a manifestação de sintomas foliares, indicando ser uma relação não-linear, com outros fatores interferindo na resposta de 'Paluma' ao O₃. Portanto, a avaliação de um modelo que inclua outros fatores que não só a concentração de O₃ para explicar o surgimento e desenvolvimento de sintomas se faz necessário.

A avaliação da aplicabilidade do modelo para 'Paluma' poderá contribuir para um melhor entendimento dessa resposta ao O₃ e, também, possibilitar o fornecimento de futuros subsídios para a proposição de um índice de proteção da vegetação contra os efeitos induzidos pelo O₃.

Pergunta e hipótese do trabalho

Os estômatos são a principal via de entrada para o ozônio e a sua atividade é modulada por fatores ambientais e inerentes à espécie vegetal (temperatura, luz, déficit de pressão de vapor, umidade do solo, estado fenológico, etc.), que favorecerão a uma maior ou menor absorção do poluente. Portanto, um índice de proteção à vegetação que considere a influência desses fatores sobre a condutância estomática e as concentrações de ozônio na atmosfera, todos estes inseridos no modelo DO₃SE, possivelmente explicaria melhor as respostas induzidas pelo poluente à planta do que um índice que apenas considere as concentrações de ozônio na atmosfera, como a EAO40.

A partir disso, a pergunta a ser respondida por este estudo foi: a variação do fluxo acumulado de ozônio explicará melhor a variação das respostas obtidas pela espécie *Psidium guajava* 'Paluma', como os sintomas foliares e parâmetros de crescimento, do que a EAO40? A hipótese é que sim, principalmente com relação aos sintomas foliares por se tratar de uma resposta direta induzida pelo ozônio.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Para este estudo foi proposto investigar a aplicabilidade do modelo de fluxo estomático de O_3 - DO₃SE – para a espécie *Psidium guajava* ‘Paluma’, sob as condições ambientais da cidade de São Paulo (SP) e se este apresentaria uma maior capacidade preditiva do que a EAO40.

2.2 Objetivo específico

A partir do cálculo do fluxo acumulado de ozônio, investigar qual efeito induzido pelo O_3 foi o mais adequado para ser utilizado como variável-resposta no modelo DO₃SE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Como sintetizado por Gerosa *et al.* (2012), a verificação da aplicabilidade do modelo DO₃SE (Deposition of Ozone for Stomatal Exchange – Deposição de Ozônio por Trocas Estomáticas) envolve uma série de passos resumidos abaixo e detalhados em seguida:

1. Monitoramento das variáveis ambientais que modulam a condutância estomática (g_s) e que por isso integram o modelo: temperatura do ar, umidade relativa do ar, radiação fotossinteticamente ativa, umidade do solo, velocidade do vento;
2. Monitoramento da concentração de ozônio;
3. Coleta de uma grande série de dados de condutância estomática;
4. Cálculo da condutância máxima e mínima da espécie e da condutância relativa;
5. Determinação da função matemática que descreve a relação entre g_s relativa e cada uma das variáveis ambientais mencionadas acima para obtenção dos parâmetros que serão aplicados no modelo de condutância;
6. Derivação da condutância estomática da água para o ozônio;
7. Cálculo do fluxo estomático instantâneo de ozônio;
8. Cálculo do fluxo estomático acumulado de ozônio.

O fluxo estomático de ozônio estimado é a variável-explicativa. A variável-resposta é algum efeito induzido pelo O₃ na espécie estudada. Neste estudo foram avaliadas as seguintes variáveis-resposta: sintomas foliares visíveis, crescimento em altura, diâmetro e número de folhas e massa seca. A seguir, realizou-se análise de regressão entre a variável-explicativa e cada uma das variáveis-resposta testadas.

Visto que um dos objetivos do estudo foi verificar se o modelo de fluxo estomático tem maior capacidade preditiva do que a EAO40, foi necessário calculá-la e repetir as análises de regressão utilizando-a como variável-explicativa.

3.1 Caracterizações do local de estudo, da espécie estudada e do modo de cultivo e exposição das plantas

3.1.1 Local de estudo

O presente estudo foi realizado na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, situado na zona oeste da capital paulista. Plantas jovens de *Psidium guajava* ‘Paluma’ foram expostas no Fitotério do Instituto de Biociências (23°33’58’’S, 46°43’53’’W), próximo à estação de monitoramento da qualidade do ar da CETESB localizada no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Figura 1). Esta estação monitora ininterruptamente as concentrações de O₃, óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio (NO₂). Desde que foi instalada em 2007, tem registrado as maiores concentrações de O₃ na cidade de São Paulo e diversas ultrapassagens do padrão de qualidade do ar (160 µg/m³ ≈ 79 ppb) bem como o padrão de atenção (200 µg/m³ ≈ 102 ppb), o primeiro estabelecido pela Resolução CONAMA nº 03/90 e, este último, pela legislação estadual de São Paulo (CETESB 2013). Esta área de estudo foi denominada de ambiente aberto e não controlado.

Além disso, algumas plantas foram mantidas em casa de vegetação com sistema de filtragem de ar, situada no Instituto de Botânica de São Paulo (23°38’28’’S - 46°37’22’’W), na zona sul de São Paulo (Figura 2), uma vez que foi necessária a obtenção de dados de condutância sob concentração de O₃ igual ou próxima a zero. Esta área de estudo foi denominada de ambiente fechado e semi-controlado.



Figura 1. Imagem de satélite do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, destacando o local em que mudas de ‘Paluma’ foram expostas (ambiente aberto e não controlado) e onde está instalada a estação de monitoramento da qualidade do ar da CETESB. (Fonte: Google, 2014)



Figura 2. Imagem de satélite do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP, destacando a casa de vegetação onde foram também mantidas mudas de ‘Paluma’ (ambiente fechado e semi-controlado). (Fonte: Google, 2014)

3.1.2 Espécie estudada

Psidium guajava L. (Myrtaceae) é uma espécie tropical, nativa da América Central e de ampla ocorrência em territorial nacional. A cultivar ‘Paluma’ é derivada das variedades Rubi e Supreme e foi desenvolvida pelo Professor Fernando Mendes Pereira da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, campus de Jaboticabal. Seus

frutos são adequados para consumo *in natura* e para produção de polpa (Medina *et al.*, 1988, Pina 2010).

Essa espécie foi escolhida por ter sido identificada como sensível ao O₃ (Furlan *et al.*, 2004) além de vários estudos mostrarem seu potencial como bioindicadora deste poluente (Furlan *et al.* 2007, Pina & Moraes 2007, Dias *et al.* 2007, Pina & Moraes 2010, Pina 2010, Moraes *et al.* 2011).

3.1.3 Modo de cultivo e exposição

O cultivo e a exposição das plantas foram padronizados. Indivíduos jovens com cerca de 20 cm de altura e oito pares de folhas com limbo expandido foram obtidos em viveiro de espécies nativas que os comercializa com excelente qualidade (uniformes e saudáveis). As mudas foram transplantadas para vasos plásticos de volume igual a 3 litros, os quais foram preenchidos com substrato a base de casca de *Pinus* e turfa, enriquecidos com macro e micronutrientes (Tropstrato HT Hortaliças – Vida Verde[®]) e vermiculita média na proporção de 3:1 (Figura 3A). Após esta etapa, as plantas foram pulverizadas preventivamente com acaricida (*Actara*[®]) e solução de fumo, sendo este último um método preventivo contra pulgões. As mudas de 'Paluma' permaneceram em casa de vegetação por cerca de 30 dias (Figura 3B), para recuperação pós-transplante. Mensalmente, as plantas de *P. guajava* foram adubadas com 100 ml de solução hidrossolúvel de N:P:K (10:10:10).



Figura 3. A) Mudanças de 'Paluma' transplantadas para vasos contendo substrato padronizado; B) Casa de vegetação com ar filtrado situada no PEFI, São Paulo, SP.

Após isso, as mudas de 'Paluma' foram expostas a pleno sol em suportes de alumínio, aproximadamente 1,5 metros do solo, sobre os quais foram apoiadas caixas contendo água e cobertas com grades, para o apoio dos vasos, plástico preto, para evitar a proliferação de algas na água, e, por fim, placas de isopor com 5 cm de espessura, que continham buracos para encaixar os vasos, impedindo assim que os mesmos tombassem, além de evitar a proliferação de larvas de vetores de doenças (Figura 4A e B). A irrigação das plantas foi realizada por capilaridade, por meio de cordas de náilon inseridas na base dos vasos, as quais mantinham contato com a água presente nas caixas e com o substrato (Figura 4C).



Figura 4. A e B) Mudanças de 'Paluma' expostas de modo padronizado no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP; **C)** Corda de náilon responsável pela irrigação por capilaridade.

Ao todo, foram realizadas cinco exposições com duração de três meses cada, com início em maio/2012 e término em agosto/2013 (**1ª exposição:** 15/05/2012 a 15/08/2012; **2ª exposição:** 23/08/2012 a 19/11/2012; **3ª exposição:** 23/11/2012 a 19/02/2013; **4ª exposição:** 23/02/2013 a 23/05/2013; e **5ª exposição:** 29/05/2013 a 29/08/2013). A cada três meses, plantas (n = 18) foram levadas ao ambiente não controlado, enquanto outras (n = 6) foram mantidas sob ar filtrado em casa de vegetação (ambiente semi-controlado). Esta casa de vegetação conta com filtros de papel para retirada de partículas, filtros de carvão ativado para retirada de gases e ar condicionado para aproximar sua temperatura à do ambiente externo. As quatro plantas restantes, do total de 28 mudas, foram utilizadas para o cálculo de massa seca inicial (T_0), que será abordado mais adiante.

3.2 Monitoramento das condições meteorológicas, da concentração de ozônio e cálculo da EAO40

3.2.1 Condições meteorológicas

3.2.1.1 Ambiente aberto e não controlado

Os dados de temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar (%), precipitação pluviométrica (mm), radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e velocidade dos ventos (m s^{-1}) foram fornecidos pelo IAG-USP (Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da USP) e também monitorados pela equipe executora do projeto com uma estação meteorológica (WatchDog, Spectrum, IL, USA) instalada junto às plantas, a uma altura de 3 metros em relação ao solo (Figura 5A). Quando ausentes, buscou-se obter dados provenientes de estações próximas ao local de estudo, como as estações da CETESB que também monitoram as condições meteorológicas e que estão instaladas em Pinheiros, Interlagos, Mirante de Santana, além da estação do Instituto Astronômico e Geofísico localizada no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). Médias, máximas e mínimas diárias de temperatura e umidade relativa do ar, médias diárias de radiação fotossinteticamente ativa e velocidade do vento foram calculadas, enquanto para a precipitação pluviométrica foi calculada por meio da soma dos volumes diários e mensais.

Essas médias foram utilizadas na caracterização do ambiente de estudo, uma vez que para os modelos de condutância estomática (g_s) e fluxo estomático foram utilizadas médias horária de temperatura, umidade relativa, precipitação, radiação fotossinteticamente ativa, velocidade dos ventos e umidade relativa do solo nos vasos. Esta última, foi obtida descontinuamente (apenas nos dias de medidas de condutância estomática) com um Mini Trase (Soilmoisture Inc., CA, USA), com sonda de 5 cm (Figura 5B). Este equipamento mede a umidade do solo em função do tempo de reflexão de pulsos elétricos, método denominado TDR ou reflectometria no domínio do tempo (Oliveira Filho *et al.* 2000). Para estimar os dados horários dessa variável para todo o período de estudo, importante para o modelo de g_s , foi realizada uma análise de regressão entre as médias de umidade do solo dos dias em que foram feitas as medidas e a precipitação acumulada ao longo dos sete dias anteriores às medições.

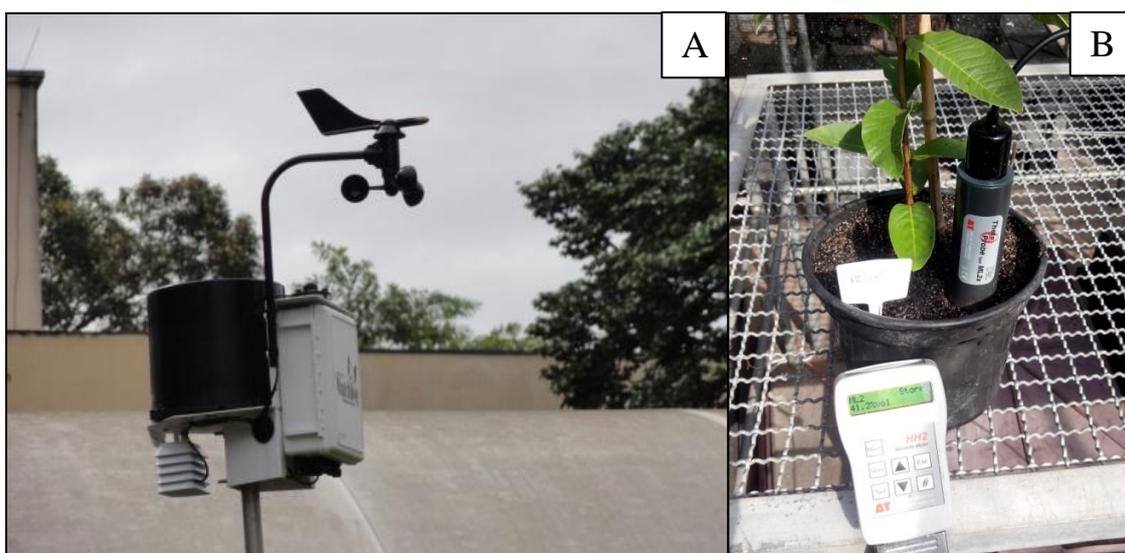


Figura 5. A) Estação meteorológica instalada junto as plantas expostas em ambiente aberto e não controlado (Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade São Paulo, SP). B) Medição da umidade relativa do solo pelo método TDR com um Mini Trase.

3.2.1.2 Ambiente fechado e semi-controlado

Os dados de temperatura e umidade relativa do ar foram coletados a cada 10 minutos por sensores conectados a um registrador de dados, a partir da segunda exposição (Agosto/12 a Novembro/12). Para a primeira exposição (Maio/12 a Agosto/12) foi preciso estimar os valores de ambos os parâmetros por meio de análise

de regressão entre os dados de temperatura e umidade relativa do ar existentes para a casa de vegetação e aqueles fornecidos pela estação meteorológica do IAG situada no PEFI, referentes ao período de setembro/12 a agosto/13. Com a obtenção das equações foi possível estimar dados faltantes a partir daqueles medidos no PEFI (Tabela 1).

Tabela 1. Equações da reta e coeficientes de determinação (R^2) obtidos por meio de análise de regressão linear entre dados de temperatura e umidade relativa do ar da casa de vegetação e do PEFI

Parâmetro	Equação	R^2
Temperatura do ar	$y = 1,08x^a + 1,67$	0,66
Umidade relativa do ar	$y = 1,13x^b - 21,05$	0,63

x^a se refere à média horária de temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$) e x^b à média horária de umidade relativa do ar (%), ambas medidas no PEFI

Dados de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) foram fornecidos pela mesma estação do IAG e multiplicados por um fator de atenuação exercido pelos vidros da casa de vegetação. Para obter tal fator, foram realizados cursos diários de medição da radiação solar a cada duas horas dentro e fora da casa de vegetação, sendo estimada uma atenuação da radiação incidente em cerca de 30%, ou seja, a radiação fotossinteticamente ativa no interior da casa de vegetação correspondia a 70% da medida a pleno sol.

Quanto à velocidade do vento, uma estação meteorológica instalada dentro da casa de vegetação registrou a ação deste fenômeno como sendo nula (velocidade do vento igual a 0). Entretanto, sabendo-se que o ar nunca está parado e a necessidade de dados acima de 0 para o modelo de condutância estomática de ozônio, assumiu-se um valor constante de $0,01 \text{ m s}^{-1}$. A estimativa da umidade do solo nos vasos foi realizada da mesma maneira que no ambiente aberto e não controlado.

Com os dados em mãos, médias, máximas e mínimas diárias para temperatura e umidade relativa do ar e médias diárias para radiação fotossinteticamente ativa foram calculadas para a caracterização geral deste ambiente.

3.2.2 Poluentes atmosféricos

3.2.3.1 Ambiente aberto e não controlado

Foram calculadas as concentrações médias e máximas de O₃ para o período de luz (8 h às 18 h) ao longo das exposições e registrados a concentração máxima horária e o número de vezes em que houve a ultrapassagem do padrão de qualidade do ar (160 µg m⁻³ ≈ 79 ppb) para cada exposição.

Calculou-se também o índice da EAO40 (Exposição Acumulada de Ozônio acima de uma concentração limite de 40 ppb) para o período de luz (primavera, outono e inverno: das 8 h às 18 h) e no verão das 8 h às 19 h. Basicamente, seu cálculo se dá pela diferença entre a concentração horária e o nível crítico, resultando em uma concentração horária excedente (por exemplo: 60 ppb – 40 ppb resulta em uma concentração excedente de 20 ppb) que é somada a outras concentrações horárias excedentes.

Em relação aos outros dois poluentes atmosféricos (NO e NO₂) medidos pela CETESB no local, calcularam-se as concentrações médias e máximas diárias (24 h) e, no caso do NO₂, o número de ultrapassagens do padrão de qualidade do ar (≈ 170 ppb).

3.2.3.2 Ambiente fechado e semi-controlado

As concentrações atmosféricas de O₃ não foram medidas na casa de vegetação. Entretanto, estudos anteriores mostraram que as concentrações neste ambiente foram sempre inferiores a 10 µg m⁻³ (Bulbovas *et al.* 2010). Devido à isso, considerou-se que a concentração horária de ozônio dentro da casa de vegetação (ambiente fechado e semi-controlado) correspondia a 10% da concentração de O₃ medida na estação de monitoramento da qualidade do ar do Ibirapuera, uma vez que J. M. Pina (2010) observou que as concentrações deste local são semelhantes as do PEFI.

3.3 Cursos diários de condutância estomática para ‘Paluma’

Como parte central deste estudo, foi necessária a caracterização da condutância estomática da espécie *Psidium guajava* ‘Paluma’. Para isso, cursos diários (das 8:00 h às 16:00 h, horário solar) foram realizados semanalmente em dias que apresentaram

diferentes condições meteorológicas (temperatura e umidade relativa do ar, radiação fotossinteticamente ativa, déficit de pressão de vapor e umidade do solo) e de qualidade do ar (concentração de O_3), fatores que modulam a resposta da condutância estomática. As medidas foram tomadas em plantas escolhidas aleatoriamente, na primeira folha com o limbo totalmente expandido, o que correspondia ao 3° ou 4° nó a partir do ápice. Utilizou-se um analisador portátil de gases por infravermelho (LI-6400XT, LI-COR, NE, USA) operando em condições ambientais de radiação fotossinteticamente ativa, umidade relativa do ar e temperatura, enquanto a concentração de CO_2 foi controlada a 390 ppm (Figura 6A e B).



Figura 7. A) Medidas de condutância estomática em *Psidium guajava* ‘Paluma’. B) Folha com limbo totalmente expandida acoplada à câmara do analisador de trocas gasosas.

As medidas em ambiente não controlado foram realizadas semanalmente sempre nas mesmas plantas ($n = 10$), do início ao término dos respectivos períodos de exposição, mudando-se apenas as folhas (3° ou 4° nó) em que se faziam as medidas, conforme o crescimento da planta. Já em ambiente semi-controlado, as medidas foram tomadas mensalmente em todas as plantas, devido ao menor número de mudas ($n = 6$) mantidas no local.

3.4 Obtenção da condutância estomática modelada

A primeira etapa para o cálculo do fluxo foi obter a condutância estomática modelada, onde o passo a passo é descrito a seguir.

3.4.1 Condutância estomática máxima, mínima e relativa

Os percentis de 95 a 99% do conjunto de dados de condutância estomática referentes à *Psidium guajava* ‘Paluma’ foram calculados para se obter a condutância estomática máxima (g_{\max}) da espécie. Em seguida, foi realizada a análise descritiva desses percentis, sendo que o valor de g_{\max} correspondeu à média do percentil que apresentou os menores valores de desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variância e intervalo de confiança da média, no caso o percentil 98%. A g_{\max} é expressa em $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A condutância estomática mínima (g_{\min}) da espécie foi obtida pelo mesmo procedimento realizado para o cálculo de g_{\max} , diferindo apenas nos percentis utilizados, que foram de 1 a 5% do conjunto de dados de condutância estomática, sendo escolhida a média do percentil 3%. Em seguida, o valor de g_{\min} foi transformado em fração (f_{\min}) da condutância máxima obtida (exemplo: quando g_{\min} é igual a 2% da condutância máxima a fração corresponde a 0,02).

Os dados de condutância estomática superiores e inferiores a g_{\max} e f_{\min} , respectivamente, foram excluídos (total de 37 medidas) e, então, calculada a condutância relativa (g_s relativa), que foi obtida dividindo-se a condutância medida pela condutância máxima ($g_s \text{ medida}/g_{\max}$), apresentando um valor de 0 a 1.

3.4.2 Parametrização da condutância estomática de ‘Paluma’

Os dados de g_s relativa foram relacionados com as horas do dia, com o intuito de caracterizar o perfil diário da g_s para ‘Paluma’. Esta também foi relacionada com cada parâmetro levado em consideração pelo modelo neste estudo (temperatura, déficit de pressão de vapor, radiação fotossinteticamente ativa, umidade do solo e dia do ano), obtendo-se as relações existentes entre ambos. Essas relações foram descritas por diversos autores (Jarvis 1976, Jones 1992, Emberson *et al.*, 2000) e podem ser representadas por funções matemáticas. Para estabelecê-las, utilizou-se a técnica das “*curvas envolventes*” (Schmidt *et al.* 2000, Gonzales-Fernandez *et al.* 2010), ou seja, primeiro é organizada uma matriz com os valores medidos de cada variável ambiental e a g_s relativa correspondente, a seguir, esse conjunto de dados é dividido em classes de frequências e para cada uma delas calcula-se o percentil 99, que é o “boundary point” daquela classe, depois é feito o ajuste da curva definida por eles. Assim, a modelagem

torna-se menos dependente de *outliers* que poderiam representar medições de qualidade duvidosa.

As funções foram calculadas segundo LRTAP Convention (2011):

- Função da radiação fotossinteticamente ativa (f_{RFA}):

$$f_{RFA}: y = 1 - e^{-\alpha * RFA}$$

onde, “y” é o valor do percentil 99 de g_s relativa ($g_{s0,99}$); o “e” se refere ao número de Euler, constante igual a 2,718, indicando a função exponencial de base e; “RFA” é a radiação fotossinteticamente ativa que corresponde ao valor de “y”; e “ α ” é o coeficiente de inclinação da reta que define a curva de g_s em relação a RFA, que é o parâmetro que se quer obter.

- Função da temperatura do ar (f_{temp}):

$$f_{temp} = [(T - T_{min}) / (T_{otm} - T_{min})] * [(T_{máx} - T) / (T_{máx} - T_{otm})]^{bt}$$

onde, “T” é a temperatura do ar em °C, “ $T_{mín}$ ” e “ $T_{máx}$ ” são as temperaturas mínima e máxima em que ocorre o fechamento dos estômatos, “ T_{otm} ” é a temperatura ótima para a condutância estomática e “bt” é definido pela seguinte fórmula:

$$bt = (T_{máx} - T_{otm}) / (T_{otm} - T_{mín})$$

- Função para os dias do ano (f_{DA}), conhecida também por função fenológica:

$$\text{Quando } A_{início} \leq da < (A_{início} + f_{DA_c})$$

$$f_{DA} = (1 - f_{DA_a}) * [(da - A_{início}) / f_{DA_c}] + f_{DA_a}$$

$$\text{quando } (A_{início} + f_{DA_c}) \leq da \leq (A_{final} - f_{DA_d})$$

$$f_{DA} = 1$$

quando $(A_{\text{final}} - f_{\text{DA}_d}) < da \leq A_{\text{final}}$

$$f_{\text{DA}} = (1 - f_{\text{DA}_b}) * [(A_{\text{final}} - da) / f_{\text{DA}_d}] + f_{\text{DA}_b}$$

onde “da” é o dia do ano; “ $A_{\text{início}}$ ” e “ A_{final} ” são os dias do ano para o início e fim do período de exposição ao ozônio, respectivamente; “ f_{DA_a} ” e “ f_{DA_b} ” denotam a fração máxima de g_{max} que a condutância estomática apresenta no início e fim do período de exposição ao ozônio, respectivamente, e “ f_{DA_c} ” e “ f_{DA_d} ” são parâmetros específicos do receptor que descrevem a forma da função dentro do período de acumulação.

- A função para o déficit de pressão de vapor (f_{DPV}) foi feita em duas etapas:

A equação que descreve a relação entre g_s e DPV foi obtida por meio da análise de regressão linear entre os percentis 99 e déficit de pressão de vapor, descrita abaixo:

$$y = -0,229x + 1,277$$

A partir desta equação, obteve-se o DPV em que a condutância é máxima ($g_s = 1$, DPV_{max}) e mínima ($g_s = f_{\text{min}}$, DPV_{min}). Em seguida, a função deste parâmetro foi obtida utilizando a seguinte fórmula:

$$f_{\text{DPV}} = \min\{1, \max\{f_{\text{min}}, ((1-f_{\text{min}}) * (\text{DPV}_{\text{min}} - \text{DPV}) / (\text{DPV}_{\text{min}} - \text{VPD}_{\text{max}})) + f_{\text{min}}\}\}$$

- A função para o umidade do solo (f_{US}) foi feita em duas etapas, assim como para f_{DPV} :

A equação que descreve a relação entre g_s e US foi obtida por meio da análise de regressão linear entre os percentis 99 e a umidade do solo, descrita abaixo:

$$y = 0,052x - 0,137$$

A partir desta equação, obteve-se a US em que a condutância é máxima ($g_s = 1$, $US_{máx}$) e mínima ($g_s = f_{mín}$, $US_{mín}$). Em seguida, a função deste parâmetro foi obtida utilizando a seguinte fórmula:

$$fUS = \min\{ 1, \max\{fmin, ((1-fmin)*(USmin-US) / (USmin- USmax)) + fmin\} \}$$

O ajuste das curvas possibilitou coletar informações do comportamento da condutância estomática de ‘Paluma’ em relação às variáveis ambientais, as quais são necessárias para o cálculo da g_s modelada. Essas informações correspondem a parâmetros como as temperaturas mínima ($T_{mín}$) e máxima ($T_{máx}$) em que ocorre o fechamento estomático para a espécie, bem como a temperatura ótima (T_{otm}) para a sua condutância estomática; os valores de déficit de pressão de vapor em que a condutância é máxima ($DPV_{máx}$) e mínima ($DPV_{mín}$) e os valores de umidade do solo em que a condutância é máxima ($US_{máx}$) e mínima ($US_{mín}$), anteriormente mencionados; o valor do ângulo de inclinação da reta que define a relação entre g_s e RFA (coeficiente α), também descrito acima; além do perfil da condutância estomática da ‘Paluma’ ao longo do ano, seguindo-se o calendário Juliano.

3.4.3 Condutância estomática modelada

Para se obter a condutância estomática modelada pelos parâmetros ambientais, utilizou-se no presente estudo o algoritmo matemático elaborado por Jarvis (1976) e baseado em Emberson *et al.* (2000, 2001), também denominado modelo de condutância estomática. Tal modelo procura considerar todos os fatores que modulam o processo de condutância estomática, como expresso abaixo:

$$g_s \text{ modelada} = g_{max} * f_{DA} * f_{RFA} * \max\{f_{mín}, (f_{temp} * f_{DPV} * f_{US})\}$$

onde g_s modelada representa a condutância estomática ao vapor de água expressa em ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); g_{max} representa a condutância estomática máxima da espécie; f_{RFA} representa a influência da radiação fotossinteticamente ativa em g_{max} ; f_{DA} representa a influência do dia do ano (segundo o calendário juliano) em g_{max} ; $f_{mín}$ representa a fração do valor da $g_{mín}$ em relação à g_{max} ; f_{temp} representa a influência da temperatura do ar (em

°C) em g_{\max} ; f_{DPV} representa a influência do déficit de pressão de vapor (kPa) em g_{\max} ; f_{US} representa a influência da umidade do solo (% volume) em g_{\max} .

Com a parametrização definida, calculou-se para cada hora o impacto das variáveis ambientais no modelo de g_s , sendo estes expressos em termos de seu efeito relativo em g_{\max} , escalonados de 0 (quando g_s é igual a f_{\min}) a 1 (quando g_s é igual a g_{\max}). Por fim, foram obtidos dados horários de condutância estomática modelada ao vapor de água.

3.5 Cálculo do fluxo estomático de ozônio

O fluxo estomático de ozônio foi calculado utilizando-se o modelo DO_3SE (*Deposition of Ozone for Stomatal Exchange – Deposição de Ozônio por Troca Estomática*, Emberson *et al.* 2001). Este modelo considera, além da condutância estomática modelada por diferentes parâmetros ambientais, as resistências enfrentadas durante a deposição do poluente, desde a atmosfera até a sua absorção pela planta via estômato (LRTAP Convention 2011). O passo a passo para o cálculo é descrito abaixo.

O cálculo do fluxo estomático de O_3 (FO_3) por unidade de área foliar ($nmol\ m^{-2}\ s^{-1}$) é dado por:

$$FO_3 = cO_3 * g_s \text{ modelada} * D_{O_3/H_2O} * r_c / (r_b + r_c)$$

onde $r_c = 1/g_s \text{ modelada} + g_{\text{ext}}$; $r_b = 11,7\ s\ m^{-1}$, $g_{\text{ext}} = 0,0004\ m\ s^{-1}$, cO_3 = concentração média horária de O_3 ; “ r_c ” é a resistência da superfície foliar (resistência estomática); “ g_{ext} ” é a condutância foliar cuticular e “ r_b ” é a resistência da camada limite, que leva em consideração a velocidade média horária do vento e a dimensão média da folha (a de ‘Paluma’ foi estimada em $0,055\ m^2$). Esses valores foram calculados com base na diferença entre a difusividade do vapor de água e de O_3 na atmosfera; $D_{O_3/H_2O} = 0,663$ (Massman 1998).

Adiante, calculou-se o fluxo estomático horário acumulado por unidade de área foliar, em $mmol\ m^{-2}\ h^{-1}$, dado pela seguinte fórmula:

$$FAO_3 = \Sigma FO_3 * 3600 * 10^{-6}$$

e, por fim, calculou-se o fluxo estomático de ozônio acumulado (FAO_3 , em $mmol\ m^{-2}$) para todo o período de exposição e para cada semana em que foram realizadas medidas das variáveis-resposta.

Todas essas equações e suas constantes foram apresentadas em LRTAP Convention (2011).

3.6 Variáveis-resposta

3.6.1 Sintomas foliares visíveis

A verificação da presença de sintomas foliares visíveis foi realizada semanalmente, nos ambientes não controlado e semi-controlado, junto às medidas de condutância estomática, exceto na primeira exposição, quando foram realizadas mensalmente. Com o auxílio de uma lupa (aumento de 10x), estimou-se as porcentagens de área foliar ocupada pelos sintomas, classificando-os em intervalos de 1 – 5 % (classe 1), 6 – 25 % (classe 2), 26 – 50 % (classe 3), 51 – 75 % (classe 4) e 76 – 100 % (classe 5).

Com esses dados, foram calculados os índices de incidência e severidade. O primeiro se refere à porcentagem de plantas com sintomas em relação ao número total de plantas, enquanto o segundo é dado pela porcentagem de folhas com sintomas em relação ao número total de folhas da planta (Chappelka *et al.* 1997). Os sintomas foliares foram classificados como induzidos pelo O_3 com base nos critérios apresentados em Novak *et al.* (2003), presentes na figura 8, e nos estudos anteriormente realizados com ‘Paluma’ em condições controladas (Furlan *et al.* 2007) e em campo (Pina & Moraes 2007, Pina 2010, Tresmondi 2010). Os sintomas consistem em pontuações intervenais vermelho-amarronzadas, restringindo-se a superfície adaxial das folhas mais velhas, devido ao acúmulo de compostos fenólicos nos vacúolos, como as antocianinas, e que, com o aumento da exposição de ozônio, passam a cobrir uma maior superfície do limbo e a atingir também folhas mais novas.

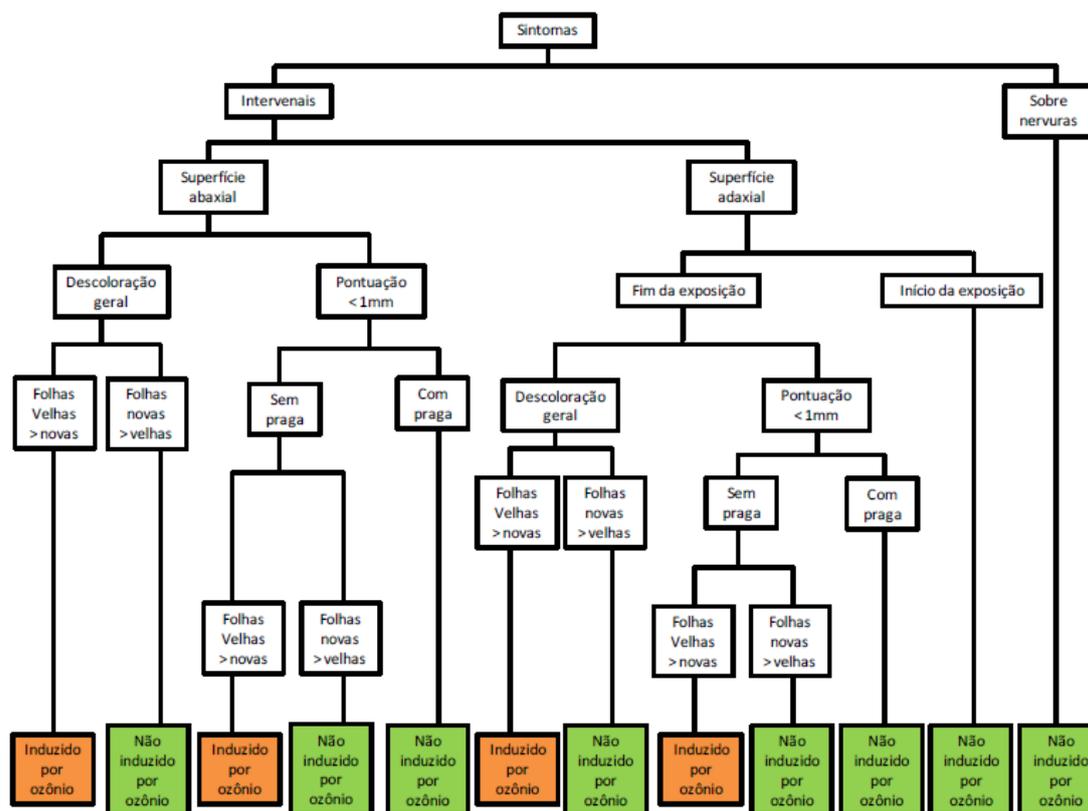


Figura 8. Chave dicotômica para identificação dos sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em plantas sensíveis (Innes *et al.* 2001 apud Novak *et al.* 2003).

Além dos índices mencionados anteriormente, calculou-se o índice de injúria foliar (IIF), segundo Furlan *et al.* (2007):

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

onde N_1 , N_2 , N_3 , N_4 e N_5 representam a quantidade de folhas com sintomas classificados respectivamente na classe 1, classe 2, classe 3, classe 4 e classe 5; e N_0 é o número de folhas que não apresentaram sintomas foliares visíveis induzidos por O_3 . Este índice, além considerar o número de folhas que apresentam sintomas induzidas pelo ozônio, também leva em conta a porcentagem de área foliar ocupada por sintomas.

3.6.2 Crescimento

O crescimento em altura, diâmetro caulinar e número de folhas foram avaliados com o intuito de verificar suas relações com o fluxo estomático de O₃. As medidas foram tomadas antes do início da exposição de cada lote de plantas (t₀) e a 30, 60 e 90 dias de exposição (t₁, t₂ e t₃) nos ambientes não controlado e semi-controlado. Ao final das exposições, calculou-se as taxas de crescimento relativo (TCR) mensal e trimestral para cada parâmetro, pela seguinte fórmula:

$$TCR = [(Ln_f - Ln_i) / t_f - t_i]$$

onde Ln_f é o logaritmo natural do valor final e Ln_i é o logaritmo natural do valor inicial; t_f - t_i = número de dias (Benincasa 2003).

As medidas de massa de matéria seca foram realizadas inicialmente em 4 plantas, mencionadas anteriormente, as quais representaram a massa de matéria seca inicial (t₀) de folhas, caules/ramos e raízes para ambos os locais de exposição. Ao término de cada exposição, de aproximadamente 90 dias (t₃), foram realizadas as medidas de massa de matéria seca em todas as plantas que foram expostas. Em laboratório, as plantas foram separadas em folhas, caule/ramos e raízes e levadas para a estufa a cerca de 70 °C, onde permaneceram por no mínimo sete dias. A massa seca de cada fração foi determinada em balança de precisão. Com os dados obtidos foi calculada a biomassa seca total para cada período de exposição, a razão raiz/parte aérea (massa de matéria seca de raiz/massa de matéria seca de caules/ramos e folhas) e, por fim, a taxa de crescimento relativo por meio da fórmula descrita acima.

3.7 Análise estatística

Como a parte central desse modelo é a condutância estomática, foi realizada análise de regressão linear entre a condutância medida e a modelada para verificar a força dessa última. Para isso, dados horários de condutância modelada foram calculadas a partir dos dados referentes a cada medida de condutância estomática. A partir desta análise, determinaram-se os valores do coeficiente de correlação “r”, o coeficiente de determinação R² e o nível de significância “P”. A precisão da g_s modelada foi estimada pelo cálculo da raiz do quadrado médio do erro (RQME):

$$RQME = [\sum(s_i - o_i)^2 / N]^2$$

em que "s" é o valor estimado, "o" o valor observado e N o número de observações para geração do modelo, segundo Chang *et al.* (2004) e Yu *et al.* (2006).

Os dados de crescimento em altura, diâmetro e número de folhas de plantas mantidas em ambiente aberto e não controlado e ambiente fechado e semi-controlado foram comparados por meio de teste não paramétrico de Mann-Whitney, enquanto para o mesmo tratamento ao longo da exposição foi realizada a análise paramétrica One Way Anova (Holm-Sidak) ou a Anova on Ranks (Tukey Test), quando os critérios para testes paramétricos não foram atingidos. Os dados de massa seca entre ambientes também foram comparados por meio de análises de Rank Sum Test (Mann-Whitney), enquanto para o mesmo tratamento entre as exposições foi realizada a análise paramétrica One Way Anova (Holm-Sidak) ou a Anova on Ranks (Tukey Test).

A análise de regressão linear também foi realizada entre as variáveis-explicativas (FAO₃ e EAO40) e as variáveis-respostas (IIF, índice de incidência e severidade, taxas de crescimento em altura, diâmetro, nº de folhas, massa seca de folhas, caules/ramos, parte aérea, raiz e total e razão raiz/parte aérea). Deste modo, foi possível comparar a precisão e capacidade preditiva de ambos os índices e verificar qual modelo é mais adequado às condições ambientais e a espécies tropicais.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das condições meteorológicas e dos poluentes atmosféricos

4.1.1 Condições meteorológicas

4.1.1.1 Ambiente aberto e não controlado

A temperatura apresentou um perfil sazonal (Figura 9). As maiores médias foram registradas durante a primavera e verão (setembro/2012 a março/2013), período correspondente às 2ª e 3ª exposições, sendo que as médias e máximas registradas nesse período foram maiores do que a média histórica (1933-2012) em 3°C a 4°C (IAG-USP 2012). As menores temperaturas ficaram restritas ao outono e inverno (maio a agosto/2012 e abril a agosto/2013). O mês de dezembro foi o mais quente, com média mensal de 24 °C, e o mês de julho de 2013 o mais frio (16 °C).

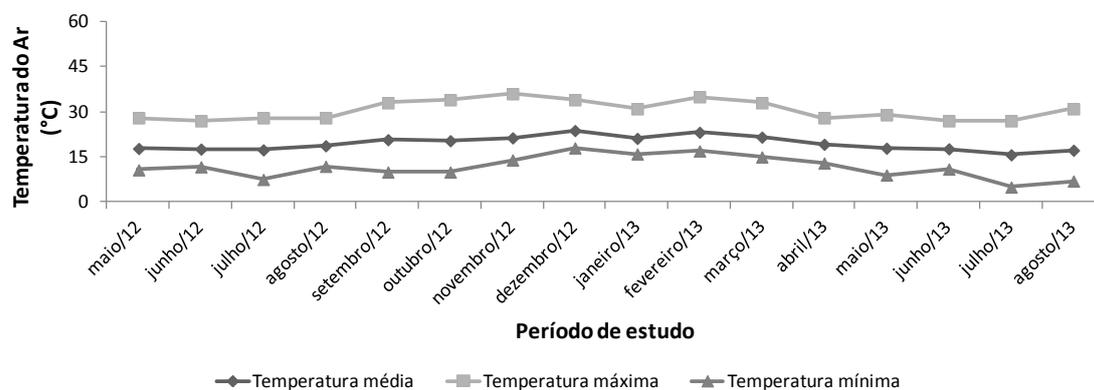


Figura 9. Médias, máximas e mínimas mensais de temperatura do ar, em °C, em ambiente aberto e não controlado (Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP), referentes ao período de estudo (maio/2012 a agosto/2013).

As médias mensais de umidade relativa do ar variaram de 69% a 85% (Figura 10). As máximas foram sempre muito próximas a 100% e o aspecto sazonal foi dado pela média das mínimas com o inverno de 2013 (5ª exposição) apresentando o ar mais seco, enquanto e os meses de janeiro e abril de 2013 (3ª exposição) foram os mais úmidos.

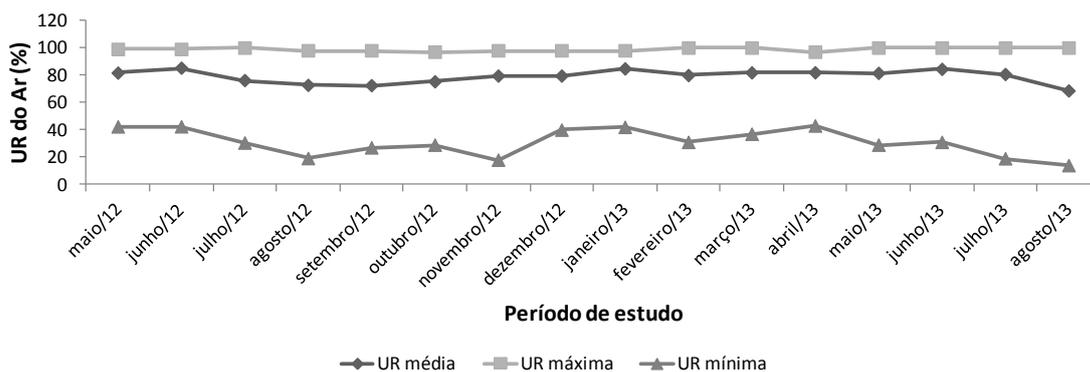


Figura 10. Médias, máximas e mínimas mensais de umidade relativa (UR) do ar, em %, em ambiente aberto e não controlado (Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP), referentes ao período de estudo (maio/2012 a agosto/2013).

As médias mensais de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) para o período de luz apresentaram um perfil sazonal bem definido (Figura 11). As maiores médias de RFA foram observadas nas estações da primavera e verão (2^a e 3^a exposições), com fevereiro de 2013 apresentando a média mais alta (510 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No outono e no inverno de 2012 e 2013 (1^a, 4^a e 5^a exposição) foram registradas as menores médias, com o mês de junho de 2013 sendo o de menor RFA (160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

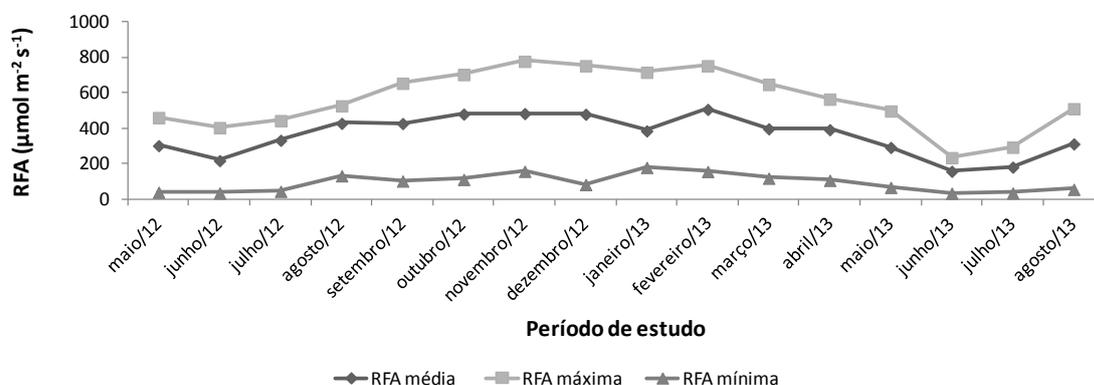


Figura 11. Médias, máximas e mínimas mensais de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para o período de luz, em ambiente aberto e não controlado (Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP), referentes ao período de estudo (maio/2012 a agosto/2013).

Os dados de precipitação pluviométrica demarcaram duas épocas do ano muito distintas, a época chuvosa e seca (Figura 12). A época chuvosa correspondeu às estações de primavera e verão (2^a e 3^a exposição), com o mês de dezembro de 2012 (3^a

exposição) registrando o maior volume, com um total de 368 mm. A época seca correspondeu às estações de outono e inverno (1^a, 4^a e 5^a exposição), com o ano de 2012 sendo mais seco em relação a 2013, com 30 mm e 150 mm respectivamente.

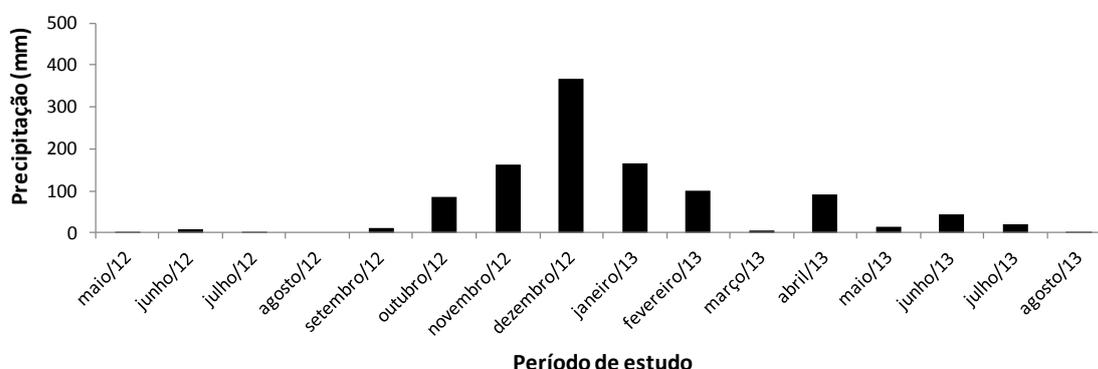


Figura 12. Volumes mensais de precipitação pluviométrica, em mm, em ambiente aberto e não controlado (Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP), referentes ao período de estudo (maio/2012 a agosto/2013).

Novembro de 2012 foi o mês com as maiores velocidades do vento (Figura 13), com média mensal de $2,7 \text{ m s}^{-1}$ (2^a exposição). Já as menores médias mensais foram registradas no período de fevereiro a julho de 2013 (4^a e 5^a exposição), com médias abaixo de $1,6 \text{ m s}^{-1}$

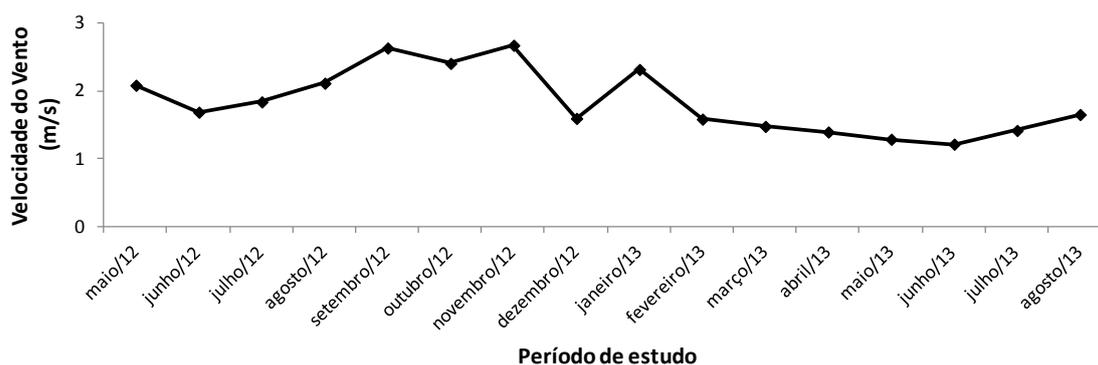


Figura 13. Médias mensais de velocidade do vento, em m s^{-1} , em ambiente aberto e não controlado, (Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP), referentes ao período de estudo (maio/2012 a agosto/2013).

4.1.1.2 Ambiente fechado e semi-controlado

As médias mensais não apresentaram grandes variações (Figura 14), ficando entre 22 °C e 25 °C, na maioria dos meses, enquanto médias mensais menores foram observadas apenas nos meses de maio a agosto de 2012 e julho de 2013. Entretanto, vale lembrar que para os quatro primeiros meses de estudo, correspondentes ao período da primeira exposição, os valores foram obtidos por meio de estimativas. Para os meses de maio a julho de 2012 a temperatura atingiu 31 °C, enquanto que para a maioria dos demais foram sempre superiores a 40 °C, registrando uma máxima de 46 °C no mês de setembro de 2012 (2ª exposição). As menores temperaturas foram verificadas no mês de julho (inverno), tanto de 2012 como de 2013, quando os termômetros registraram mínima de 8 °C.

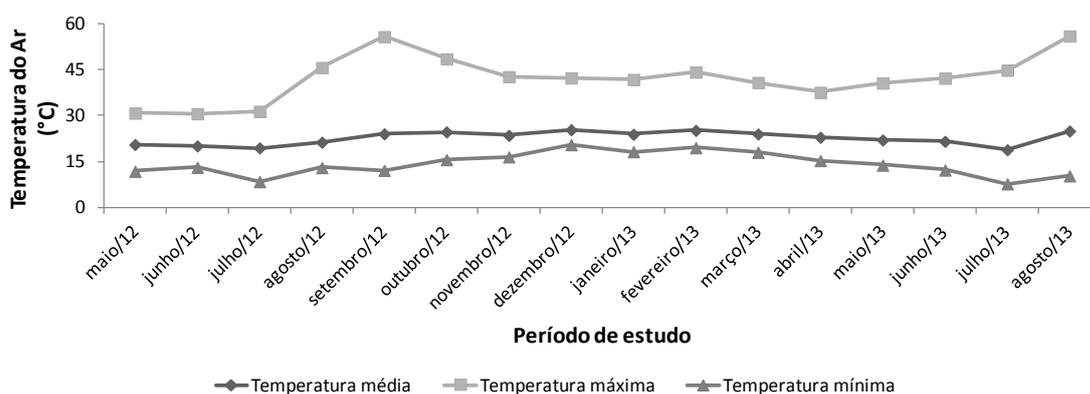


Figura 14. Médias, máximas e mínimas mensais de temperatura do ar, em °C, em ambiente fechado e semi-controlado, referentes ao período de estudo (maio/2012 a agosto/2013).

As médias diárias de umidade relativa do ar foram menores do que no ambiente aberto, com valores frequentemente abaixo dos 80% (Figura 15). O mês mais seco foi agosto de 2012 (63%), enquanto o mais úmido foi junho de 2012 (76%), ambos representando a 1ª exposição.

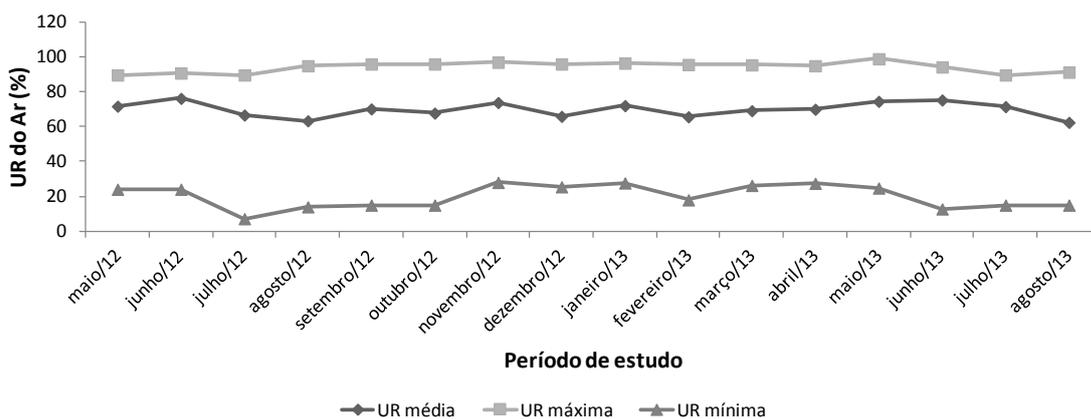


Figura 15. Médias, máximas e mínimas mensais de umidade relativa (UR) do ar, em %, em ambiente fechado e semi-controlado, referentes ao período de estudo (maio/2012 a agosto/2013).

As médias mensais de radiação fotossinteticamente ativa para o período de luz também evidenciaram um perfil sazonal. As estações da primavera e verão (2^a e 3^a exposições) apresentaram os maiores valores (Figura 16), com maior irradiância em fevereiro de 2013, tendendo a um declínio nos meses referentes ao outono e inverno.

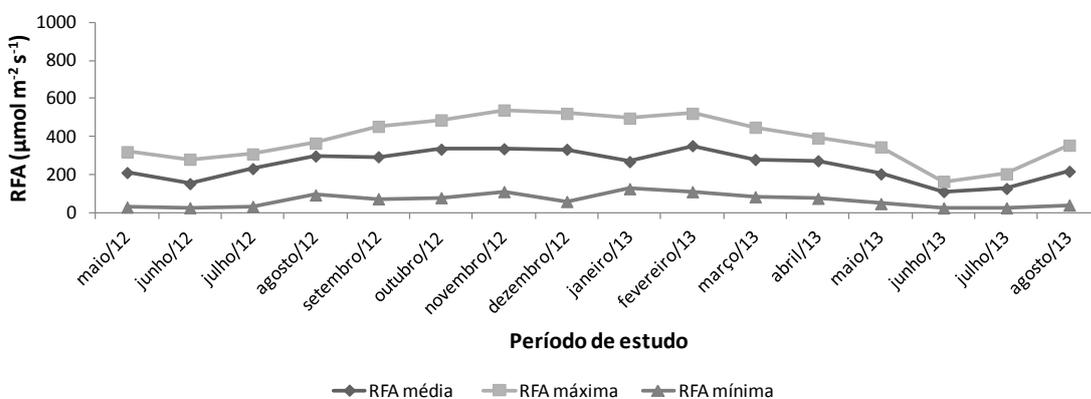


Figura 16. Médias, máximas e mínimas mensais de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para o período de luz, em ambiente fechado e semi-controlado, referentes ao período de estudo (maio/2012 a agosto/2013).

4.1.2 Qualidade do ar

4.1.2.1 Ambiente aberto e não controlado

As maiores concentrações de NO foram verificadas ao longo da primeira e quinta exposições, períodos de inverno, as quais apresentaram concentrações médias de 25 ppb e 28 ppb, respectivamente (Tabela 2). Além disso, picos de concentração foram registrados diversas vezes, com máximas de 290 ppb e 437 ppb para ambas as exposições. As menores concentrações ocorreram na terceira exposição, período correspondente ao verão (novembro/2012 a fevereiro/2013). A média das concentrações de NO para esta exposição foi de 5 ppb, registrando a menor máxima (113 ppb) em relação às demais exposições.

As concentrações médias horárias de NO₂ foram sempre baixas durante o estudo aproximadamente 170 ppb, nunca ultrapassando o padrão de qualidade do ar estabelecido pela Resolução CONAMA n° 03/90 e adotado pela CETESB, média horária de 320 µg m⁻³, (CETESB 2012). Entre as exposições, observou-se picos de concentração mais altos durante a 1^a e 4^a exposições, com máximas acima dos 100 ppb (Tabela 2). Porém, as concentrações médias para estas não diferiram muito em relação às demais, com exceção feita a 3^a exposição, em que ocorreram as menores concentrações de todo o período de estudo, com média de 10 ppb e máxima de 59 ppb.

Tabela 2. Concentrações máxima e média de NO e NO₂, em ppb, registradas na 1^a exposição (15/05 a 15/08/2012), 2^a exposição (23/08 a 19/11/2012), 3^a exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4^a exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5^a exposição (29/05 a 29/08/2013), na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, São Paulo, SP

Exposição	NO		NO ₂	
	Máxima diária (ppb)	Média diária (ppb)	Máxima diária (ppb)	Média diária (ppb)
1 ^a	290	25	108	21
2 ^a	271	8	76	16
3 ^a	113	5	59	10
4 ^a	314	13	112	19
5 ^a	437	28	74	19

As concentrações de O₃ apresentaram uma variação temporal no decorrer do estudo, sendo possível ver um perfil anual muito bem definido para este poluente (Figura 17).

As maiores concentrações de O₃ para o período de luz (8 h às 18 h), foram verificadas nas estações de primavera e verão, épocas de altas temperaturas e radiação solar, descritos anteriormente, e que contribuem para a formação do poluente. Ambas as estações correspondem ao período pouco depois do início da 2^a exposição até aproximadamente 20 dias após o início da 4^a exposição. Neste período, as concentrações médias diárias foram altas em diversos momentos, atingindo às vezes valores próximos ao padrão de qualidade do ar, de aproximadamente 79 ppb (Figura 17).

As concentrações máximas diárias evidenciaram a ocorrência de vários episódios de picos de concentração. Estes foram responsáveis pela violação do padrão de qualidade do ar, tendo seu ápice na 2^a exposição, quando foram relatadas 47 ultrapassagens (Tabela 3). Essa exposição apresentou a pior qualidade do ar em relação ao O₃ quando comparada às demais, seguida da 3^a e 4^a exposições, respectivamente, com cerca de 10 ultrapassagens do padrão em cada uma. A concentração média para o período correspondente à 2^a exposição foi de 37 ppb. Além disso, a maior máxima horária também foi registrada na 2^a exposição, com 123 ppb, valor próximo ao obtido durante a 3^a e 4^a exposições.

Por outro lado, a 1^a e a 5^a exposições apresentaram médias diárias relativamente inferiores às demais (Figura 17). Além de ocorrerem pouquíssimas ultrapassagens do padrão de qualidade, ou até mesmo não ocorrer (Tabela 3), estas ainda apresentaram médias em torno dos 20 ppb e máximas abaixo dos 100 ppb.

A EAO40 também permitiu caracterizar os períodos referentes à primavera e ao verão como os mais favoráveis à formação de O₃ e, portanto, pior qualidade do ar. A 2^a exposição apresentou o maior valor de EAO40, 7.616 ppb h (Figura 18), seguida da 3^a e 4^a exposições, que apresentaram uma EAO40 menor, porém superior a 4.000 ppb h.

Um fato interessante e que vale a ressalva, é que, como explicado anteriormente, a 4^a exposição teve praticamente seus primeiros 20 dias ainda ocorrendo durante o verão, estação que propicia a formação de O₃. Ao analisar o gráfico de EAO40 para este período, verificou-se que grande parte do incremento deste índice se deu praticamente até o 20^o dia, estabilizando a partir de então até aproximadamente o 65^o dia, quando foi verificado um pequeno aumento da EAO40.

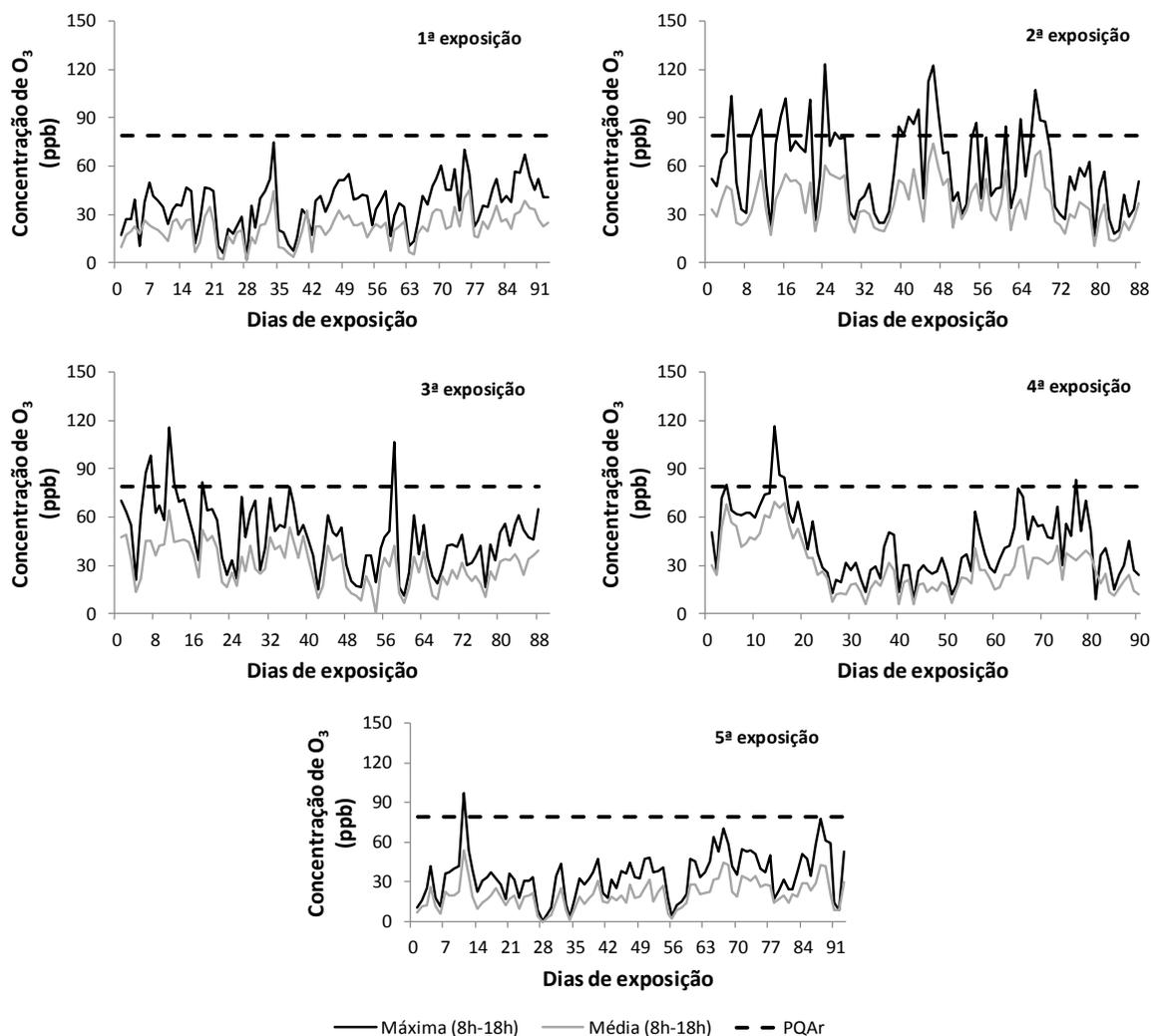


Figura 17. Concentrações máximas e médias de ozônio (ppb), durante o período de luz (8 às 18h), O₃ durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013), na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, São Paulo, SP. A linha tracejada indica o padrão de qualidade do ar adotado pela CETESB, de 79 ppb.

Quanto às 1ª e 5ª exposições, ambas não tiveram valores altos para o índice, ficando abaixo de 1.500 ppb h, ou seja, não alcançaram a metade do valor de referência utilizado pela CETESB e pela LRTAP Convention (2011) de 3.000 ppb h para um período de três meses.

Tabela 3. Concentrações máxima e média (ppb), EAO40 (ppb h) e o número de horas com ultrapassagens do padrão de qualidade do ar (PQAr) para a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013), na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, São Paulo, SP

Exposição	Máxima diária (ppb)	Média diária (ppb)	EAO40 (ppb h)	Nº de horas com ultrapassagens do PQAr
1ª	75	22	1123	0
2ª	123	37	7616	47
3ª	115	30	4507	12
4ª	116	29	4287	10
5ª	98	20	1272	3

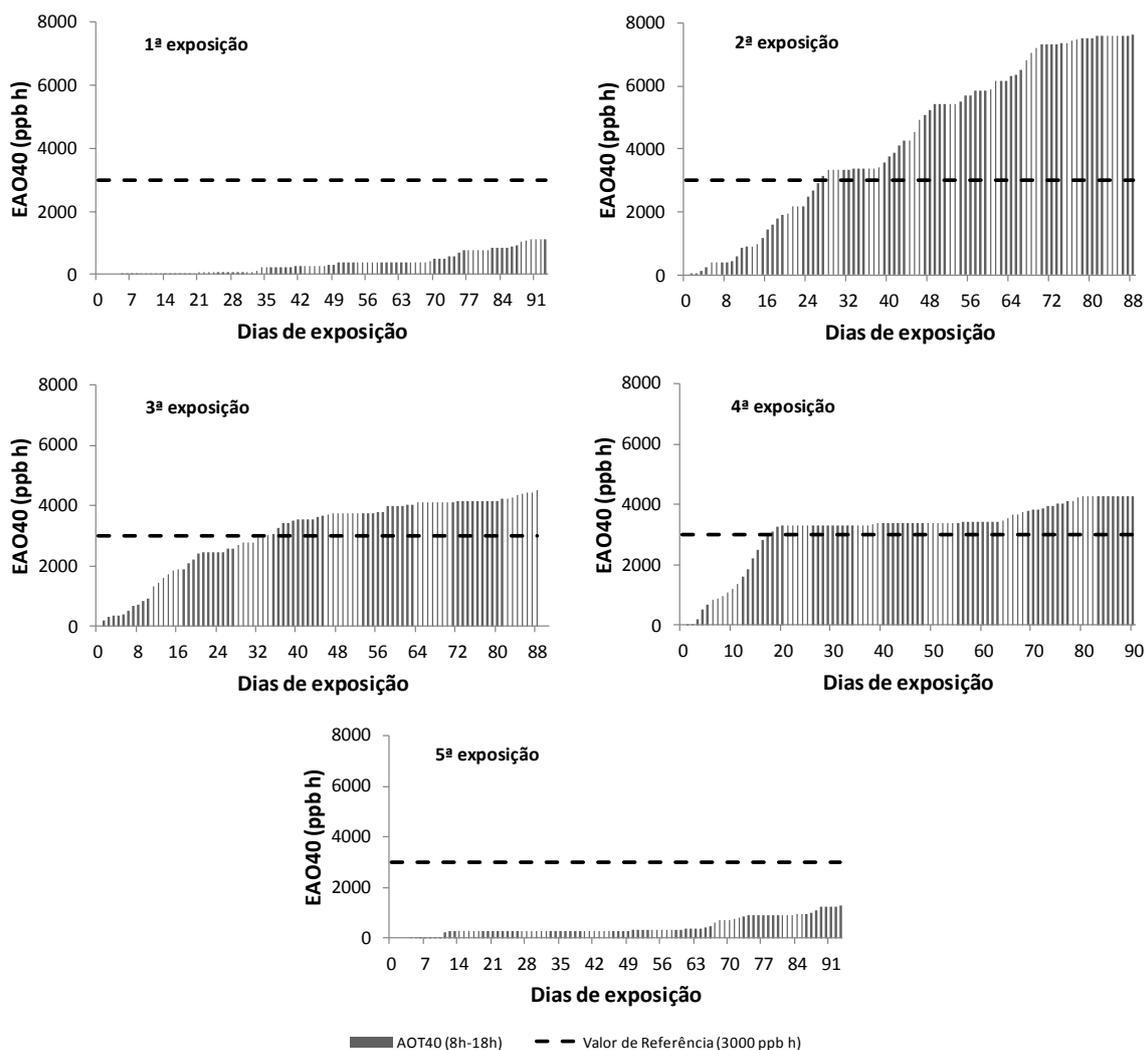


Figura 18. Concentração de ozônio acumulado acima de 40 ppb (EAO40 em ppb h) durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013), na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, São Paulo, SP. Linha tracejada representa o valor de referência da perda de produtividade agrícola (3000 ppb h) para um período de três meses, adotado pela CETESB até o ano de 2010.

4.1.2.2 Ambiente fechado e semi-controlado

As concentrações de O₃ dentro da casa de vegetação foram extremamente baixas em todas as exposições (Figura 19), não ultrapassando 15 ppb, e, conseqüentemente, chegando ao fim das exposições EAO40 igual a 0 ppb (Tabela 4). Entre as exposições, as concentrações médias foram praticamente semelhantes, todas próximas a 5 ppb.

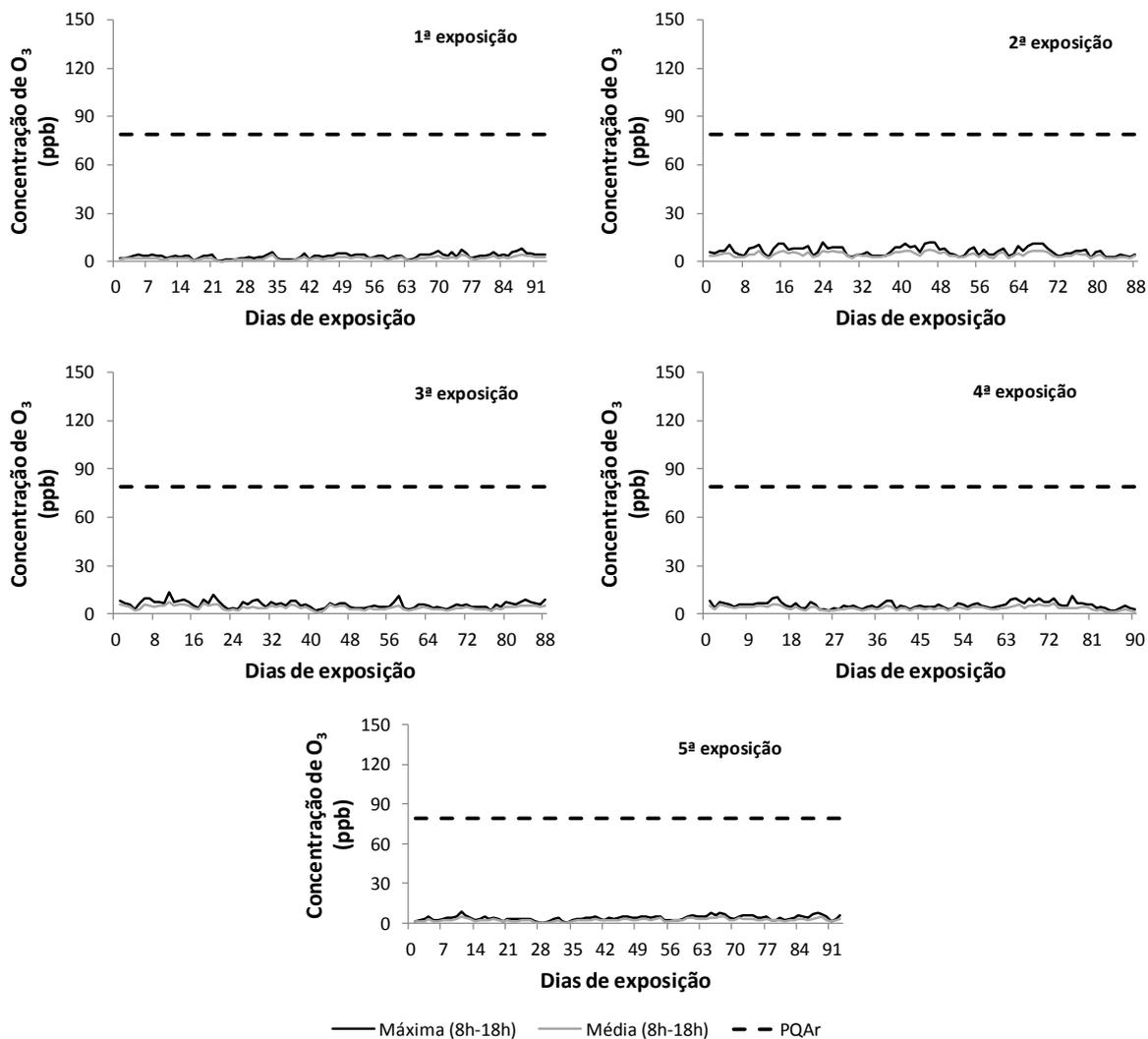


Figura 19. Concentrações máximas e médias diárias de ozônio (ppb) durante o período de luz (8 às 18h) durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013) no ambiente fechado e semi-controlado. A linha tracejada indica o padrão de qualidade do ar adotado pela CETESB, de 79 ppb.

Tabela 4. Concentrações máxima e média (ppb), EAO40 (ppb h) e número de ultrapassagens do padrão de qualidade do ar (PQAr) para a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013), no ambiente fechado e semi-controlado

Exposição	Máxima diária	Média diária	EAO40	Nº de ultrapassagens do PQAr
1ª	8	2	0	0
2ª	12	4	0	0
3ª	13	4	0	0
4ª	11	4	0	0
5ª	9	3	0	0

4.2 Condutância estomática de ‘Paluma’

Ao todo, foram realizados 39 cursos diários de condutância estomática (g_s) entre maio/2012 e agosto/2013, sendo 12 deles feitos em ambiente fechado e semi-controlado e outros 27 em ambiente aberto e não controlado. Com eles, foram obtidos 1451 medidas de g_s , às quais foram adicionadas 164 dados coletados anteriormente por J.M. Pina, totalizando 1615 medidas de g_s .

‘Paluma’ apresentou condutância estomática mais alta no período da manhã às 8 horas (Figura 20), com média próxima a $0,3 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No decorrer do dia, a g_s foi reduzida de modo praticamente linear, chegando ao fim de tarde (16 horas) com uma taxa média baixa, próxima a $0,1 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ocorrendo, às vezes, taxas próximas à zero.

4.2.1 Condutância máxima, mínima e parametrização da condutância estomática de *Psidium guajava* ‘Paluma’ segundo o modelo DO₃SE

A condutância máxima (g_{max}) de ‘Paluma’ foi de $721 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto a fração do valor da g_{min} em relação à g_{max} (f_{min}) foi de 0,026.

A relação entre g_s relativa (g_s/g_{max}) e os vários fatores que influenciam g_s e que, por isso, constam no modelo multiplicativo adotado são apresentados a seguir (Figura 21).

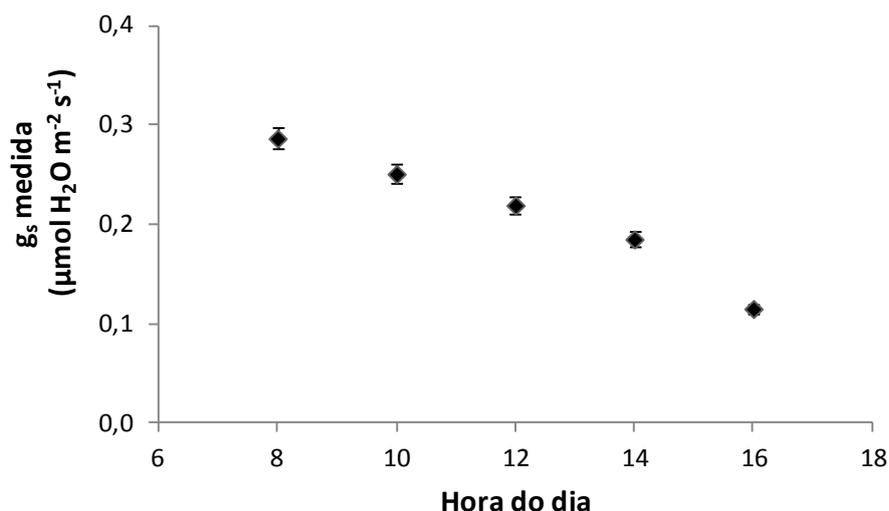


Figura 20. Variação diurna da taxa de condutância estomática (g_s média \pm erro padrão) em folhas de plantas jovens de *Psidium guajava* ‘Paluma’ expostas de maio/ 2012 a agosto/2013, no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

A função que descreve a relação entre g_s relativa e temperatura do ar é dada pelo modelo de Gauss (Figura 21A). Ela foi caracterizada por nove pontos, sendo o ajuste considerado significativo ($P < 0,001$).

As taxas de g_s para ‘Paluma’ tendem a aumentar conforme a elevação da temperatura até atingir uma temperatura ótima para tal resposta fisiológica. Com o aumento contínuo da temperatura, inicia-se um declínio de g_s até o momento em que este parâmetro ambiental resulte no fechamento dos estômatos, impedindo que as trocas gasosas ocorram. As temperaturas mínima (T_{\min}) e máxima (T_{\max}) para que o fechamento dos estômatos em ‘Paluma’ ocorra, bem como a temperatura ótima (T_{otm}) para a condutância estomática da espécie foram de 15 °C, 43 °C e 28 °C, respectivamente (Tabela 5).

A relação entre RFA e g_s relativa foi caracterizada por dezessete pontos e descrita por uma função hiperbólica (Figura 21B). A função mostra que a condutância estomática se eleva com o aumento da RFA até atingir um patamar em que se mantém constante, independente do aumento contínuo de luz, também considerada significativa ($P < 0,001$). A função da RFA possibilitou obter o coeficiente de inclinação da reta, conhecido como coeficiente “ α ”, representado pelo valor de 0,014 (Tabela 5), que é utilizado no modelo de g_s .

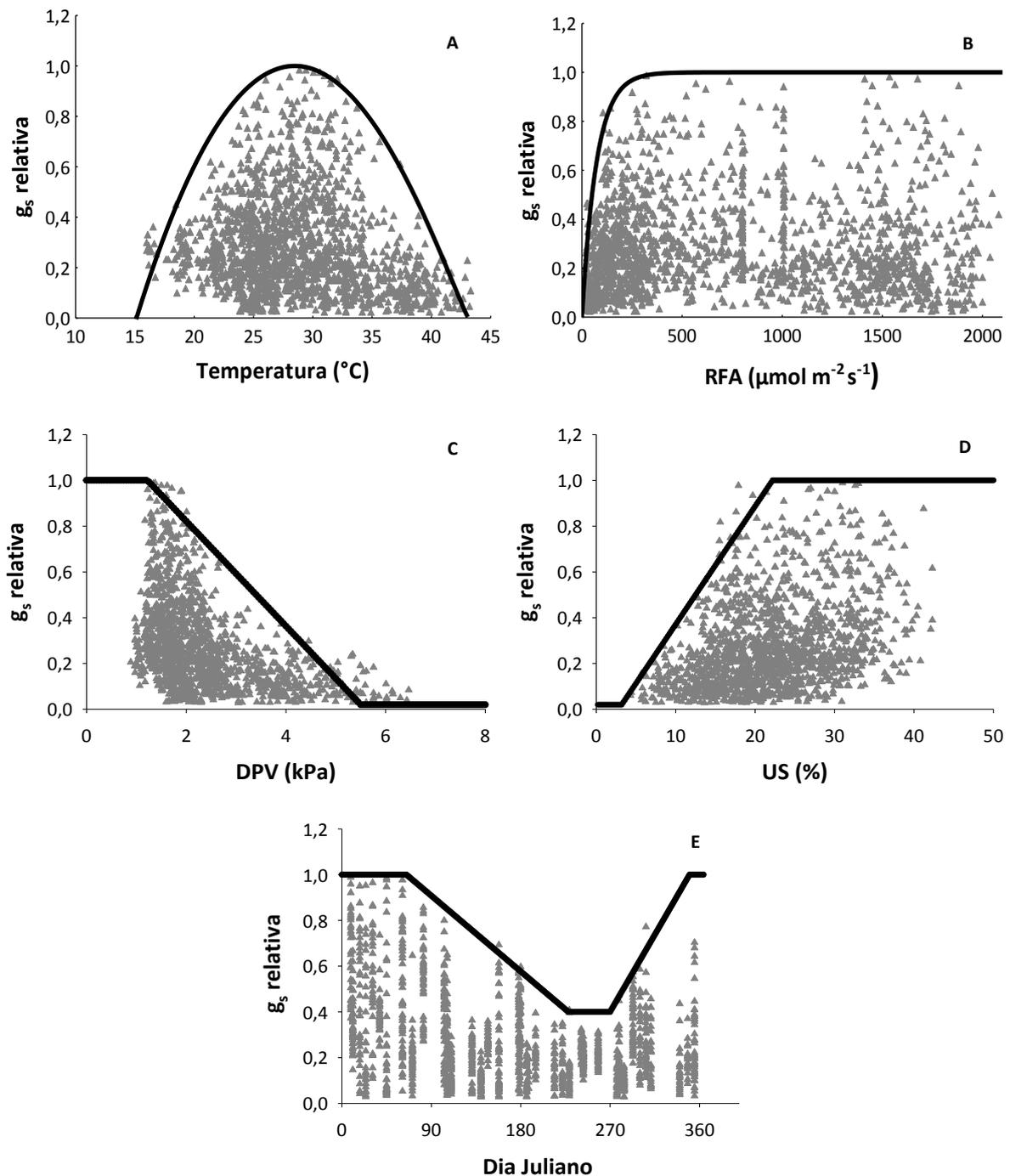


Figura 21. Funções que descrevem a dependência entre a condutância estomática relativa e **A.** temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$), **B.** radiação fotossinteticamente ativa (RFA , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), **C.** déficit de pressão de vapor (DPV , kPa), **D.** umidade do solo (US , %) e **E.** dia juliano em *Psidium guajava* ‘Paluma’.

Tabela 5. Parametrização do modelo de condutância estomática para *Psidium guajava* ‘Paluma’ (siglas descritas nas páginas 24-26).

Função		Parâmetro
g_{\max}		721 (Percentil 98)
f_{\min}		0,026 (Percentil 3)
f_{DA}	* $A_{\text{início}}$	0
	* A_{final}	365
	A	0
	B	0
	C	65 (5 Mar)
	D	228 (16 Ago)
	E	270 (26 Set)
	F	350 (15 Dez)
	f_{DA_a}	1
	f_{DA_b}	1
	f_{DA_c}	0,4
f_{DA_d}	1	
f_{PAR}	α	0,014
f_{temp}	T_{\min}	15
	T_{otm}	28
	T_{\max}	43
f_{VPD}	VPD_{\max}	1,22
	VPD_{\min}	5,5
f_{US}	US_{\max}	22
	US_{\min}	3

* $A_{\text{início}}$ e A_{final} representam os dias em que o período de exposição ao ozônio se inicia e termina, respectivamente, para ‘Paluma’.

A relação entre DPV e g_s relativa foi caracterizada por quatro pontos, sendo descrita por uma função linear (Figura 21C). O valor de déficit de pressão de vapor em

que a condutância é máxima (DPV_{max}) para a cultivar ‘Paluma’ foi de 1,2 kPa, enquanto o valor em que a condutância é mínima (DPV_{min}) foi de 5,5 kPa (Tabela 5).

A relação entre umidade do solo (US) e g_s foi caracterizada por três pontos, sendo descrita por uma função linear (Figura 21D), assim como para o DPV. O valor de umidade do solo, dado em porcentagem de volume, em que a condutância estomática é mínima (US_{min}) para a ‘Paluma’ foi de 3%, enquanto o valor em que a condutância estomática é máxima (US_{max}) foi de 22% (Tabela 5), estabilizando-se com o aumento contínuo da umidade do solo.

A condutância estomática em relação aos dias do ano, seguindo o calendário Juliano, foi descrita por duas funções lineares (Figura 21E). Considerando que no Brasil não existe uma estação de crescimento definida, ocorrendo esta ao longo de todo o ano, foi estabelecido como início e fim do período de exposição ao ozônio ($A_{início}$ e A_{final} , respectivamente) o primeiro ($A_{início} = 0$) e o último dia do ano ($A_{final} = 365$).

As maiores taxas de condutância estomática de ‘Paluma’, inclusive a sua máxima, ocorrem nos primeiros 60 dias do ano, época referente ao verão. Em seguida, inicia-se uma queda deste processo fisiológico (1ª função linear), acentuando-se ainda mais com a entrada do outono e inverno, até se estabilizar próximo ao 230º dia do ano. Após pouco mais de um mês, no 270º dia, já durante a primavera, as taxas de condutância voltam a aumentar, atingindo novamente seu pico pouco antes do fim do ano (350º dia), praticamente no verão e, então, mais um ciclo deste processo se inicia.

A partir da resposta da condutância estomática ao longo do ano, obtiveram-se os valores para os parâmetros f_{DA_a} (1), f_{DA_b} (1), f_{DA_c} (0,4) e f_{DA_d} (1) (Tabela 5).

4.2.2 Condutância estomática modelada

A condutância estomática modelada (g_s modelada) foi calculada após a parametrização da g_s para ‘Paluma’. Sua comparação com a condutância estomática medida possibilitou a avaliação do desempenho e precisão do modelo (Figura 22).

A relação entre a condutância estomática modelada e a condutância estomática medida foi significativa ($P < 0,0001$), apresentando um coeficiente de correlação forte e positivo, com “r” igual a 0,75 (Figura 23). A análise ainda indicou um valor de R^2 igual a 0,56, ou seja, a variação da condutância modelada é explicada em 56% pela variação da condutância medida. O coeficiente angular e o intercepto apresentaram valores iguais a 0,89 e 94, respectivamente. A raiz do quadrado médio do erro (RQME) foi de 116.

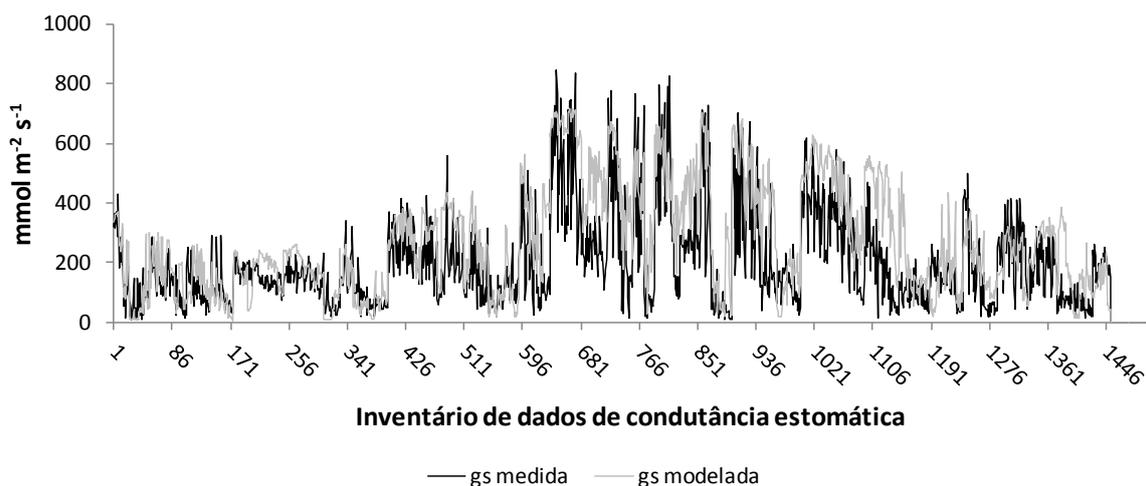


Figura 22. Comparação entre as condutâncias estomáticas (g_s) medida e modelada para *Psidium guajava* ‘Paluma’, obtida com um total de 1578 dados.

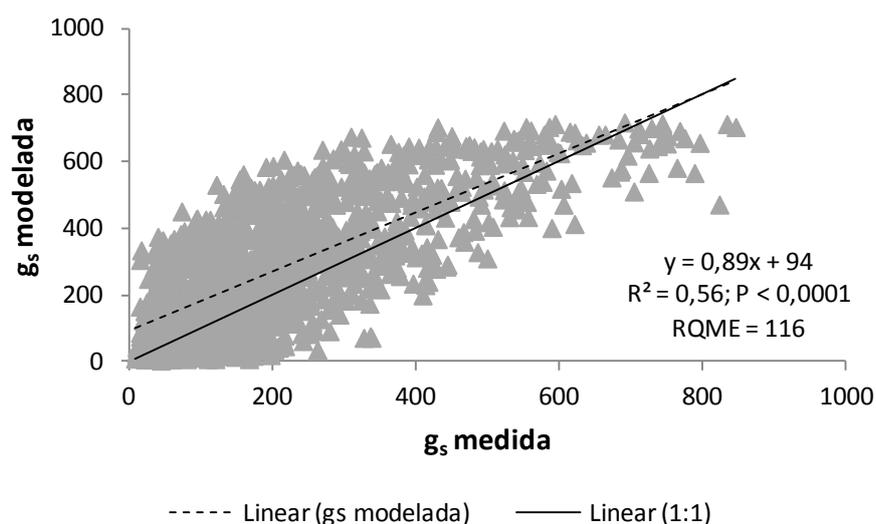


Figura 23. Análise de regressão linear entre as condutâncias estomática (g_s) medida e modelada ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para *Psidium guajava* ‘Paluma’.

4.3 Fluxo estomático de ozônio para ‘Paluma’

4.3.1 Ambiente aberto e não controlado

O fluxo acumulado de ozônio (FAO_3) foi calculado para cada uma das 5 exposições realizadas durante o estudo (Figura 24), seguindo praticamente o mesmo padrão ao encontrado para a EAO40 (Figura 18).

Dentre todas, a 3ª exposição apresentou o maior fluxo acumulado, totalizando uma dose absorvida pela cultivar ‘Paluma’ de 22,2 mmol m⁻², seguida pela 4ª e 2ª exposições, com fluxo total de 18,2 e 14,1 mmol m⁻², respectivamente.

As plantas pertencentes à 3ª exposição apresentaram FAO₃ crescente ao longo dos três meses. O mesmo ocorreu durante a 2ª exposição, embora em menor escala. A 4ª exposição foi marcada por um grande influxo de ozônio através dos estômatos nos primeiros 20 dias, atingindo somente nesse início valores próximos a 10 mmol m⁻². O FAO₃ continuou a aumentar com o decorrer da exposição, diferente do observado em relação a EAO40 (Figura 18), que praticamente se manteve constante no restante da exposição.

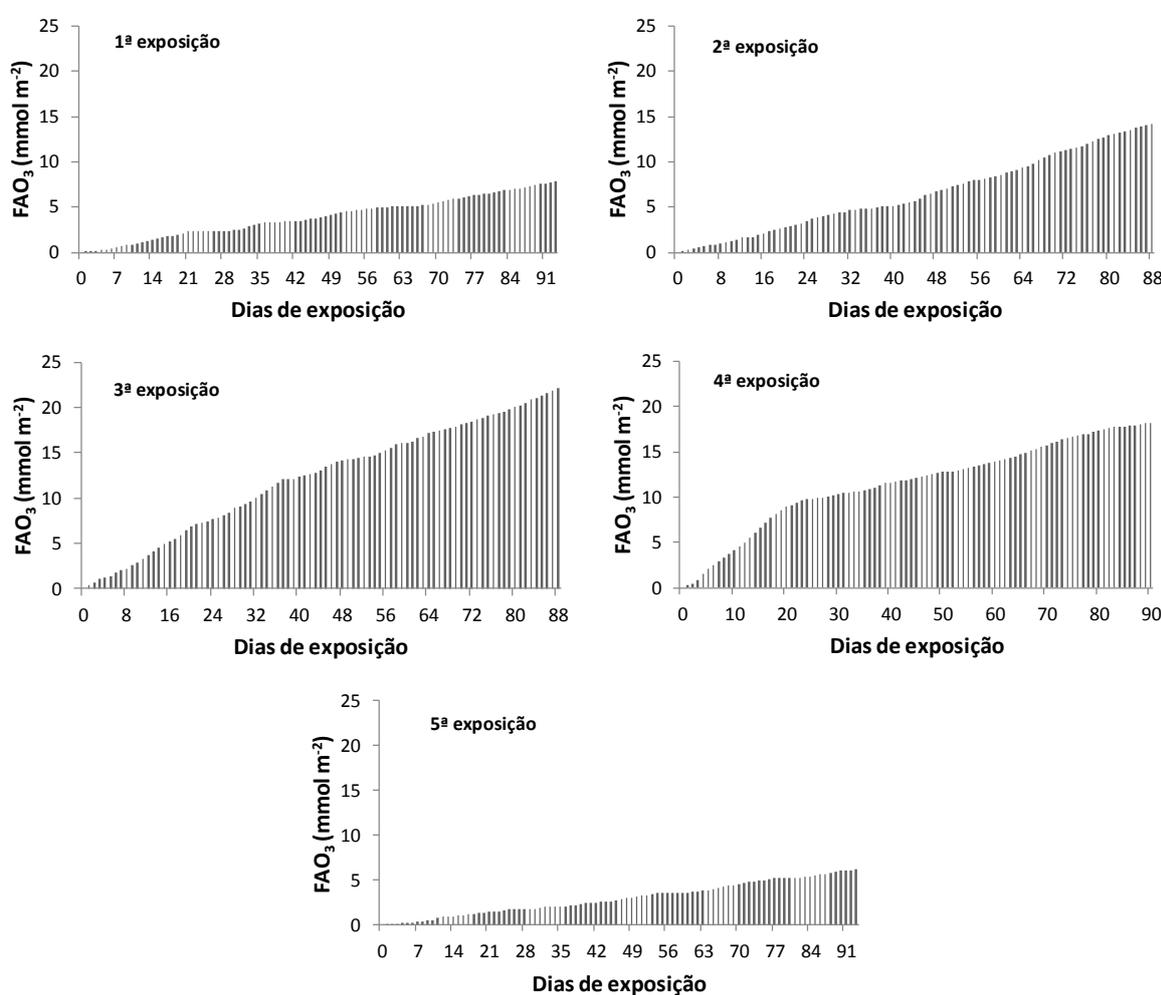


Figura 24. Fluxo acumulado de ozônio (FAO₃), em mmol m⁻², durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013) para mudas de ‘Paluma’ mantidas no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

A 1ª e 5ª exposições registraram os menores valores de FAO_3 , com valores abaixo dos 8 mmol m^{-2} ($7,8$ e $6,2 \text{ mmol m}^{-2}$, respectivamente). Ambas as exposições apresentaram diversos momentos em que a dose de poluente absorvida foi extremamente baixa ou até mesmo nula, principalmente na 5ª exposição.

4.3.2 Ambiente fechado e semi-controlado

O fluxo do poluente para o interior das folhas de ‘Paluma’ foi extremamente baixo, não superando em nenhuma das exposições o valor de 1 mmol m^{-2} (Tabela 6).

Semelhante ao verificado para o ambiente aberto, a 3ª exposição apresentou o maior valor de fluxo acumulado, com $0,48 \text{ mmol m}^{-2}$, seguido das 4ª e 2ª exposições, com fluxo total de $0,45$ e $0,35 \text{ mmol m}^{-2}$, respectivamente.

Tabela 6. Fluxo acumulado de ozônio (FAO_3), em mmol m^{-2} , ao final da 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013) para mudas de ‘Paluma’ mantidas em casa de vegetação situada no PEFI.

Exposição	FAO_3 (mmol m^{-2})
1ª	0,23
2ª	0,35
3ª	0,48
4ª	0,45
5ª	0,19

4.4 Variáveis-resposta

4.4.1 Sintomas foliares visíveis

Os sintomas foliares visíveis induzidos pelo ozônio foram verificados em todas as exposições realizadas em ambiente não controlado, apresentando variação no número

de plantas e de folhas sintomáticas e também na intensidade dos sintomas. Em ambiente fechado e semi-controlado, os mesmos não foram verificados em nenhum momento do estudo.

Os sintomas vistos em *P. guajava* 'Paluma' neste estudo (Figura 25), foram semelhantes aos obtidos em estudos anteriores (Furlan *et al*, 2007; Pina & Moraes, 2007; Rezende & Furlan, 2009; Tresmondi & Alves 2011), descritos em Material e Métodos.

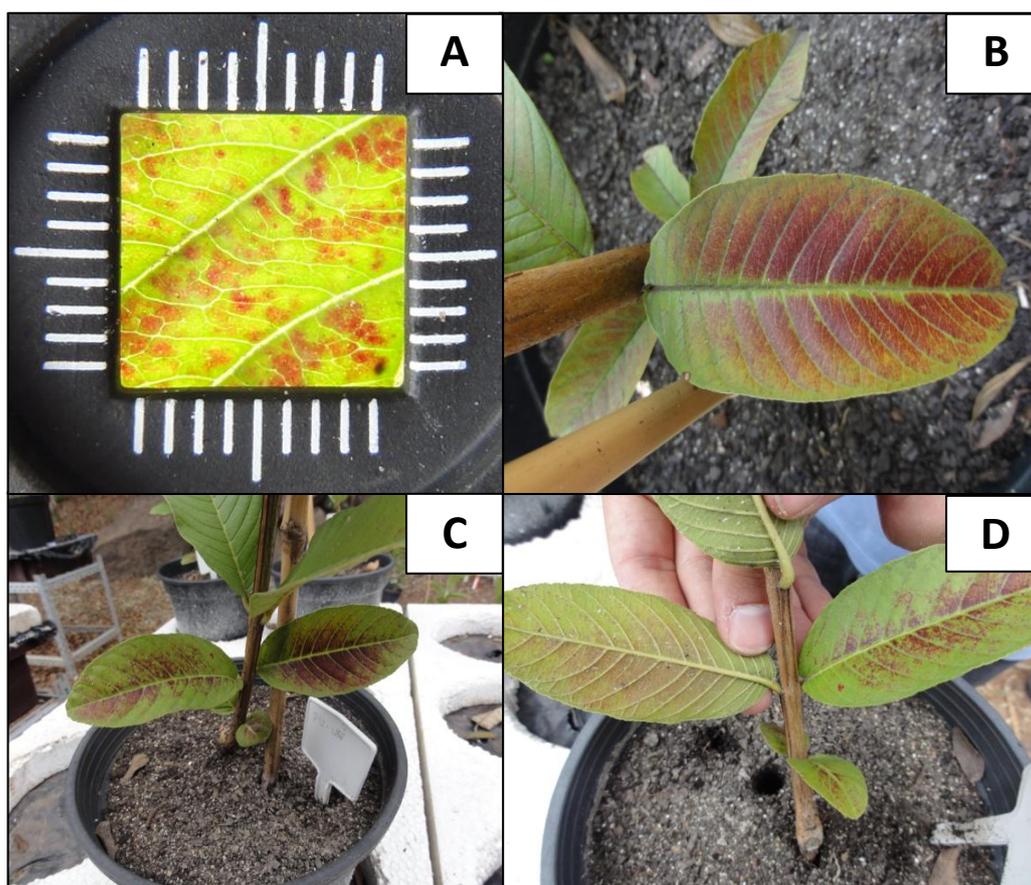


Figura 25. Sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em plantas de *Psidium guajava* 'Paluma'. **A)** Lupa com aumento de 10x mostrando sintomas intervenais na superfície adaxial (lado do quadrado = 2cm) **B)** Superfície adaxial com avermelhamento. **C)** Folhas velhas de 'Paluma' com sintomas. **D)** Superfície abaxial sem avermelhamento.

O índice de incidência apresentou um perfil crescente para a maioria das exposições, salvo as 3ª e 5ª (Figura 26). Na 4ª exposição houve a maior incidência, com quase 100% das mudas de 'Paluma' apresentando algum sintoma foliar ao final da exposição. Vale ressaltar o aumento expressivo entre o 60º dia ao 70º. A segunda maior

incidência ocorreu na 2ª exposição, com 80% das plantas com sintomas. A 1ª e 5ª exposições tiveram aproximadamente 60% das mudas de ‘Paluma’ expressando sintomas, enquanto na 3ª exposição cerca de 30% dos indivíduos apresentaram sintomas. Além disso, indivíduos de ‘Paluma’ expostos nesse mesmo período foram os que mais tempo demoraram para expressar sintomas induzidos por ozônio, o contrário do acontecido nas 2ª e 5ª exposições, quando na primeira quinzena já havia mudas com a presença dos mesmos.

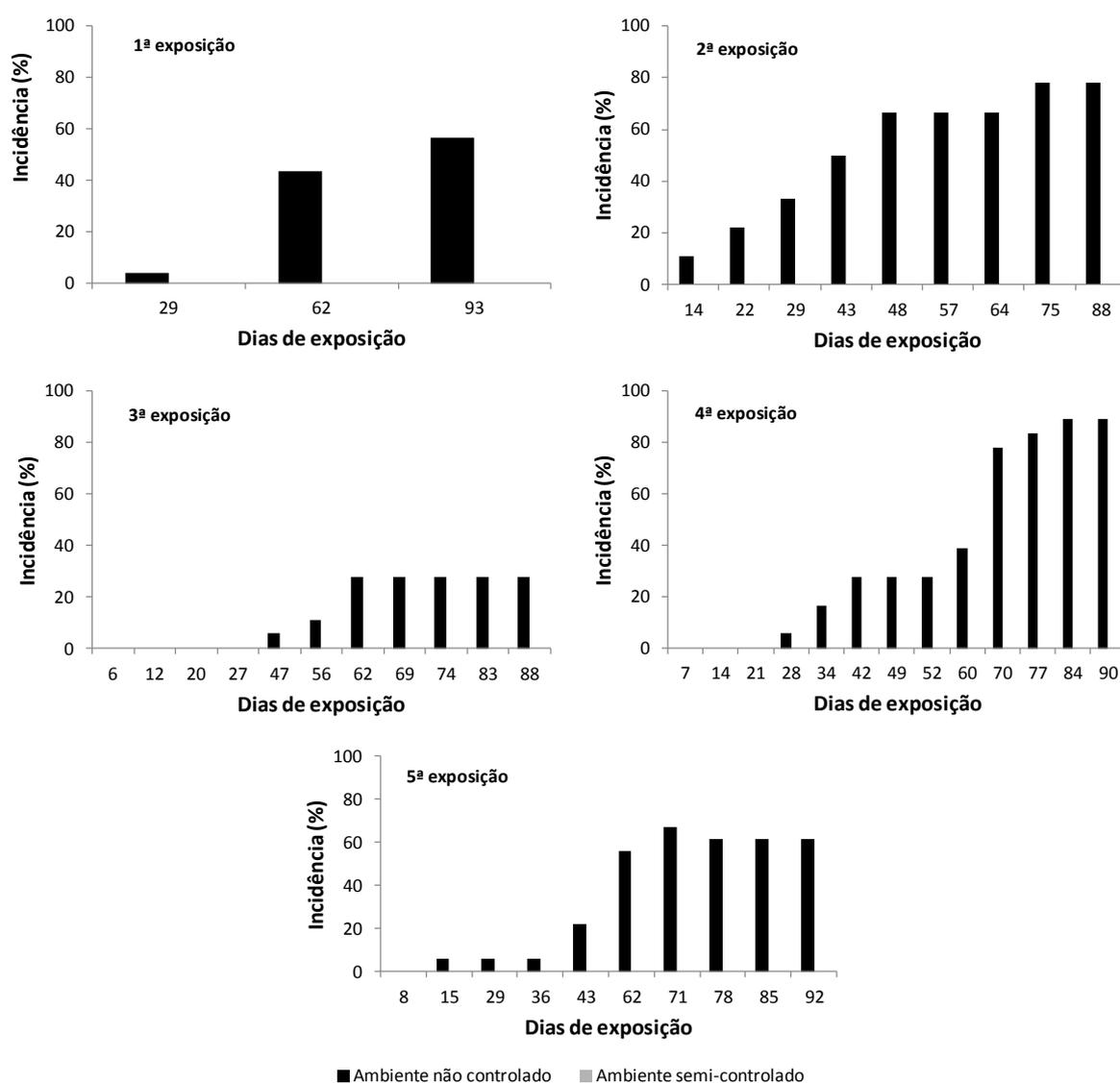


Figura 26. Índice de Incidência (%) em plantas de *Psidium guajava* ‘Paluma’ expostas em ambiente não controlado e semi-controlado, durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013).

O índice de severidade apresentou praticamente o mesmo perfil do índice de incidência (Figura 27). Alcançou 8% no final das 2ª, 4ª e 5ª exposições e 4% nas demais.

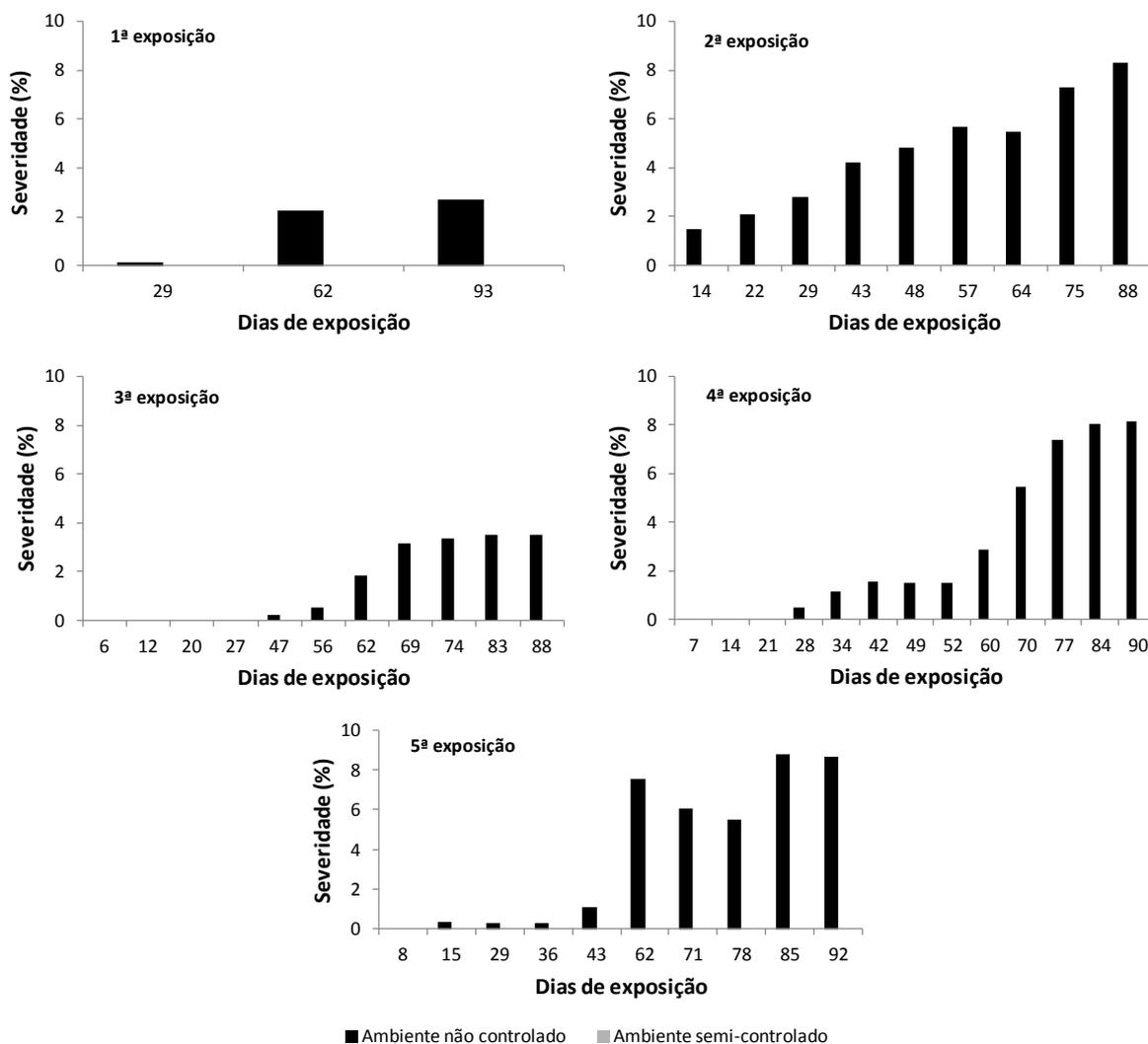


Figura 27. Índice de severidade (%) em plantas de *Psidium guajava* ‘Paluma’ expostas em ambiente não controlado e semi-controlado, durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013).

O índice de injúria foliar (IIF), assim como os índices anteriores, também apresentou o mesmo perfil ao longo das exposições (Figura 28). As plantas expostas durante a 4ª e a 2ª exposições apresentaram IIF mais altos, pouco superior a 2%. Na 5ª exposição o valor de IIF foi próximo a 2% e na 1ª e 3ª exposições houve o menor IIF, que não atingiu o valor de 1%.

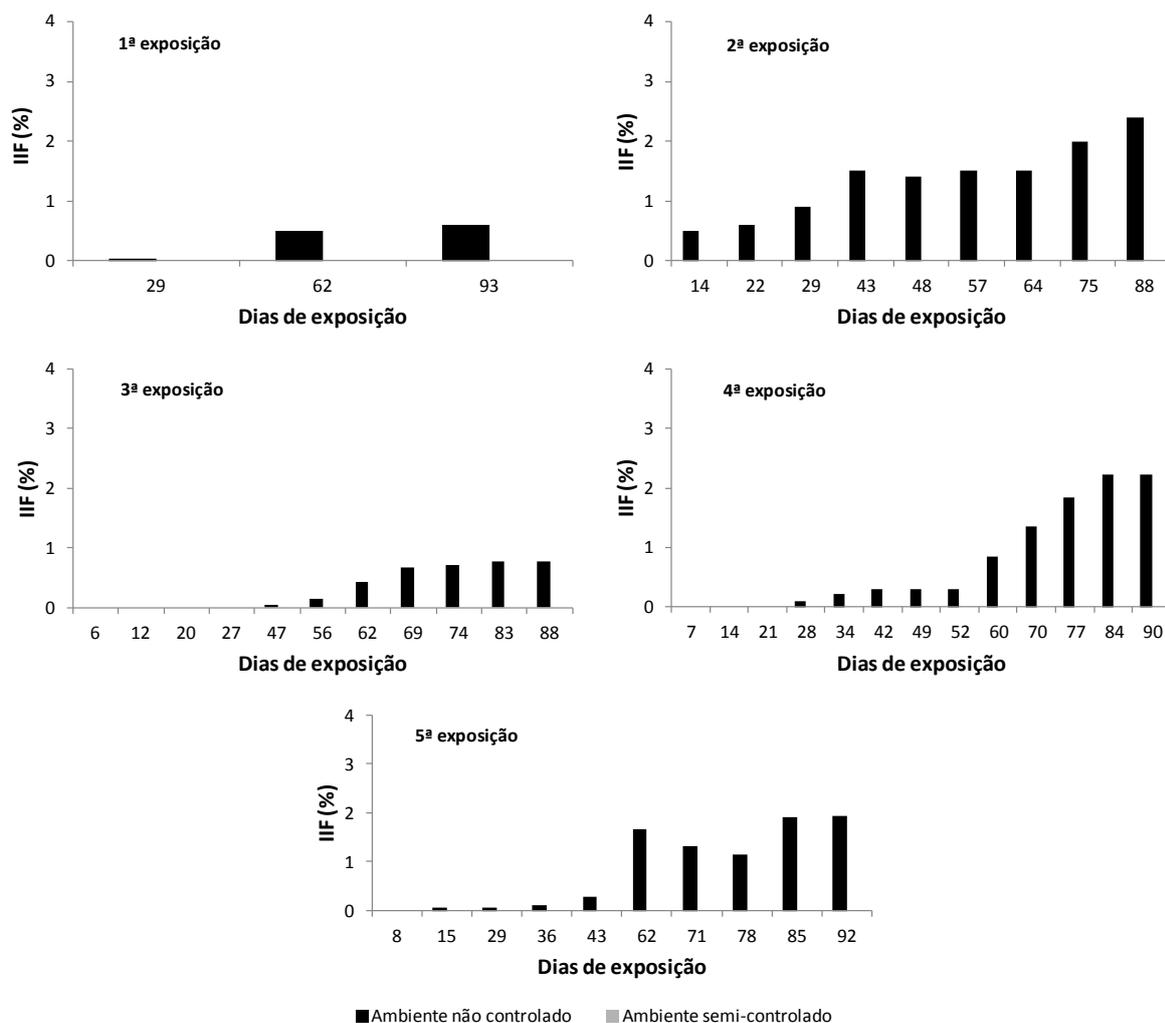


Figura 28. Índice de injúria foliar (IIF, em %) em plantas de *Psidium guajava* ‘Paluma’ expostas em ambiente não controlado e semi-controlado, durante 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013).

O número de folhas de ‘Paluma’ em cada classe de sintomas encontra-se na Figura 29. Os indivíduos expostos na 2ª e na 4ª exposições tiveram suas folhas cobertas por uma maior área de sintomas, respectivamente. Na 2ª exposição, as mesmas foram verificadas na primeira quinzena, com sintomas foliares classificados na 2ª (6% a 25%) e na 3ª (26% a 50%) classes, algo que na 4ª exposição só ocorreu após 60 dias do início. Observou-se também que um número superior a 40 folhas foram sintomáticas em ambas as exposições. Nas três exposições restantes, a maioria dos sintomas verificados restringiu-se à primeira classe (1% a 5%).

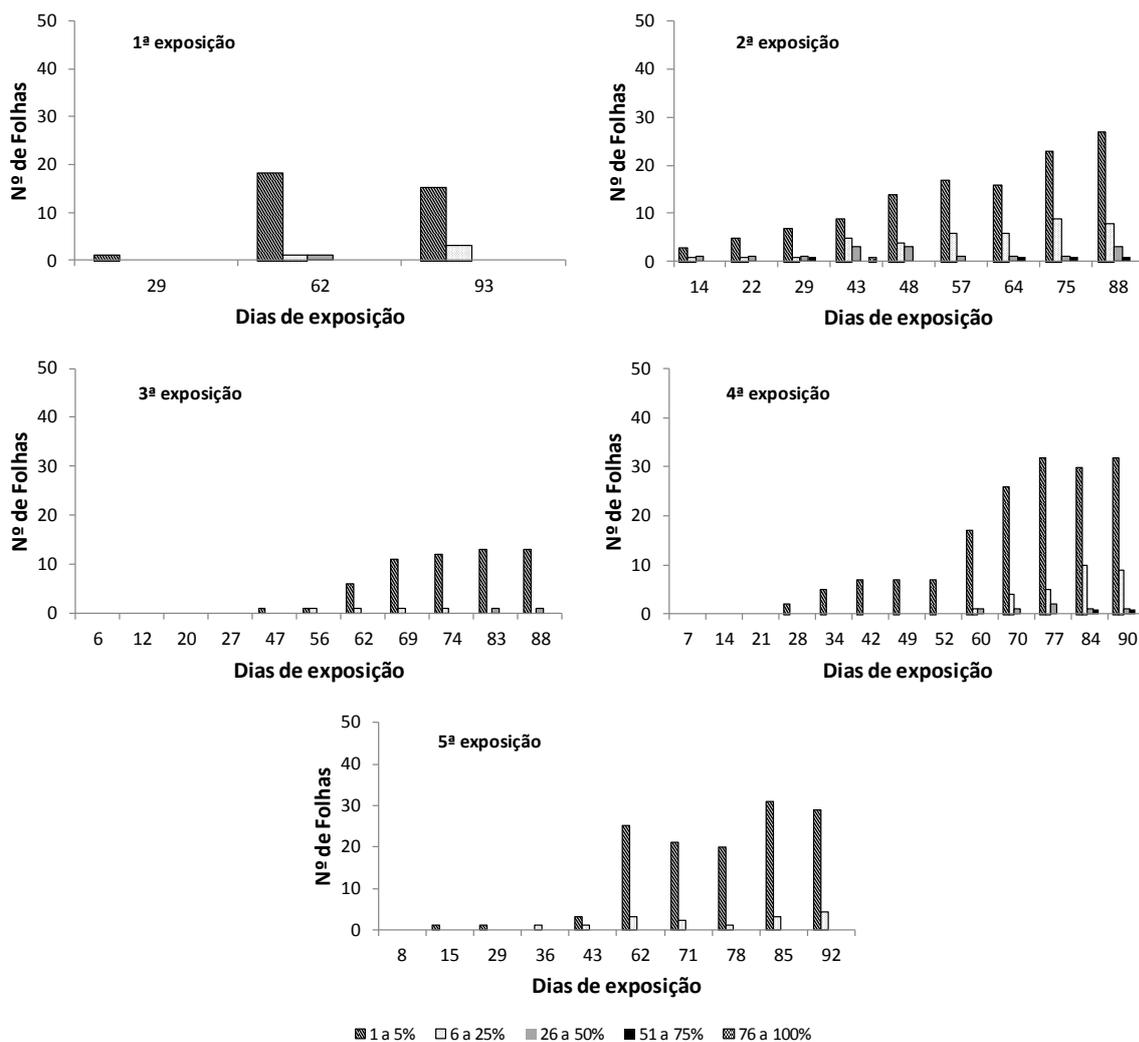


Figura 29. Número de folhas sintomáticas distribuídas em classes de porcentagem de sintomas foliares (classe 1: 1 a 5%; classe 2: 6 a 25%; classe 3: 26% a 50%; classe 4: 51 a 75% e classe 5: 76 a 100%) durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013).

4.4.2 Crescimento em altura, diâmetro, número de folhas e massa seca

A análise estatística descritiva da taxa de crescimento relativo (TCR) em altura, diâmetro caulinar e número de folhas apontou uma alta variabilidade nos resultados, tanto entre os tratamentos como para um mesmo tratamento em diferentes períodos de exposição.

A TCR em altura das plantas foi mais alta para indivíduos mantidos em ambiente semi-controlado na maioria das vezes, quando houve diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,01$ e $P < 0,001$) (Figura 30). Com relação aos meses de

exposição, os primeiros 30 dias foram significativamente mais favoráveis ao crescimento em altura para ambos os tratamentos em todas as exposições ($P < 0,01$ e $P < 0,001$), exceto para a 3ª exposição. Seguindo a análise dos gráficos como um todo, a TCR em altura teve um perfil decrescente (30 dias > 60 dias > 90 dias) ao longo de todo o estudo.

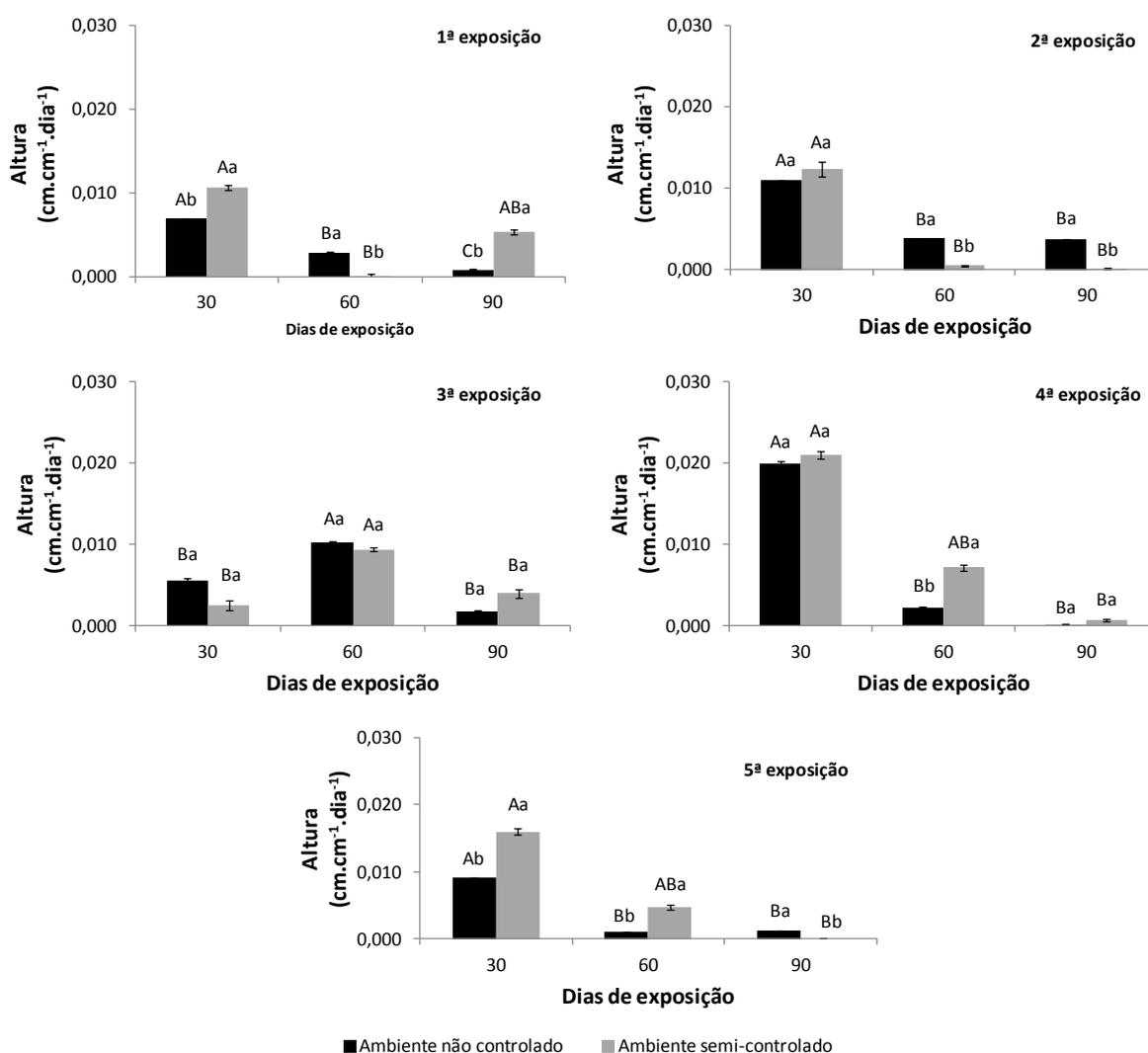


Figura 30. Medianas de taxa de crescimento relativo em altura de plantas jovens de *Psidium guajava* “Paluma” expostas em ambiente não controlado e semi-controlado, durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas para o mesmo ambiente em dias de exposição distintos; letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os ambientes para um mesmo dia de exposição.

A TCR de diâmetro caulinar não diferiu entre os dois ambientes. Além disso, não foi possível definir um perfil de TCR para este parâmetro ao longo do tempo de

exposição. Houve diferença estatística ($P < 0,001$) entre os meses de exposição para plantas expostas em ambiente não controlado, exceto para a 3ª exposição. Geralmente, o primeiro mês apresentou as maiores taxas (Figura 31), seguido do segundo e terceiro meses, respectivamente. Já em ambiente semi-controlado, isto só ocorreu durante a 4ª exposição ($P < 0,001$), uma vez não houve diferença estatística ($P > 0,1$) entre os meses nas demais exposições.

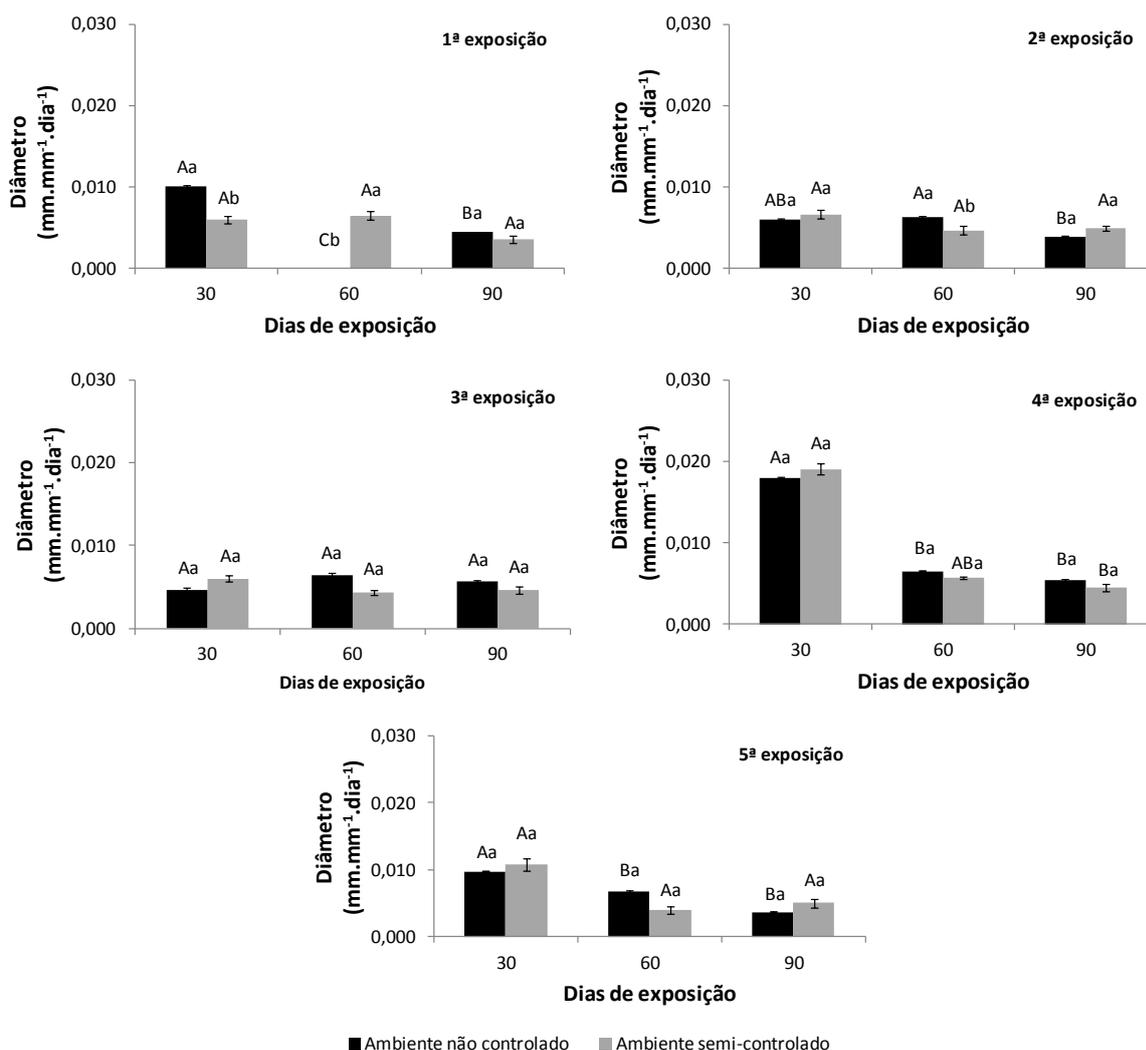


Figura 31. Medianas de taxa de crescimento relativo em diâmetro caulinar de plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostas em ambiente não controlado e semi-controlado, durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas para o mesmo ambiente em dias de exposição distintos; letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os ambientes para um mesmo dia de exposição.

A TCR em número de folhas apresentou um perfil decrescente, principalmente na 4ª e na 5ª exposições (Figura 32). Novamente, os valores de TCR foram maiores nos primeiros 30 dias, tanto em ambiente não controlado como semi-controlado, exceto para a 3ª exposição. Houve diferenças significativas entre os meses ($P < 0,01$ e $P < 0,001$). Entretanto, não houve uma tendência nítida em relação a qual ambiente foi mais favorável para o crescimento em diâmetro, pois em alguns momentos a TCR foi maior em ambiente não controlado e em outros maior no semi-controlado.

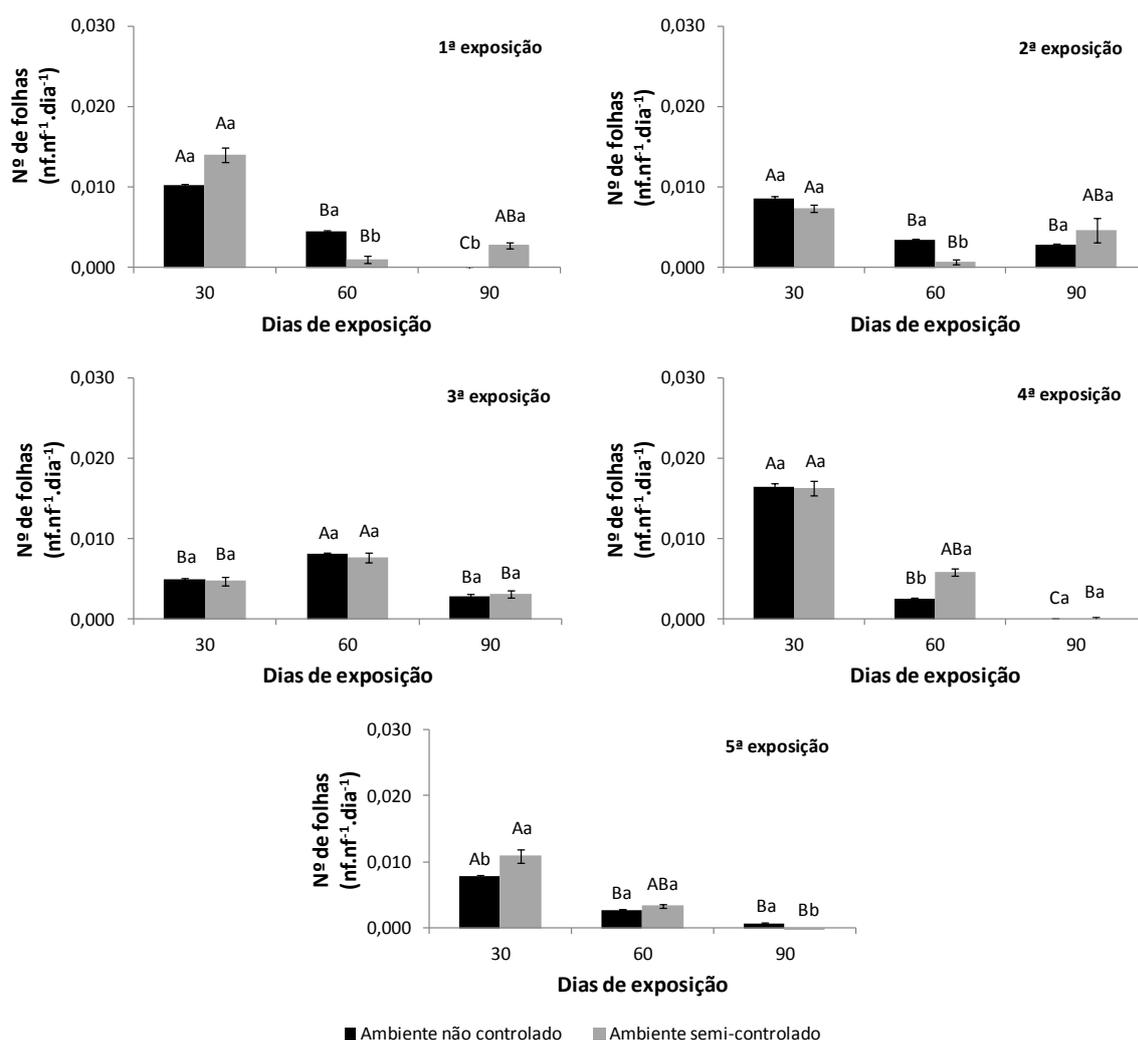


Figura 32. Medianas de taxa de crescimento relativo em número de folhas de plantas jovens de *Psidium guajava* ‘Paluma’ expostas em ambiente não controlado e semi-controlado, durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas para o mesmo ambiente em dias de exposição distintos; letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os ambientes para um mesmo dia de exposição.

A TCR trimestral para altura, diâmetro caulinar e número de folhas possibilitou verificar que a 4ª exposição foi a mais favorável para o crescimento das plantas como um todo, tanto no ambiente não controlado como no semi-controlado (Figura 33).

Ao comparar os tratamentos, verificou-se que o diâmetro e o número de folhas não apresentaram diferenças estatísticas ($P > 0,1$). Já para altura da planta, essa diferença só não foi observada ao término da 3ª e 4ª exposições, com indivíduos presentes em ambiente semi-controlado demonstrando taxas maiores em relação às expostas em ambiente não controlado para a 1ª e a 5ª exposições.

As taxas de crescimento relativo em massa seca de folhas, caule, raiz, parte aérea e massa seca total não diferiram significativamente entre os ambientes na maioria das exposições (Figura 34), exceto na 1ª, quando foram menores no ambiente não controlado ($P < 0,01$ e $P < 0,001$). Além disso, na 4ª exposição também foi verificada diferença estatística na TCR de massa seca de folhas das plantas expostas nos dois ambientes.

Ainda em relação à 4ª exposição, assim como para as TCR em altura, diâmetro e número de folhas, neste período também foram verificados valores significativamente maiores ($P < 0,001$ e $P < 0,01$) de TCR em massa seca para ambos os ambientes, indicando novamente que esta exposição foi a mais favorável para o crescimento vegetal (Figura 34). O período menos favorável para plantas mantidas em ambiente não controlado foi a 1ª exposição, enquanto que para espécimes de 'Paluma' mantidas em ambiente semi-controlado os períodos menos favoráveis foram as 1ª, 2ª e 3ª exposições, alternando-se entre os parâmetros,

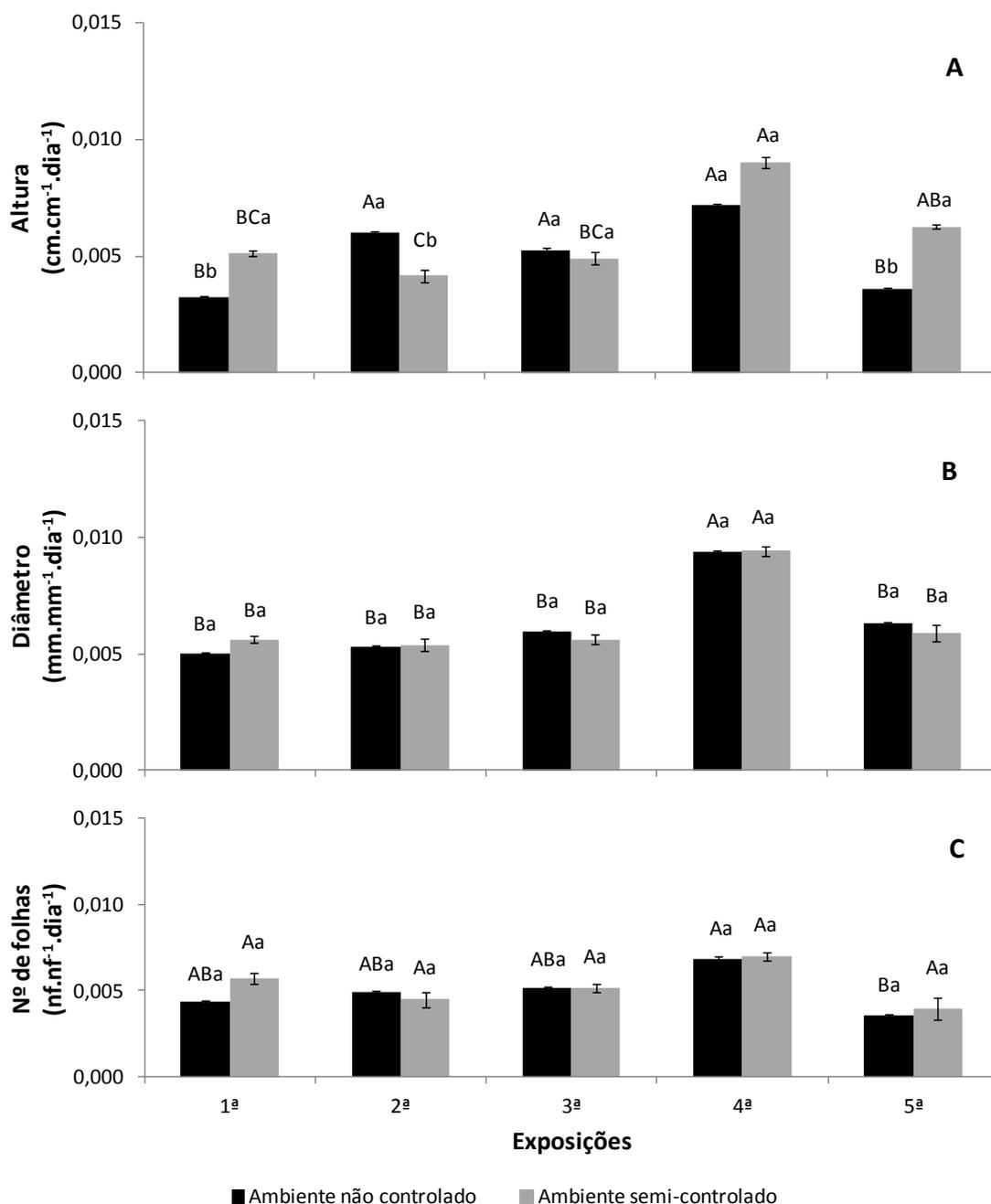


Figura 33. Medianas de taxa de crescimento relativo trimestral em **A)** altura e médias de taxa de crescimento relativo trimestral em **B)** diâmetro caulinar e **C)** número de folhas; de plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostas em ambiente não controlado e semi-controlado, durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas para o mesmo ambiente entre as exposições; letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os ambientes para uma mesma exposição.

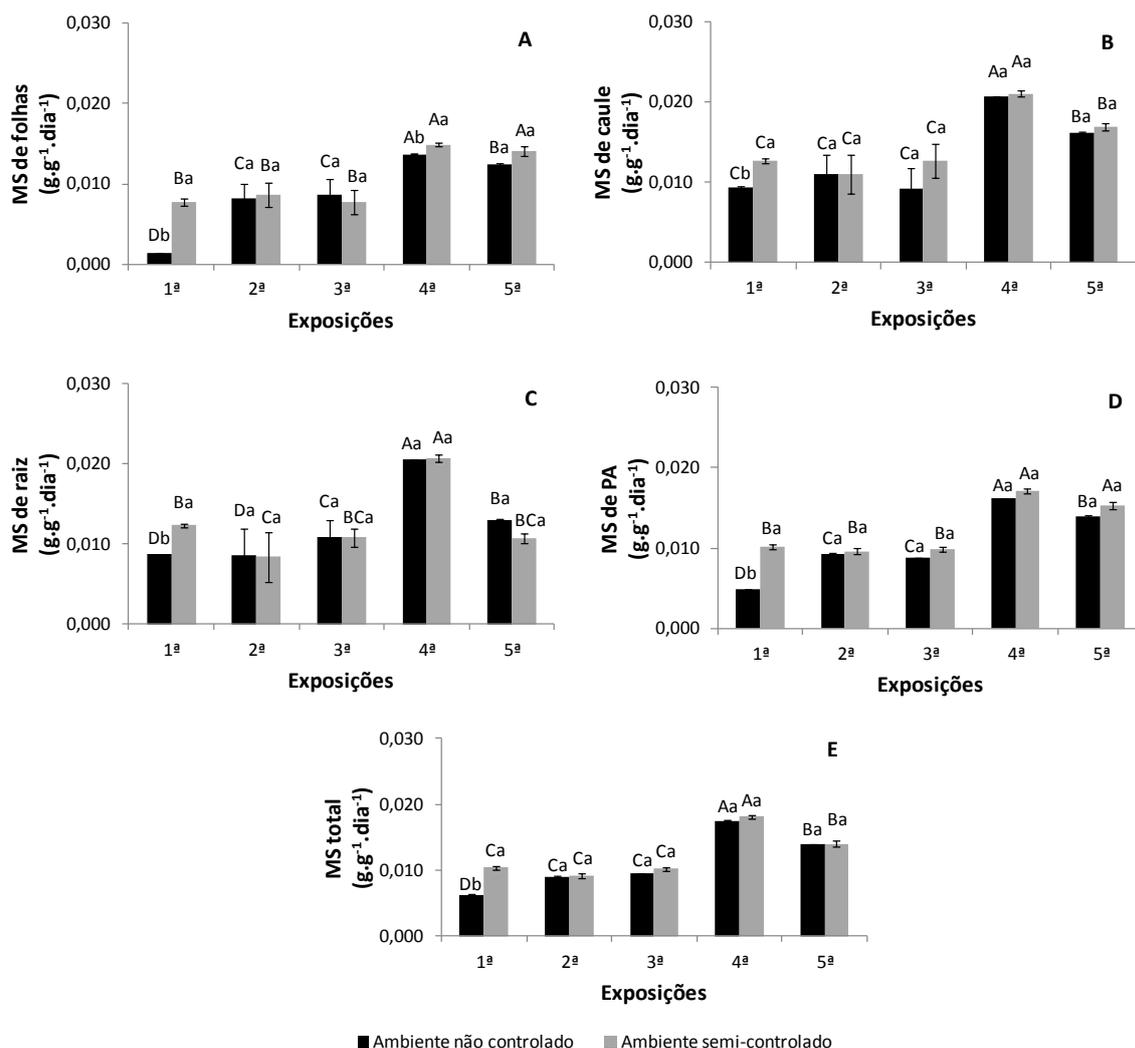


Figura 34. Médias de taxa de crescimento relativo trimestral em massa seca (MS) de **A)** folhas; **B)** caule; **C)** raiz; **D)** parte aérea (PA) e **E)** total de plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostas em ambiente não controlado e semi-controlado, durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas para o mesmo ambiente entre as exposições; letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os ambientes para uma mesma exposição.

Apesar dos resultados indicarem um período mais favorável para o crescimento ao longo da 4ª exposição, a Figura 35 indica que a maior massa seca total final ocorreu na 1ª exposição, tanto para ambiente não controlado quanto para semi-controlado, com mudas de 'Paluma' deste último apresentando maior massa. Nas demais exposições não houve diferença estatística da massa seca de 'Paluma' entre os ambientes. Na 3ª exposição houve o menor acúmulo de biomassa total.

A razão raiz/parte aérea comprovou o maior incremento em parte aérea (folhas, caules e ramos) em todas as exposições, com indivíduos da 4ª exposição, para ambos ambientes, e da 5ª exposição, para ambiente não controlado, obtendo massa seca de parte aérea significativamente maior ($P < 0,001$).

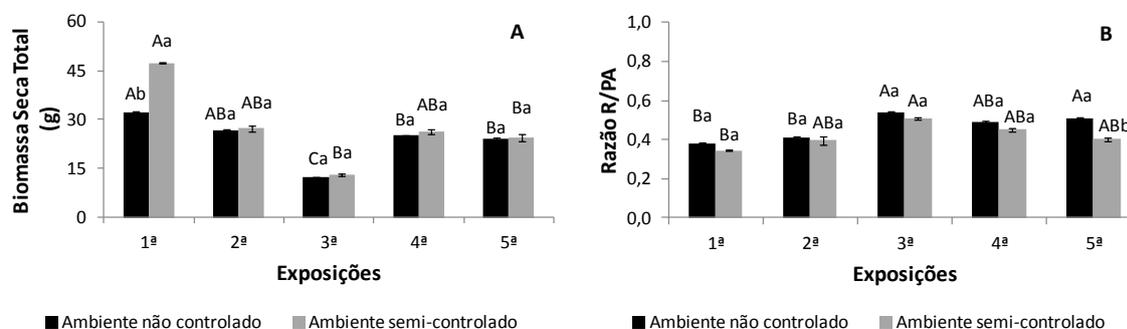


Figura 35. Medianas de A) massa seca total (g) e B) razão raiz/parte aérea de plantas jovens de *Psidium guajava* ‘Paluma’ expostas em ambiente não controlado e semi-controlado, durante a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas para o mesmo ambiente entre as exposições; letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os ambientes para uma mesma exposição.

4.5 Análise de regressão e comparação entre o modelo de fluxo estomático e a EAO40

4.5.1 Ambiente aberto e não controlado

As análises de regressão linear entre as variáveis-explicativas e índices baseados nos sintomas foliares induzidos pelo O_3 para cada uma das exposições realizadas estão representadas pelas Figuras 36 a 38. Essa análise não foi realizada para a primeira exposição porque havia poucos dados de sintomas foliares.

A variação no fluxo acumulado de ozônio (FAO_3) explicou a variação na incidência de sintomas foliares melhor do que a EAO40, principalmente nas 3ª, 4ª e 5ª exposições (Figura 36). O coeficiente de determinação (R^2) para estas exposições foi sempre superior ($R^2 = 0,82$; $0,83$ e $0,90$, respectivamente) aos obtidos com a EAO40 ($R^2 = 0,68$; $0,56$ e $0,70$, respectivamente). Ainda em relação ao índice de incidência, o FAO_3 só não explicou melhor a variação no surgimento de sintomas foliares na 2ª

exposição, quando o R^2 da regressão com a EAO40 foi mais alto, com valor igual a 0,97.

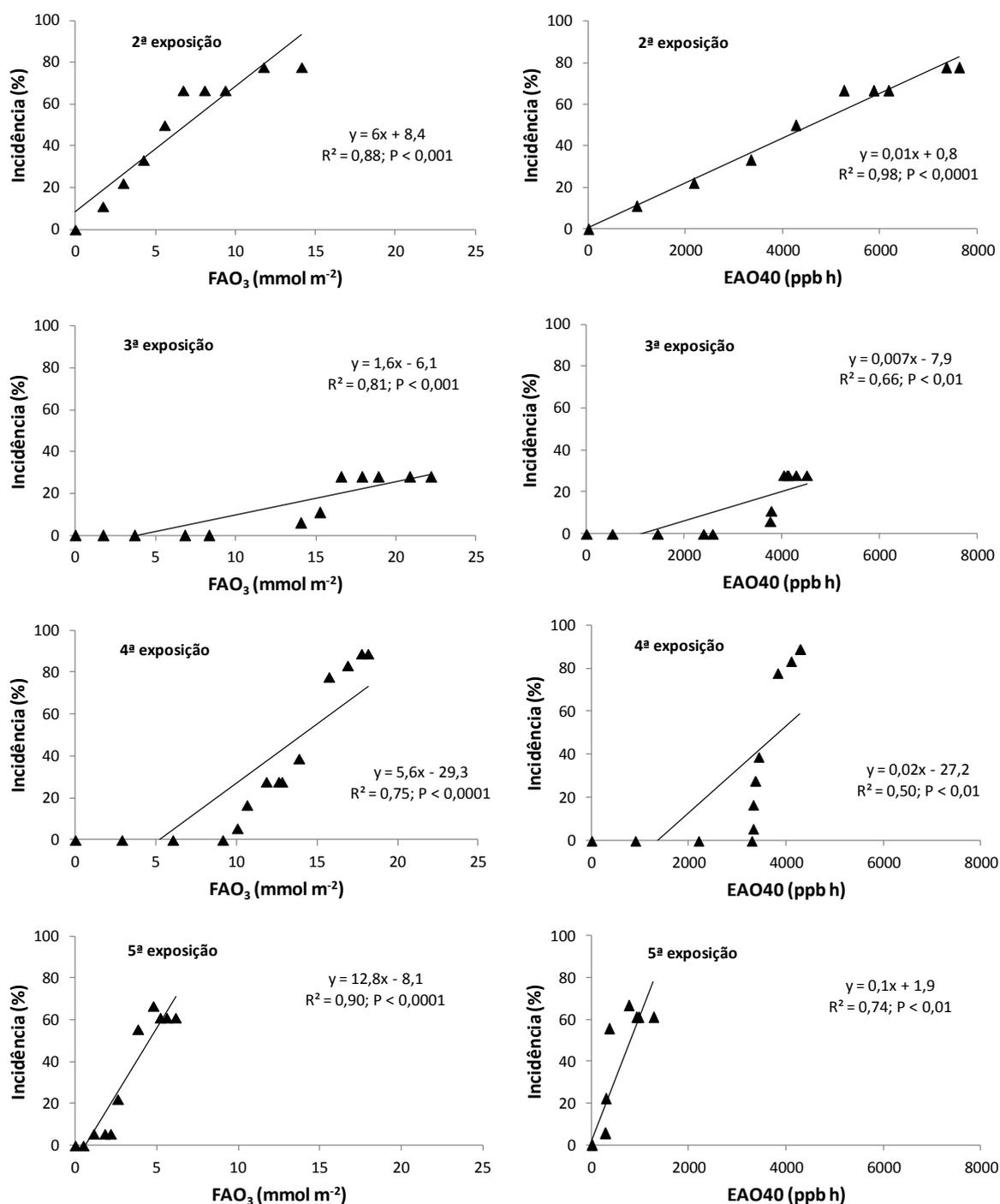


Figura 36. Análise de regressão linear entre as variáveis-explicativas (fluxo acumulado de ozônio (FAO₃) e EAO40) e o índice de incidência para 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013).

O índice de severidade também apresentou uma melhor associação com o FAO₃. Os valores de R² foram sempre mais altos do que os obtidos com EAO40 (Figura 37), principalmente nas três últimas exposições (FAO₃: R² = 0,75, 0,77 e 0,86, respectivamente; EAO40: R² = 0,56, 0,53, 0,70, respectivamente). Verificou-se também um nível de significância mais alto (P < 0,001) com o fluxo de O₃ acumulado para as três últimas exposições realizadas. A relação também foi significativa com a EAO40, porém o nível de significância foi mais baixo (P < 0,01). Nas duas primeiras exposições, a relação entre as variáveis não foi significativa.

O índice de injúria foliar (IIF) seguiu o mesmo padrão dos índices anteriores, com FAO₃ apresentando maior explicabilidade de sua variação do que a EAO40 (Figura 38). O valor de R² obtido entre IIF e FAO₃ variou de 0,75 a 0,93 (P < 0,001 e P < 0,0001, exceto na 1ª exposição). Com a EAO40, o R² foi mais baixo em todas as exposições, variando entre 0,50 e 0,92. Além disso, a relação foi estatisticamente significativa, porém com menor nível de significância (P < 0,01), exceto para a 2ª exposição quando os valores de R² e P foram semelhantes.

O FAO₃ apresentou maior explicabilidade do índice de injúria foliar nas três últimas exposições realizadas (3ª, 4ª e 5ª), com R² superior a 0,74. A EAO40, por sua vez, explicou no máximo em 69% (5ª exposição) da variação dos sintomas.

A análise de regressão linear com todo o conjunto de dados obtidos ao longo do estudo entre as mesmas variáveis-explicativas e os índices de IIF, incidência e severidade também foi realizada (Figura 39).

Apesar de apresentarem um R² baixo, o IIF, os índices de incidência e de severidade foram melhores explicados pela EAO40 (R² = 0,24; 0,22 e 0,17, respectivamente). Além disso, as relações com o FAO₃ apresentaram um valor de P < 0,1, considerado não significativo.

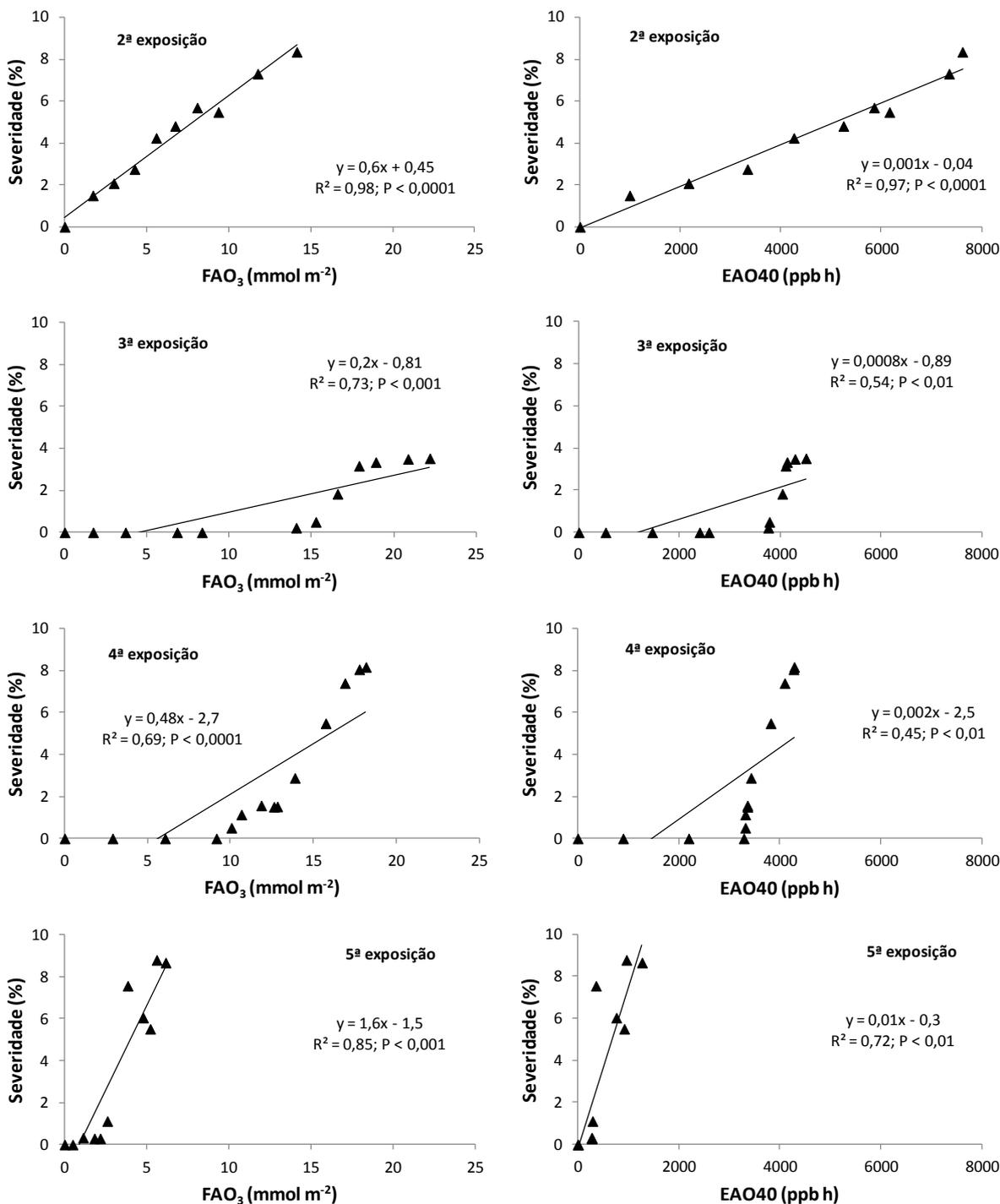


Figura 37. Análise de regressão linear entre as variáveis-explicativas (fluxo acumulado de ozônio (FAO₃) e EAO40) e o índice de severidade para a 1ª exposição (15/05 a 15/08/2012), 2ª exposição (23/08 a 19/11/2012), 3ª exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4ª exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5ª exposição (29/05 a 29/08/2013).

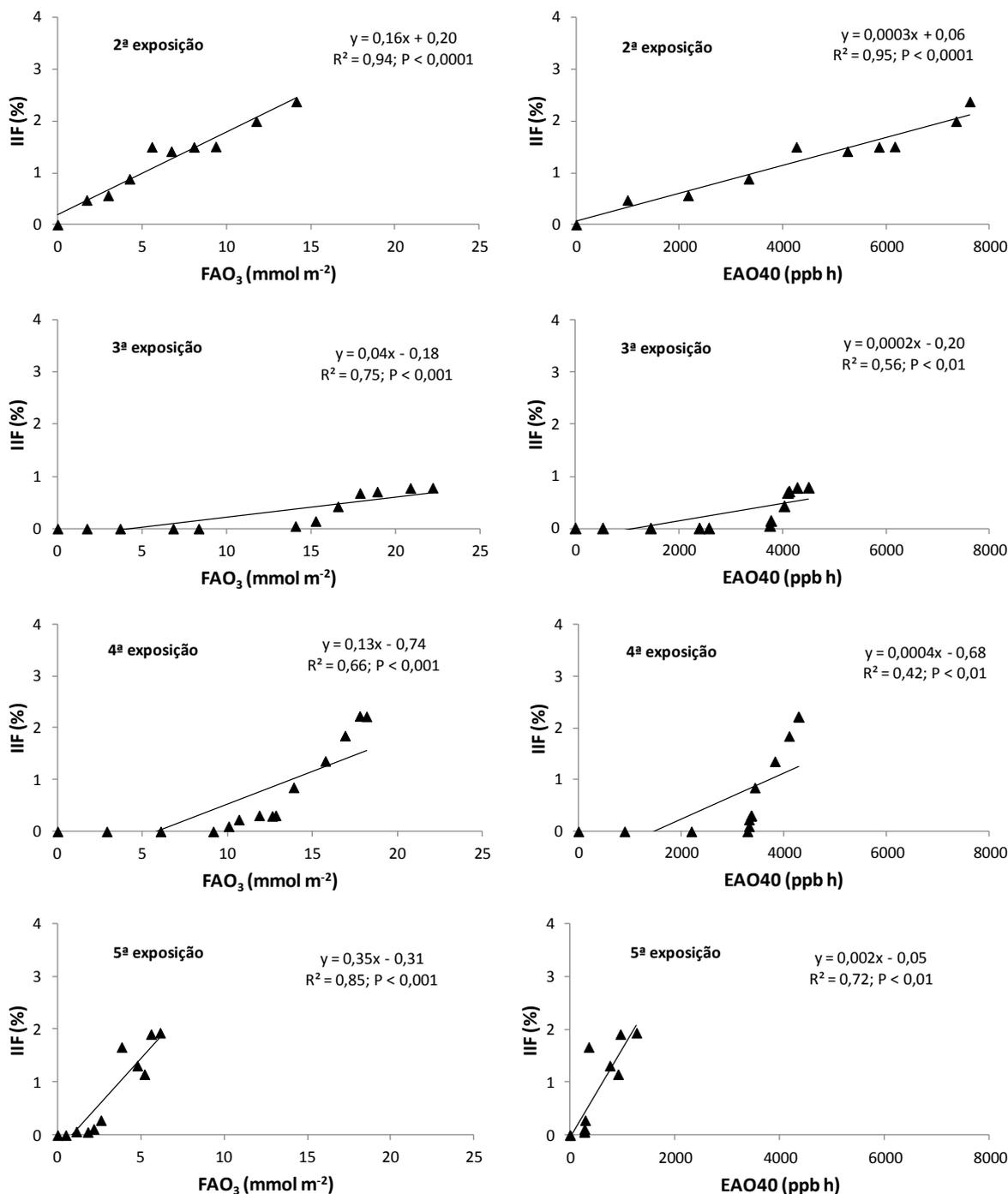


Figura 38. Análise de regressão linear entre as variáveis-explicativas (fluxo acumulado de ozônio (FAO₃) e EAO40) e o índice de injúria foliar (IIF) para 1^a exposição (15/05 a 15/08/2012), 2^a exposição (23/08 a 19/11/2012), 3^a exposição (23/11/2012 a 19/02/2013), 4^a exposição (23/02 a 23/05/2013) e 5^a exposição (29/05 a 29/08/2013).

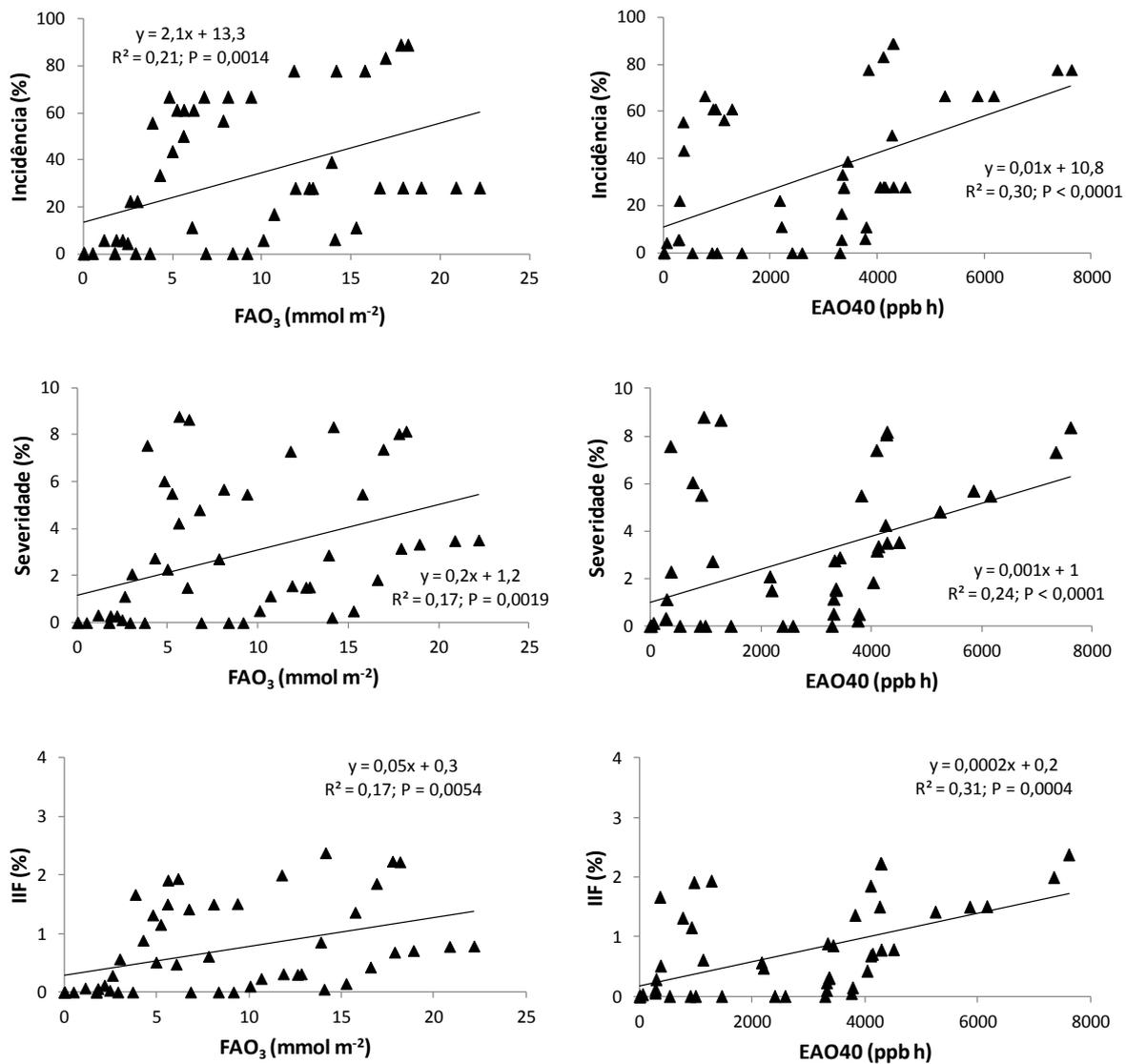


Figura 39. Análise de regressão linear entre as variáveis-explicativas (fluxo acumulado de ozônio (FAO_3) e EAO40) e os índices de incidência, de severidade e de injúria foliar com todos os dados obtidos durante o estudo.

A análise de regressão linear entre FAO_3 e EAO40 com a TCR de altura, diâmetro caulinar e número de folhas foi realizada com dados obtidos ao longo de todo o período de estudo, mas não foram significativas (Tabela 7).

Tabela 7. Equação da reta, coeficiente de determinação (R^2) e nível de significância (P) determinados pela análise de regressão linear entre as variáveis-explicativas (fluxo acumulado de ozônio (FAO₃) e EAO40) e as taxas de crescimento relativo de altura, diâmetro e número de folha

TCR	FAO ₃			EAO40		
	Equação da reta	R ²	P	Equação da reta	R ²	P
Altura	$y = -0,0002x + 0,007$	0,04	0,494 ^{ns}	$y = 5e-08x + 0,0052$	0,001	0,939 ^{ns}
Diâmetro	$y = -6e-05x + 0,0071$	0,01	0,758 ^{ns}	$y = -7e-08x + 0,0067$	0,001	0,894 ^{ns}
Nº de folhas	$y = -0,0002x + 0,007$	0,08	0,313 ^{ns}	$y = -2e-07x + 0,0057$	0,02	0,667 ^{ns}

ns = não significativo (P < 0,1 e P > 0,1)

As relações entre o FAO₃ e EAO40 com a TCR de massa seca de folha, caule, parte aérea, raiz e total, além da massa seca total e razão raiz/parte aérea, foram realizadas utilizando dados de todas as exposições, uma vez que para cada exposição era obtido apenas um valor para cada parâmetro.

As relações entre FAO₃ e EAO40 com a TCR de massa seca de folha, caule, parte aérea, raiz e total também não foram significativas (Tabela 8), assim como com a razão raiz/parte aérea e a massa seca total (Tabela 9).

Tabela 8. Equação da reta, coeficiente de determinação (R^2) e nível de significância (P) determinados pela análise de regressão linear entre as variáveis-explicativas (fluxo acumulado de ozônio (FAO₃) e EAO40) e as taxas de crescimento relativo (TCR) em massa seca (MS) de folhas, caule, parte aérea (PA), raiz e total

TCR	FAO ₃			EAO40		
	Equação da reta	R ²	P	Equação da reta	R ²	P
MS folhas	$y = 0,0002x + 0,0061$	0,08	0,647 ^{ns}	$y = 4e-07x + 0,0074$	0,05	0,732 ^{ns}
MS caule	$y = -4e-06x + 0,0134$	2e-05	0,994 ^{ns}	$y = -2e-07x + 0,0139$	0,01	0,893 ^{ns}
MS PA	$y = 1e-04x + 0,0092$	0,02	0,813 ^{ns}	$y = 1e-07x + 0,0101$	0,01	0,909 ^{ns}
MS raiz	$y = 0,0002x + 0,0095$	0,08	0,639 ^{ns}	$y = -1e-07x + 0,0128$	0,001	0,918 ^{ns}
MS total	$y = 0,0001x + 0,0096$	0,03	0,777 ^{ns}	$y = -5e-09x + 0,0112$	9e-06	0,996 ^{ns}

ns = não significativo (P < 0,1 e P > 0,1)

Tabela 9. Equação da reta, coeficiente de determinação (R²) e nível de significância (P) determinados pela análise de regressão linear entre as variáveis-explicativas (fluxo acumulado de ozônio (FAO₃) e EAO40) e a razão raiz/parte aérea e a massa seca (MS) total

	FAO ₃			EAO40		
	Equação da reta	R ²	P	Equação da reta	R ²	P
Raiz/PA	$y = 0,0049x + 0,3995$	0,23	0,409 ^{ns}	$y = -1e-06x + 0,4702$	0,001	0,949 ^{ns}
MS total	$y = -0,7736x + 34,677$	0,51	0,173 ^{ns}	$y = -0,0007x + 26,579$	0,06	0,693 ^{ns}

ns = não significativo (P < 0,1 e P > 0,1)

4.5.2 Ambiente fechado e semi-controlado

As relações entre as variáveis-explicativas e os índices baseados em sintomas foliares induzidos por O₃ não foram realizadas devido ao não surgimento destas neste ambiente. Além disso, foram feitas análises de regressão linear apenas para o fluxo acumulado de ozônio, uma vez que a EAO40 em casa de vegetação foi igual a 0 ppb durante todo o período de estudo.

As análises de regressão linear entre o FAO₃ e a TCR de altura, diâmetro caulinar e número de folhas apresentaram um coeficiente de determinação (R²) considerado baixo (R² = 0,21; 0,13 e 0,17, respectivamente) e as relações não foram significativas (Tabela 10).

Tabela 10. Equação da reta, coeficiente de determinação (R²) e nível de significância (P) determinados pela análise de regressão linear entre a variável-explicativa (fluxo acumulado de ozônio, FAO₃) e as taxas de crescimento relativo de altura, diâmetro e número de folhas

TCR	FAO ₃		
	Equação da reta	R ²	P
Altura	$y = -0,0228x + 0,0115$	0,21	0,0867 ^{ns}
Diâmetro	$y = -0,011x + 0,0089$	0,13	0,1803 ^{ns}
Nº de folhas	$y = -0,0175x + 0,0091$	0,17	0,1274 ^{ns}

ns = não significativo (P < 0,1 e P > 0,1)

Assim como visto em ambiente aberto e não controlado, as análises de regressão linear entre o FAO_3 e a TCR de massa seca de folha, caule, raiz, parte aérea e total, bem como a massa seca total e a razão raiz/parte aérea, apresentaram associações fracas e não significativas (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Equação da reta, coeficiente de determinação (R^2) e nível de significância (P) determinados pela análise de regressão linear entre a variável-explicativa (fluxo estomático de ozônio acumulado) e as taxas de crescimento relativo de massa seca (MS) de folhas, caule, parte aérea (PA), raiz e total

TCR	FAO ₃		
	Equação da reta	R ²	P
MS de folhas	$y = -0,0026x + 0,0115$	0,01	0,883 ^{ns}
MS de caule	$y = 0,0039x + 0,0136$	0,02	0,846 ^{ns}
MS de PA	$y = -0,001x + 0,0127$	0,001	0,956 ^{ns}
MS de raiz	$y = 0,0139x + 0,0078$	0,14	0,534 ^{ns}
MS total	$y = 0,004x + 0,011$	0,02	0,825 ^{ns}

ns = não significativo ($P < 0,1$ e $P > 0,1$)

Tabela 12. Equação da reta, coeficiente de determinação (R^2) e nível de significância (P) determinados pela análise de regressão linear entre a variável-explicativa (fluxo acumulado de ozônio, FAO_3) e a massa seca (MS) total e razão raiz/parte aérea (PA)

TCR	FAO ₃		
	Equação da reta	R ²	P
MS total	$y = -58,165x + 47,521$	0,36	0,284 ^{ns}
Raiz/PA	$y = 0,4037x + 0,2831$	0,68	0,084 ^{ns}

ns = não significativo ($P < 0,1$ e $P > 0,1$)

5. DISCUSSÃO

5.1 Análise conjunta das condições meteorológicas e da qualidade do ar

As concentrações de ozônio apresentaram um perfil sazonal característico da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) durante o período de estudo (maio/2012 a agosto/2013) (CETESB 2012).

Os maiores níveis deste poluente foram vistos nas estações de primavera e verão, período em que as 2^a, 3^a e início da 4^a exposições estavam em andamento. De acordo com Biondi *et al.* (1992) as concentrações de O₃ estão correlacionadas positivamente tanto com as temperaturas médias como com as máximas, que nesse período, superaram as médias históricas. Isso pode explicar as altas concentrações de O₃ observadas. Segundo Pudasainee *et al.* (2006), esses fatores, além da presença de poluentes precursores (NO_x), podem explicar 93% da variação das concentrações do O₃.

A EAO40 medida nessas três exposições ultrapassou o limite de 3.000 ppb acumulados durante o período de três meses acima do qual ocorreria perda da produtividade agrícola (LRTAP Convention 2011), sendo que na 2^a exposição, o valor de EAO40 foi 2,5 vezes maior do que isso.

A 3^a exposição (novembro/2012 a fevereiro/2013) também apresentou condições climáticas semelhantes em relação à temperatura, entretanto nos meses de novembro a início de fevereiro houve um volume de chuva superior ao observado para a 2^a exposição, com os dois últimos meses do ano de 2012 apresentando um volume superior a média histórica (1933-2012) (IAG-USP 2012). De acordo com a CETESB (2013), isto foi resultado da influência da Zona de Convergência do Atlântico Sul e da Zona de Convergência da Umidade, fenômenos estes que aumentam a nebulosidade e precipitação, e conseqüentemente, diminui a incidência de radiação solar. Possivelmente, este foi um dos motivos para a diminuição das concentrações de NO₂ verificadas nesta exposição, que aliado à baixa radiação solar, resultou em concentrações menores de O₃ em relação à exposição anterior. A redução das concentrações de ozônio em períodos de maior precipitação também foram relatadas em estudos realizados por Blum *et al.* (1997), Pudasainee *et al.* (2006) e Blum e Didyk (2006).

A 4^a exposição, também teve concentrações menores do que as observadas na 2^a exposição, embora consideradas altas. Isso, porque nos 20 primeiros dias as

concentrações médias de ozônio foram altas em alguns momentos, próximas a 60 ppb, além de terem ocorrido picos de concentração elevada, por vezes ultrapassando o padrão de qualidade do ar adotado pela CETESB. Com a entrada do outono, as concentrações deste poluente tenderam a cair, podendo ser explicado pelas quedas da temperatura média e máxima, bem como da radiação solar, além de alguns períodos de chuva no mês de abril, que poderiam ajudar na remoção de alguns poluentes precursores e aumentando a nebulosidade.

Além das possíveis causas mencionadas para as altas concentrações verificadas na área de estudo em algumas exposições, existe também o fato desta estar envolvida por vegetação, notadamente conhecido por ser uma grande fonte de emissão dos compostos orgânicos voláteis (COVs) (Beauchamp *et al.* 2005, Lelieveld *et al.* 2008, Calfapietra *et al.* 2009). Os COVs em áreas poluídas, como é o caso do presente estudo, podem interagir com os óxidos de nitrogênio (NO_x) originados da emissão veicular (CETESB 2013), atuando diretamente no equilíbrio fotoestacionário das reações de formação e consumo deste oxidante fotoquímico. Além disso, Schuh *et al.* (1997) confirmou em experimentos que essas emissões são afetadas por temperatura, intensidade da luz, entre outros fatores, o que fortalece ainda mais a hipótese de que estes COVs estariam colaborando com o aumento nos níveis de O₃, uma vez que as altas concentrações deste foram verificadas justamente quando ambos os parâmetros foram maiores.

Nas 1^a e 5^a exposições, as concentrações de ozônio foram muito baixas, condizentes com a época do ano (outono e inverno). Nesse período, a temperatura e a radiação tendem a ser menores, assim como verificado neste estudo, o que diminuiria a formação do O₃. Apesar das maiores concentrações de NO₂ vistas na 1^a exposição, embora ainda consideradas baixas, o inverno de 2012 (1^a exposição) na RMSP teve as condições mais favoráveis à dispersão dos poluentes dos últimos anos, com pouquíssimas ocorrências de inversão térmica abaixo dos 200 m de altitude (CETESB 2013). O inverno de 2013 (5^a exposição) foi similar ao de 2012 em relação a condições favoráveis à dispersão dos poluentes (CETESB 2013), com a ocorrência de chuvas em alguns períodos, que pode ter contribuído com a remoção de poluentes precursores do O₃.

5.2 Variação diurna e parametrização da condutância estomática

O experimento possibilitou caracterizar a condutância estomática de *Psidium guajava* ‘Paluma’ quanto à sua variação diurna e sazonal.

A condutância estomática de *Psidium guajava* ‘Paluma’ apresentou redução a partir das dez horas (Figura 20), momento em que a irradiância e a temperatura do ar começavam a se elevar e a umidade relativa do ar a diminuir, resultando em valores de déficit de pressão mais elevados. Essa resposta é verificada com muita frequência em estudos realizados com espécies do cerrado (Morales & Prado 1998, Franco & Lüttge 2002, Prado *et al.* 2004), mas também em regiões temperadas, como Emberson *et al.* (2000) com *Fagus sylvatica* e *Triticum aestivum*. Os autores concluíram que a temperatura e o déficit de pressão de vapor foram os fatores limitantes para o funcionamento estomático nesse período do dia, assim como Manes *et al.* (2007) em estudos com *Quercus ilex*.

Segundo Jarvis (1976), a irradiância, a temperatura e o DPV explicam em 96% a variação do potencial hídrico no sistema solo-planta-atmosfera. Logo, o aumento destes em horas próximas ao meio-dia, resulta em valores decrescentes de potencial hídrico no sistema (solo > planta > atmosfera), aumentando as taxas de transpiração da planta. Para evitar ou reduzir a perda de água para o ambiente, a planta reduz a condutância estomática. A relação entre estes parâmetros e destes sobre a condutância estomática da planta foi observada por Gerosa *et al.* (2009a) ao trabalhar com uma floresta de carvalho durante um período com altas temperaturas e DPV. Resultados apresentados pelos autores constataram maior taxa de transpiração, levando a redução da abertura estomática.

Danielsson *et al.* (2003) e Azuchi *et al.* (2014) estudaram a possibilidade de incluir uma função no modelo de g_s que representasse o efeito da hora do dia sobre a condutância máxima da espécie em estudo. A inclusão desta função resultou na melhora da capacidade preditiva do modelo em ambos os estudos. Entretanto, o mesmo não foi verificado por Yamaguchi *et al.* (2014), que concluíram que seu efeito poderia ser redundante aos exercidos pela temperatura, DPV e luz e optaram pela não inclusão dessa função no modelo, considerando que se deve optar, sempre que possível, por modelos mais simples.

Estes parâmetros citados como moduladores da resposta estomática (temperatura, DPV e luz), além da disponibilidade hídrica no solo, foram analisados

individualmente em vista dos seus respectivos efeitos sobre a g_s de ‘Paluma’. Para a temperatura (Figura 21A), a condutância estomática relativa de ‘Paluma’ apresentou uma resposta clássica, com sua atividade acontecendo em faixa de temperatura semelhante a obtidas por outras espécies (Gerosa *et al.* 2009b, Tang *et al.* 2014), variando de 15°C (T_{\min}) a 42°C (T_{\max}), com ótima igual a 28°C (T_{otm}). Logo, temperaturas abaixo e acima desta temperatura ótima são limitantes à condutância estomática desta cultivar. Em outros experimentos, com espécies de clima temperado, a atividade estomática ocorreu em temperaturas mais extremas, com mínimas de 0 °C (Hayes *et al.* 2012) e máximas de 50 °C (Azuchi *et al.* 2014), indicando uma sensibilidade menor de g_s para temperaturas menores e maiores, respectivamente, às observadas em ‘Paluma’.

O déficit de pressão de vapor (DPV) se tornou um fator limitante a condutância estomática em ‘Paluma’ a partir de 1,2 kPa, valor semelhante ao encontrado para diferentes espécies (Figura 21C) (Op de Beeck *et al.* 2010, Hayes *et al.* 2012, Feng *et al.* 2012). Com o aumento do DPV, g_s tende a diminuir, ou seja, quanto mais seco estiver o ar, menor a condutância estomática, pois assim é evitada a perda de água para o ambiente. Apesar disso, o fechamento estomático só ocorreu sob altos valores de DPV (5,5 kPa), indicando uma tolerância maior a este parâmetro comparado a experimentos realizados, por exemplo, por Tang *et al.* (2014), o qual verificou um efeito muito forte deste sobre a g_s de cultivares de arroz, com g_s atingindo seu valor mínimo quando o DPV foi igual a 2,7 kPa. Já Azuchi *et al.* (2014) relataram uma alta aclimação de *Fagus crenata* em ambientes com ar atmosférico extremamente seco, uma vez que a g_s da espécie ocorreu em uma faixa muito ampla de DPV (1,2 kPa a 12 kPa).

Analisando o efeito que ambos os parâmetros (temperatura e DPV) exercem sobre a condutância estomática de ‘Paluma’, é possível inferir que as mudas mantidas em ambiente fechado e semi-controlado (casa de vegetação) tiveram seu funcionamento estomático mais reprimido em comparação as plantas mantidas em ambiente aberto e não controlado, uma vez que temperaturas mais elevadas foram registradas nesse ambiente, principalmente em horas centrais do dia, ultrapassando os 40 °C em vários momentos, além da umidade relativa do ar mais baixa.

A radiação fotossinteticamente ativa (RFA) (Figura 21B), dentre todos os parâmetros levados em consideração, foi o menos limitante para a condutância estomática de ‘Paluma’ ao longo do dia. Segundo Heath *et al.* (2009), a g_s tende a aumentar conforme o aumento da luz, o que foi confirmado no presente estudo, quando

os resultados mostraram que a g_s de ‘Paluma’ em relação a este parâmetro é máxima com uma RFA acima de aproximadamente $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Emberson *et al.* (2000), explica que este parâmetro se torna um fator limitante a g_s ao entardecer e, principalmente, no período da noite. Isso ocorre porque a resposta estomática à luz tem origem indireta, essencialmente devido à baixa pressão de CO_2 nos espaços intercelulares, regulada pelo processo fotossintético (Jones 1992, Larcher 2000). Machado & Lagôa (1994) citam que com o aumento da irradiância as taxas de assimilação de carbono tendem a se elevar até um limite. Este aumento reduz a pressão interna deste gás devido ao seu consumo, o que estimula a abertura estomática. Ao entardecer, a atividade das enzimas responsáveis pela carboxilação reduz, diminuindo, conseqüentemente, as taxas de assimilação de CO_2 . Isso faz com que a pressão deste gás nos espaços intercelulares aumente, o que propicia a redução da abertura do poro estomático.

Uma situação clara em que a função de RFA pode ser considerada um fator limitante à atividade estomática é vista ao comparar esta resposta fisiológica entre folhas expostas a luz e aquelas mais sombreadas em um mesmo indivíduo. Tal fato foi verificado por Thomas & Winner (2002), Nunn *et al.* (2005) e Manes *et al.* (2007), os quais relatam diferenças na atividade estomática de acordo com a posição da folha em relação ao dossel, onde a g_s de folhas no alto do dossel (expostas a luz) apresentam taxas maiores comparadas àquelas mais adentro do dossel (folhas sombreadas).

A disponibilidade de água no solo (Figura 21D) foi um fator limitante a g_s de ‘Paluma’ quando a umidade do solo esteve abaixo de 20%. A sensibilidade estomática foi reduzida acima deste valor, com a condutância sendo máxima. O estresse hídrico induz ao fechamento estomático, reduzindo a perda de água por transpiração e a absorção de CO_2 (Tausz *et al.* 2007). Estudos com o intuito de verificar o efeito deste fator sobre o processo de trocas gasosas têm sido realizados frequentemente. Hayes *et al.* (2012) observou uma redução de 40% a 60% da condutância estomática em gramíneas expostas ao estresse hídrico comparado a plantas mantidas em regime de irrigação alto. Resultados semelhantes foram obtidos por Pollastrini *et al.* (2014), que verificou uma redução em alguns parâmetros das trocas gasosas (assimilação, transpiração e condutância estomática) em duas espécies de *Populus sp.* quando submetidas ao estresse hídrico, com volumes disponíveis de água no solo inferiores a 6%. González-Fernández *et al.* (2010), em estudo com gramíneas e leguminosas no Mediterrâneo, verificaram que a baixa disponibilidade de água na estação seca resultou

em redução de g_s . Concluíram também que, naquele ambiente, a disponibilidade de água no solo exerce forte controle na dinâmica das espécies vegetais, determinando a duração do período de crescimento, o crescimento das plantas e também a g_s .

Como dito anteriormente, o presente estudo possibilitou coletar informações da resposta estomática de ‘Paluma’ quanto à sazonalidade, função também inclusa no modelo representada pelo efeito dos dias do ano sobre a condutância máxima (f_{DA}), também conhecida como função fenológica (Figura 21E). Os dados permitiram ver claramente que essa resposta é máxima durante o verão, reduzindo ao longo do outono e inverno até um limite e, então, voltando a aumentar ao longo da primavera, atingindo novamente o clímax no verão. Separando as estações em períodos chuvoso (primavera e verão) e seco (outono e inverno) de acordo com os dados do boletim climatológico do IAG-USP (2012) para o município de São Paulo e também dos obtidos ao longo do estudo para o local do experimento (ambiente não controlado), observa-se uma maior atividade estomática para esta cultivar durante o período chuvoso, o que é comumente delatado (Gerosa *et al.*, 2009a; González-Fernández *et al.*, 2010). Além de chuvoso, este período do ano apresentou as maiores temperaturas ao longo do estudo. Tal fato corrobora com os resultados obtidos por Serrano *et al.* (2008a,b), que observaram um ciclo fenológico (da brotação até a colheita de frutos) mais rápido em indivíduos de ‘Paluma’ que sofreram podas em períodos com maior temperatura média, indicando que este fator colabora para o aumento da atividade estomática desta cultivar. Serrano *et al.* (2008a) ressalta ainda que o período de agosto a setembro é marcado pelo estímulo natural de florescimento da goiabeira e o início do aumento de g_s no presente estudo se deu próximo a este período.

Quando todos estes fatores mencionados acima não são limitantes a atividade estomática, a planta atinge sua condutância máxima (g_{max}). Para a cultivar ‘Paluma’, a g_{max} obtida foi de $721 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, valor considerado de intermediário para alto comparado à literatura. Karlsson *et al.* (2004) averiguaram valores de g_{max} variando de 220 a $350 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ entre espécies dos gêneros *Pinus*, *Fagus* e *Quercus*, além de uma variação intra-específica, como foi para as cultivares Vosges e Ebro de *P. halepensis* com 300 e $350 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Pleijel *et al.* (2007) obtiveram g_{max} igual a $1230 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para *Solanum tuberosum*, enquanto Op de Beeck *et al.* (2010) verificaram para duas espécies de *Brassica sp*, valores de g_{max} iguais a 490 e $670 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Apesar dos valores obtidos para g_{\max} tanto para ‘Paluma’ quanto para as outras espécies mencionadas acima, esta pode apresentar variações uma vez influenciada por fatores internos e externos a ela. Sendo assim, estes podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta, visto por Thomas & Winner (2002), que observaram em experimento em campo aberto uma maior condutância estomática de folhas do alto do dossel em indivíduos adultos de *Pseudotsuga menziesii* comparado a indivíduos jovens ($0,243 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $0,141 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente). Estes mesmos autores, sugerem a partir deste trabalho e de outros analisados que espécies caracterizadas por uma estatura maior geralmente apresentam um aumento da condutância máxima conforme o seu crescimento, enquanto o contrário é frequentemente descrito para espécies de estatura menor. Nunn *et al.* (2005) também verificaram uma condutância máxima maior em indivíduos adultos de *Fagus sylvatica*.

Outro fator visto interferir sobre a resposta estomática máxima é a área de ocorrência do espécime vegetal. González-Fernández *et al.* (2014), ao compararem o comportamento estomático de algumas cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum*) estudadas na Espanha e na Itália, verificaram valores distintos de g_{\max} . Tal fato pode ser explicado pela mudança de diversos fatores ambientais (temperatura, DPV, RFA, disponibilidade hídrica do solo, etc.) responsáveis por modular tal resposta fisiológica, os quais podem apresentar maior ou menor grau de importância sobre a g_s da espécie em um determinado local.

Apesar das relações individuais existentes entre os parâmetros ambientais e g_s , atribuir uma maior ou menor importância a um determinado parâmetro no presente modelo de g_s se torna uma tarefa mais complicada, devido à interação existente entre eles, como exemplificado em alguns momentos, além do fato de está ser uma primeira abordagem do tema.

5.3 Modelo de condutância estomática

O modelo superestimou a condutância estomática de ‘Paluma’, principalmente quando os valores são mais baixos, aproximando-se da relação 1:1 entre a condutância medida e a modelada nos valores mais altos (Figura 23), quando passa a subestimá-los. O modelo foi capaz de explicar 56% da variação de g_s medida, o que pode ser considerado satisfatório e dentro da faixa do observado em outros estudos com espécies agrícolas e arbóreas, os quais também mostraram superestimar ou subestimar a g_s

medida. O modelo de g_s proposto por González-Fernández *et al.* (2014) para *Solanum lycopersicum*, explicou em 37% ($P < 0,001$) a variação da condutância média horária medida em experimentos em câmaras de topo aberto. Azuchi *et al.* (2014) elaboraram um modelo capaz de explicar 60% da variação de g_s para *Fagus crenata*, enquanto o modelo apresentado em Gerosa *et al.* (2009b) para *Fagus excelsior* explicou 63%.

Ao contrário destes, o mesmo Gerosa *et al.* (2009b) em experimentos em câmaras de topo aberto com *Fagus sylvatica* e *Quercus rubor* e Tang *et al.* (2014) em experimento com *Oryza sativa* expostas em um sistema aberto de enriquecimento do ar filtrado com ozônio (FACE – “Free-Air Concentration Enrichment system with ozone”), verificaram uma performance do modelo muito melhor, com este explicando aproximadamente 80% da variação de g_s .

A diferença do presente estudo aos trabalhos citados está nas condições em que os dados de g_s para ‘Paluma’ foram coletados: em campo sob condições ambientais não controladas. Experimentos em câmaras de topo aberto podem reproduzir condições ambientais não realísticas diferentes daquelas observadas em campo, como, por exemplo, temperaturas mais elevadas, velocidade do vento constante e também um controle sobre as concentrações desejadas de ozônio, este último também observado em experimentos conduzidos em FACE. Logo, incertezas ou interpretações imprecisas sobre a condutância estomática da espécie e a quantidade de ozônio absorvida por ela podem ocorrer ao extrapolar esses resultados às condições ambientais de campo.

Com relação à precisão, modelos com melhor desempenho tendem a ser mais precisos. Yamaguchi *et al.* (2014), ao testarem a incorporação de novas funções ao modelo, observaram um aumento no valor de R^2 junto a uma redução no valor de RQME, tendo este último variado de cerca de 60 nos mais precisos a 90 nos menos precisos. Como uma primeira abordagem, a aplicação do modelo DO_3SE para a espécie *P. guajava* ‘Paluma’ foi considerado bom (RQME = 116), próximo ao verificado por González-Fernández *et al.* (2014) (RQME = 101), embora este possa ser melhorado.

A escolha dos parâmetros ambientais que irão compor o modelo é um fator crucial para uma boa resposta deste (Gerosa *et al.*, 2012). Alguns estudos tem relatado o efeito induzido pelo ozônio sobre a condutância estomática de algumas espécies, reduzindo esta resposta fisiológica após um período de exposição ao poluente. Isso foi observado por Yan *et al.* (2010) em *Quercus mongólica*, Pina (2010) em *Psidium guajava* ‘Paluma’ e Calatayud *et al.* (2011) em *Quercus Pyrenaica* e *Quercus faginea*.

A consciência desses efeitos, fez com que alguns autores adotassem uma função que representasse o efeito do fluxo estomático horário de ozônio acumulado sobre a condutância máxima (Danielsson *et al.* 2003, Tang *et al.* 2014) e a exposição tanto agudo quanto crônica do ozônio sobre a condutância máxima (Yamaguchi *et al.* (2014). De acordo com este último autor, a inclusão de tais funções ao modelo para *Oryza sativa* L. melhorou não só o seu desempenho ($R^2 = 0,51$ para $R^2 = 0,57$), como também a sua precisão ao reduzir o valor de RQME de 87 para 82. A função ainda ajudou a evitar que o modelo superestimasse a concentração de O_3 absorvida. Tendo em vista o aumento constante das concentrações de ozônio no município de São Paulo (CETESB 2013), a inclusão das funções mencionadas no modelo de g_s para ‘Paluma’, seria interessante e muito adequado, podendo resultar na melhora do modelo.

Outras funções que devem ser avaliadas na aferição do modelo são as referentes ao efeito das horas do período da tarde sobre a condutância máxima e à fenologia expressa pela soma da temperatura efetiva. Quanto à primeira, Danielsson *et al.* (2003) relatou que houve uma melhora na força do modelo para o trigo, com R^2 aumentando de 0,36 para 0,44. Resultados obtidos por Azuchi *et al.* (2014) também mostraram um leve aumento no valor de R^2 (de 0,61 para 0,62) e um melhor ajuste da relação entre a g_s medida e a modelada, com um coeficiente angular e intercepto próximos a 1 e 0, respectivamente. Ao contrário desses, nenhuma melhora no desempenho do modelo foi observado por Yamaguchi *et al.* (2014), concluindo que o efeito de tal função poderia estar associado àqueles exercidos pela temperatura, DPV e luz. Portanto, testar a adição desta função no modelo de ‘Paluma’ se faz necessário, uma vez que há uma redução evidente da atividade estomática durante este período do dia (Figura 20). Em relação à função de fenologia, diversos estudos têm adotado a função fenológica baseada na soma da temperatura média diária a partir da antese (florescimento) para explicar o comportamento de g_s durante a estação de crescimento (Danielsson *et al.* 2003, Wieser & Emberson 2004, Pleijel *et al.* 2007, Grünhage *et al.* 2012). Ao contrário destes, optou-se por utilizar os dias do ano no presente estudo, de acordo com o Calendário Juliano. Apesar de a função obtida corresponder satisfatoriamente à verificada nos demais estudos (Figura 21f), é possível que apresentá-la como temperatura acumulada produza um resultado melhor.

Segundo Jarvis (1976), um fator que poderia comprometer o modelo seria um número baixo de amostragens, com coleta de dados em uma pequena faixa de variação dos parâmetros ambientais. Tal falha faria com que o valor da condutância não

representasse o potencial para a espécie em estudo. Esta hipótese não foi levada em consideração neste estudo, uma vez que a quantidade de dados amostrados foi suficiente para demonstrar as relações existentes entre estes parâmetros e a condutância estomática de ‘Paluma’. Entretanto, a inclusão de dados de g_s para ‘Paluma’ referentes a outros locais seria importante (Alonso *et al.* 2008, González-Fernández *et al.* 2014) para uma descrição adequada do comportamento estomático sob diferentes condições em que esta cultivar é produzida, resultando em uma melhor parametrização do modelo.

Apesar das várias possibilidades de aferir o modelo, por se tratar de um primeiro estudo com o intuito de avaliar o modelo de g_s utilizado na Europa, para uma espécie tropical, o desempenho da modelagem foi além das expectativas. Com isso, estudos posteriores a esse só tendem a contribuir para a melhora de sua capacidade preditiva.

5.4 FAO₃ e sua capacidade preditiva para os sintomas foliares e respostas de crescimento, comparada a EAO40.

As maiores exposições acumuladas de ozônio (EAO40) nem sempre implicam em maior dose absorvida pela planta. Isso foi verificado no presente estudo, onde o maior fluxo acumulado de ozônio (FAO₃) ocorreu durante a 3ª exposição (Figura 24), enquanto as maiores concentrações de ozônio foram registradas ao longo da 2ª exposição (Figura 18). Manes *et al.* (2007) explicam que é esperado que a relação entre EAO40 e FAO₃ seja baixa em alguns momentos, devido a interferência de fatores que favorecem a sua formação na atmosfera mas desfavorecem sua absorção pela planta ou vice-versa.

Isso tem sido verificado em estudos relacionando a variação temporal e espacial de ambos os índices. Baumgarten *et al.* (2009), ao estudar o risco imposto pelo O₃ sobre a floresta da Bavária (Alemanha), verificou menor fluxo acumulado de O₃ durante o ano mais seco, limitado principalmente pela temperatura elevada e baixa disponibilidade hídrica, enquanto os níveis de O₃ foram maiores em consequência da temperatura alta, com a qual se correlacionaram positivamente (Fares *et al.* 2012). O contrário foi verificado durante o ano mais úmido. Além disso, o autor verificou diferenças espaciais, com o fluxo sendo regido também pela disponibilidade hídrica do solo, enquanto as concentrações de O₃ foram regidas pelo fator altitude. Ribas *et al.* (1998) e Merchequi *et al.* (2009) relataram o aumento das concentrações de ozônio com a elevação da

altitude, que segundo González-Fernández (2009), se deve à maior intensidade da radiação solar, favorecendo as reações fotoquímicas e diminuindo os processos de destruição do ozônio, resultando no aumento de suas concentrações.

Variações espaciais e temporais foram vistos por Simpson *et al.* (2007), Zapletal *et al.* (2012) e Tang *et al.* (2014) ao estudar o processo das mudanças climáticas sobre o risco imposto por este poluente, comparando cenários atuais e futuros em relação às concentrações de ozônio. Segundo dados obtidos, a avaliação baseada no fluxo prevê uma redução na dose absorvida de O₃ sob condições climáticas futuras, enquanto a avaliação baseada na concentração de O₃ (EAO40) prevê um aumento no risco, devido à elevação da temperatura e do déficit de pressão de vapor.

Portanto, são inúmeros os fatores que levam a respostas diferentes entre ambos os índices. Além destas apresentadas e das condições meteorológicas mais favoráveis à absorção do poluente por ‘Paluma’ na 3ª exposição, existe o fator fenológico influenciando a condutância estomática. Justamente nesse período do estudo a condutância estomática foi maior, o que também contribuiu para o maior fluxo deste forte oxidante para o interior da folha.

A variação na incidência e intensidade dos sintomas foliares visíveis em ‘Paluma’ em uma mesma exposição e entre estas, possivelmente estiveram relacionadas a alguns dos fatores elencados por Davison *et al.* (2003), como a quantidade de O₃ absorvida por cada indivíduo, variação genética de uma mesma população e idade ou estágio de desenvolvimento de cada folha. Além disso, os sintomas visíveis nem sempre aconteceram quando as plantas de ‘Paluma’ estavam expostas a uma maior concentração de ozônio (EAO40), ao contrário do verificado por Diaz-de-Quijano *et al.* (2012) e Gottardini *et al.* (2014). Um exemplo disso foi a 5ª exposição.

Assim como para EAO40, o maior fluxo acumulado de ozônio visto na 3ª exposição também não acompanhou o surgimento e o desenvolvimento dos sintomas foliares em ‘Paluma’, uma vez que poucos indivíduos apresentaram sintomas induzidos por O₃ e, quando presentes, foram poucas folhas e em baixa intensidade (Figuras 26, 27 e 28). Uma das possíveis razões seria a ação do sistema antioxidante de ‘Paluma’ na neutralização do estresse oxidativo induzido pelo O₃. O fato do modelo não considerar este sistema de proteção da planta pode acarretar em uma superestimação da dose efetiva do ozônio, aquela que irá efetivamente agir sobre as células e tecidos da planta e que induzirão um efeito biológico, com o que concordam (Musselman *et al.* 2006, Castagna & Ranieri 2009, Heath *et al.* 2009). Ao estudar o comportamento deste

sistema em mudas de ‘Paluma’ expostas em ambiente contaminado por O₃, Dias *et al.* (2007) verificaram um aumento das concentrações de ácido ascórbico, considerado a primeira linha de defesa deste sistema (Castagna & Ranieri 2009), resultado também verificado por Yan *et al.* (2010) com *Quercus mongolica* nos primeiros 45 dias, com posterior aumento de superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX). O ácido ascórbico também foi descrito por Nunn *et al.* (2005) como um dos principais antioxidantes na proteção contra os efeitos induzidos pelo O₃, porém Pina (2010), ao trabalhar com ‘Paluma’, não verificou qualquer relação entre esses antioxidantes e o surgimento de injúrias. Estudos sugerem que a proteção contra o efeito induzido pelo O₃ em ‘Paluma’ seja realizada principalmente por compostos fenólicos, como antocianina e taninos, responsáveis pela pigmentação avermelhada dos sintomas (Rezende e Furlan 2009), sendo estes reconhecidos também por Saviranta *et al.* (2010) como possíveis antioxidantes de defesa contra os efeitos induzidos pelo ozônio.

Além do sistema antioxidante, pode ter ocorrido uma superestimação da dose absorvida de O₃ via estômato, uma vez que o modelo não considera outras formas de deposição não-estomática, além da deposição cuticular. Duas formas de deposição descritas na literatura, e que poderiam interagir com o poluente antes deste ser absorvido pela planta, são a deposição úmida sobre a superfície foliar e também a reação entre os compostos orgânicos voláteis biogênicos (BVOCs) e o O₃.

O efeito da deposição úmida sobre o O₃ foi relatada por Fares *et al.* (2012). Este explica que mesmo o ozônio sendo um poluente com baixa solubilização em água, este pode aderir a superfícies úmidas. Em seu estudo foi verificado um efeito recorrente deste fenômeno devido à formação de orvalho durante a noite em solos e folhas e também por diversos eventos de precipitação, mantendo a superfície foliar úmida. A deposição úmida seria uma explicação plausível para o presente estudo, uma vez que a 3^a exposição ocorreu justamente durante o período chuvoso, além de ser verificada visualmente, em dias de coleta de dados de g_s, a formação de orvalho nesse período.

Em relação aos BVOCs, a emissão destes por ‘Paluma’ e posterior reação com o O₃ na camada limite, a fina camada de ar estagnado que recobre a folha, também podem ter ocorrido. Fares *et al.* (2008) com *Populus nigra* e *Quercus ilex*, Fares *et al.* (2010a) com *Pinus ponderosa*, Fares *et al.* (2010b) com *citrus* e Fares *et al.* (2012) com laranjais observaram uma maior deposição não-estomática devido aos BVOCs em períodos de primavera e verão, devido às altas temperaturas e ao déficit de pressão de vapor, os quais se correlacionam positivamente com a emissão desses terpenos. Os

autores afirmam que essa deposição não-estomática nesse período foi responsável por cerca de 50% da remoção de O₃ da atmosfera, diferente do inverno, quando a deposição estomática foi o principal meio, com taxas superiores a 80%. O período da 3ª exposição coincidiu com o fim da primavera e grande parte do verão, com ocorrência de altas temperaturas (Figura 9) e, certamente, de altos valores de DPV. Logo, é possível que tenha ocorrido a emissão de BVOCs, que dependem da ação desses parâmetros ambientais, e que eles tenham reduzido a concentração de O₃ na camada limite, sendo importante estudar a emissão de compostos voláteis por ‘Paluma’.

Por fim, outra possibilidade seria com relação à concentração de ozônio no interior da folha. Devido a rápida velocidade de reação sofrida pelo O₃ ao entrar no espaço intercelular, Laisk *et al.* (1989) assumiu que a sua concentração no interior da folha é igual a zero. Entretanto, estudos realizados por Fares *et al.* (2010b) afirmam haver um acúmulo deste poluente no espaço intercelular quando altos níveis de ozônio são registrados na atmosfera. Como exemplo, este autor cita que em um pico de concentração de 100 ppb, as concentrações no interior da folha poderiam representar 10% deste valor. Este acúmulo poderia alterar os gradientes de concentração entre interior e exterior da folha, alterando as taxas de difusão deste gás para dentro da planta, com consequente redução da absorção deste. Picos de concentração foram verificados não só nesta exposição, mas também nas 2ª e 4ª exposições (Figura 17). Uma vez que o presente estudo considerou as concentrações de ozônio no interior da folha como igual a 0, o modelo poderia estar superestimando a concentração absorvida por ‘Paluma’.

O início da 4ª exposição foi caracterizado por altas concentrações de ozônio e alta absorção deste pela planta nos primeiros 20 dias, entretanto o início das injúrias só foi verificado após quase um mês de exposição. Resultados semelhantes foram vistos por Baumgarten *et al.* (2009), que não verificou o surgimento de sintomas foliares em espécies pertencentes a floresta da Bavária, quando esta era exposta a altas concentrações de ozônio no início do período de crescimento. Segundo o autor, isso se deve ao sistema antioxidante da planta, que possivelmente estaria com sua capacidade de atuar elevada porque no início do período as plantas estavam mais ativas, proporcionando alta produção de antioxidantes e maior capacidade de defesa contra o ozônio. Apesar de não se referir ao início do período de crescimento, isso também pode explicar o não surgimento de sintomas em ‘Paluma’ no primeiro mês de exposição. Antes de serem expostas, mudas dessa cultivar permaneceram por aproximadamente um mês em casa de vegetação contendo ar filtrado, crescendo sob boas condições

ambientais, principalmente em relação a disponibilidade de água. Com o início da exposição, estas mantiveram um bom estado de crescimento e desenvolvimento, principalmente porque as mudas de ‘Paluma’ ainda apresentavam altas taxas de condutância estomática, garantindo uma maior taxa de assimilação de carbono, uma vez que, segundo Manes *et al.* (2007), há uma relação forte entre ambos os parâmetros. O favorecimento do crescimento é comprovado pelo grande crescimento em altura, diâmetro e número de folhas (Figuras 30, 31 e 32) no primeiro mês dessa exposição, o que indica que as mudas estavam com altas taxas metabólicas, favorecendo a produção de antioxidantes como o ácido ascórbico e reduzindo a ocorrência do estresse oxidativo. Com o decorrer da exposição, estas primeiras defesas podem ter sido superadas, cabendo aos compostos fenólicos a tarefa de defesa contra as espécies reativas de oxigênio, resultando em sintomas foliares na superfície adaxial da folha devido o acúmulo destes compostos no vacúolo.

Um fato interessante a ser ressaltado é que apesar de uma possível superestimação da dose de O₃ absorvida pelo modelo, a análise do fluxo acumulado para as 3^a e 4^a exposições, permitiu verificar a existência de uma possível concentração limite de 8 ou 9 mmol m⁻² s⁻¹ para o início da manifestação de sintomas. O estabelecimento de níveis críticos para espécies agrícolas, florestas e vegetação semi-natural, baseados na dose absorvida de ozônio, tem sido realizado em alguns estudos (Mills *et al.* 2011, González-Fernández *et al.* 2014) e adotados por órgãos públicos na Europa para a proteção dessas espécies (LRTAP Convention 2011). Apesar deste resultado, sintomas foliares também foram observados com um fluxo acumulado menor. Portanto, mais estudos serão necessários para o estabelecimento de um nível crítico para ‘Paluma’, mas esta primeira abordagem indica que existe um fluxo acumulado a partir do qual as injúrias se manifestam nesta espécie.

A 1^a e 5^a exposições, ambas ocorrendo durante a mesma época em anos diferentes, foram caracterizadas por baixas concentrações de ozônio e um fluxo acumulado inferior às outras exposições. Entretanto, em ambas foi relatada a presença de sintomas foliares. Esse resultado possivelmente está relacionado à queda do metabolismo da cultivar para este período, implicando em menor taxa fotossintética. Gottardini *et al.* (2014) afirma que plantas com menor taxa fotossintética estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de sintomas foliares, devido redução de reservas metabólicas. Entre ambas as exposições, a 5^a apresentou um número de plantas e folhas sintomáticas maiores comparados a 1^a exposição. Isso pode ser explicado pela

influência que variáveis ambientais como a temperatura, umidade relativa do ar e luz têm sobre a produção de antioxidantes, não considerando os fenólicos neste caso. A temperatura exerce uma grande influência sobre todos os processos metabólicos (Danielsson *et al.* 2013), dentre eles a produção de antioxidantes, regida também pela umidade relativa do ar e luz e, portanto, considerado um processo dinâmico. (Bulbovas *et al.* 2005, Heath *et al.* 2009). Temperatura e radiação fotossinteticamente ativa mais baixas caracterizaram a 5ª exposição (Figuras 9 e 11), o que pode ter limitado mais o sistema de defesa das plantas de ‘Paluma’ expostas nessa exposição comparadas à 1ª. Outra possibilidade, seria a variabilidade genética entre mudas de ambas, como afirma Davison *et al.* (2003), diferindo os indivíduos quanto à sensibilidade ao poluente.

Dentre todas as exposições, mudas de ‘Paluma’ expostas ao longo da 2ª exposição foram as mais suscetíveis ao efeito induzido pelo ozônio, tanto em incidência quanto na intensidade dos sintomas foliares. Os sintomas foliares seguiram mais o perfil da EAO40 do que do fluxo acumulado. Saitanis *et al.* (2004), Díaz-de-Quijano *et al.* (2012) e Gottardini *et al.* (2014), também verificaram um maior surgimento e intensidade de sintomas foliares em plantas expostas a altas concentrações de ozônio na atmosfera. A alta concentração atmosférica, com EAO40 acima de 7.500 ppb, aliada a uma absorção também elevada nesta exposição, com aproximadamente 15 mmol m⁻² de fluxo acumulado, favoreceram ao maior desenvolvimento dos sintomas. Além disso, alguns estudos têm relatado a influência direta de poluentes atmosféricos sobre a condutância estomática, dentre eles o O₃, reduzindo a capacidade das células-guarda de responder a estímulos (Saxe 1990, Wellburn 1990, Mansfield 1998, Robinson *et al.* 1998). Esta evidência foi relatada por vários autores (Paoletti & Manning 2007, Paoletti & Grulke 2010). Wagg *et al.* (2013) observaram um menor controle estomático nas espécies *Ranunculus acris* e *Dactylis glomerata* a fatores como temperatura, DPV, RFA e conteúdo hídrico do solo quando expostas a concentrações altas deste poluente, com g_s se mantendo alta ou estável em alguns casos considerados extremos para aquela espécie. Tendo em vista as altas concentrações de O₃ a que as mudas de ‘Paluma’ foram submetidas nessa exposição, é possível pensar em tal efeito sobre a g_s desta cultivar e, portanto, com o controle estomático debilitado a planta poderia ter absorvido ozônio inclusive durante a noite, acarretando em maiores níveis de sintomas vistas nessa exposição.

Apesar do fluxo acumulado de ozônio não ter acompanhado em alguns momentos os sintomas foliares, constatou-se uma relação mais fraca entre essa resposta

de 'Paluma' com a EAO40, quando consideradas as exposições separadamente, com exceção feita à 2ª exposição (Figuras 36, 37 e 38). A relação fraca entre os sintomas foliares de 'Paluma' e a EAO40 já havia sido relatada por Pina (2010), com este índice explicando apenas 15% da variação dos sintomas em condições não controladas. A melhor explicação pelo FAO_3 era esperada, visto considerar a resposta estomática da planta e alguns dos parâmetros ambientais que a regulam, os quais tem extrema importância na absorção ou não do poluente pela planta, diferente da EAO40 que considera apenas a concentração de ozônio na atmosfera.

A discussão realizada acima só comprova e reforça a existência de uma relação não-linear entre o concentração atmosférica de ozônio e sintomas foliares. Portanto, considerar os fatores que influenciam na absorção do ozônio, na sua deposição, bem como processos de detoxificação e reparo podem ajudar a compreender melhor o surgimento e o desenvolvimento dos sintomas, buscando a maior aproximação possível de um fluxo efetivo (Paoletti *et al.* 2008), ou seja, aquela concentração que irá efetivamente atingir as células e os tecidos (Musselman *et al.* 2006, Dizengremel *et al.* 2008). Além do presente estudo, uma melhor capacidade preditiva do FAO_3 comparada a EAO40, em relação a sintomas foliares visíveis induzidos por O_3 , também foi vista por Gerosa *et al.* (2009b) e Karlsson *et al.* (2004), este último obtendo um coeficiente de explicabilidade de 78% para o FAO_3 contra 38% para a EAO40.

Apesar dos resultados positivos obtidos para exposições separadas, o mesmo não foi verificado ao agrupá-las (Figura 39). Possivelmente, isso tenha ocorrido devido a perfis diferentes representados por cada exposição, onde indivíduos ora expressaram uma rápida aparição e desenvolvimento de sintomas com baixo fluxo e em outros momentos esse feito demorou a ocorrer, necessitando de um fluxo acumulado maior. Ao relacionar o conjunto de dados de sintomas referentes a todas as exposições, estes apresentaram uma distribuição não uniforme, o que teoricamente teria comprometido a correlação com o FAO_3 .

Efeitos induzidos pelo O_3 sobre parâmetros como crescimento são mais efetivos em experimentos conduzidos em câmaras de topo aberto, onde é possível o controle de algumas variáveis ambientais. Alguns estudos em câmaras relatam a redução da biomassa de ramos e raiz (Wang *et al.*, 2008), perda da produtividade (Pleijel 2011), número de folhas e crescimento caulinar (Ahmad *et al.* 2013) e biomassa total (Danielsson *et al.* 2003), porém a maioria relata a redução no peso seco de raiz (Calatayud *et al.* 2011, Díaz-de-Quijano *et al.* 2012, Hayes *et al.* 2012, Pollastrini *et al.*

2014), diminuindo a razão raiz/parte aérea. Calatayud *et al.* (2011) afirmam que isso se deve a redução na assimilação de carbono, que conseqüentemente, reduziria a quantidade de fotoassimilados a serem translocados para a raiz.

Enquanto grande parte da literatura retrata um efeito negativo induzido pelo O₃ sobre o crescimento e biomassa de plantas, seja considerando a EAO40 ou o FAO₃, para ‘Paluma’ expostas em ambiente não controlado este poluente não parece ter influenciado nestes parâmetros, uma vez que reduções simultâneas destes foram verificadas também em ambiente semi-controlado ao longo das exposições. Isso foi comprovado não só pelos dados de crescimento e biomassa, mas também por meio das relações estabelecidas entre os índices de EAO40 e FAO₃ com cada um dos parâmetros de crescimento e biomassa (Tabelas de 7 a 12), que embora tenham sido explicadas melhor pela EAO40, foram todas não significativas e com valores de R² muito baixos. A não influência do O₃ sobre o crescimento em ‘Paluma’ também foi verificado por Dias *et al.* (2007), que concluíram que a pigmentação avermelhada dos sintomas foliares atuam como forma de proteção e não de morte celular, o que foi comprovado pelo estudos anatômicos de Tresmondi & Alves (2011). Bussotti & Ferreti (2009) também verificaram resultados contraditórios, com um maior incremento na área basal de espécies arbóreas em algumas florestas na Itália expostas a altas concentrações de ozônio. Os mesmos atribuíram este feito a outros fatores ambientais, como temperatura, condições do solo e disponibilidade de água. É possível que, no presente estudo, a redução destes parâmetros em ambos os ambientes ao longo das exposições bem como entre elas, esteja relacionado a fatores como temperatura, luz, disponibilidade hídrica entre outros que não sejam o ozônio.

Apesar da baixa explicação que os índices forneceram para a variação dos resultados de crescimento em ‘Paluma’, não é o que frequentemente se tem observado. Muitos trabalhos têm obtido melhores, principalmente com o fluxo acumulado de ozônio. Alguns exemplos são os trabalhos de Yamaguchi *et al.* (2014), que observaram uma relação pouco mais forte entre o fluxo acumulado e a biomassa relativa de cultivares de arroz, comparada a EAO40, explicando em 95% a variação contra 92% para EAO40. Além deste, Grünhage *et al.* (2012) obtiveram uma correlação alta (R² = 0,84) e altamente significativa, entre o fluxo acumulado de ozônio acima de 6 mmol m⁻² e a produtividade relativa de trigo. Como último exemplo, Danielsson *et al.* (2003), verificou uma melhor explicação da redução da produtividade em *Triticum aestivum* por meio do fluxo, explicando 90% da redução, enquanto a EAO40 explicou apenas 34%,

indicando a importância de se considerar as variáveis ambientais que modulam a resposta estomática na avaliação dos efeitos causados pelo O_3 .

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo indicou a necessidade de novas investigações visando aumentar o desempenho e a precisão do modelo de condutância estomática. Uma nova parametrização deve ser testada, incluindo uma função que represente os efeitos da concentração de O_3 sobre g_{max} ; uma função que represente o efeito das horas do período da tarde sobre g_{max} e também a função de fenologia expressa como temperatura acumulada. Além disso, também se devem testar diferentes doses absorvidas para a verificação da existência de uma concentração limite a partir da qual os sintomas foliares surgiriam. A partir disso, a proposição de um índice de proteção à vegetação será mais plausível.

7. CONCLUSÃO

- A hipótese apresentada no presente estudo foi comprovada em parte. A variação do fluxo acumulado de ozônio (FAO₃) indicou uma melhor capacidade preditiva para a variação dos sintomas foliares induzidos por ozônio, comparada a EAO40, porém, somente quando as exposições foram analisadas separadamente.
- O modelo multiplicativo de fluxo estomático apresentado em LRTAP Convention (2011) foi considerado aplicável às condições ambientais da cidade de São Paulo, SP.
- Dentre as variáveis-resposta utilizadas no estudo, os sintomas foliares induzidos pelo O₃ foi a que melhor se correlacionou com o FAO₃, ao contrário do crescimento, e, portanto, considerada a variável-resposta mais adequada para *Psidium guajava* 'Paluma'.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, M.N., Büker, P., Khalid, S., Van Den Berg, L., Shah, H.U., Wahid, A., Emberson, L., Power, S.A. & Ashmore, M. 2013. Effects of ozone on crops in north-west Pakistan. *Environmental Pollution* 174: 244-249.
- Ainsworth, E.A., Yendrek, C.R., Sitch, S., Collins, W.J. & Emberson, L.D. 2012. The effects of tropospheric of ozone on net primary productivity and implications for climate change. *Annual Review of Plant Biology* 63: 637-661.
- Alonso, R., Elvira, S., Sanz, M. J., Gerosa, G., Emberson, L. D., Bermejo, V. & Gimeno, B. S. 2008. Sensitivity analysis of a parameterization of the stomatal component of the DO₃SE model for *Quercus ilex* to estimate ozone fluxes. *Environmental Pollution* 155: 473-480.
- Angelocci, L.R. 2002. Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: Introdução ao tratamento biofísico. ESALQ/USP, Piracicaba.
- Ashmore, M.R. 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment* 28: 949-964.
- Azuchi, F., Kinose, Y., Matsumura, T., Kanomata, T., Uehara, Y., Kobayashi, A., Yamaguchi, M. & Izuta, T. 2014. Modeling stomatal conductance and ozone uptake of *Fagus crenata* grown under different nitrogen loads. *Environmental Pollution* 184: 481-487.
- Baumgarten, M., Huber, C., Büker, P., Emberson, L., Dietrich, H.-P., Nunn, A.J., Heerdt, C., Beudert, B. & Matyssek, R. 2009. Are Bavarian Forests (southern Germany) at risk from ground-level ozone? Assessment using exposure and flux based ozone indices. *Environmental Pollution* 157: 2091–2107.
- Beauchamp, J., Wisthaler, A., Hansel, A., Kleist, E., Miebach, M., Niinemets, Ü., Schurr, U. & Wildt, J. 2005. Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: relationships between ozone uptake and emission of LOX products. *Plant, Cell and Environment* 28: 1334-1343.
- Benincasa, M.M.P. 2003. Análise de crescimento de plantas (noções básicas). 2ed. FUNEP, Jaboticabal.
- Bermejo, V., Alonso, R., Elvira, S., Rábago, I. & García, M. 2010. El ozono troposférico y sus efectos em la vegetación. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid.
- Biondi, F., Mignanego, L. & Schenone, G. 1992. Correlation between environmental parameters and leaf injury in *Nicotiana tabacum* L. cv. 'Bel-W3'. *Environmental Monitoring and Assessment* 22: 73-87.
- Blum, O., Bitynerowicz, A., Manning, W. & Popovicheva, L. 1997. Ambiente tropospheric ozone in the Ukrainian Carpathian Mountains and Kiev region: Detection with passive samplers and bioindicator plant. *Environmental Pollution* 98: 299-304.
- Blum, O. & Didyk, N. 2006. Ambient ozone phytodetection with sensitive clover (*Trifolium subterraneum* L. cv. Geraldton) in Ukraine. *Ecotoxicology, Ecological Risk Assessment and Multiple Stressors* 6: 279-289.
- Bulbovas, P., Moraes, R.M., Rinaldi, M.C.S., Cunha, A. L., Delitti, W.B.C. & Domingos, M. 2010. Leaf antioxidant fluctuations and growth responses in saplings of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) under an urban stressing environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 664 –670.
- Bulbovas, P., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C. & Domingos, M. 2005. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 28: 687-696.

- Bussotti, F. & Ferretti, M.** 2009. Visible injury, crown condition, and growth responses of selected Italian forests in relation to ozone exposure. *Environmental Pollution* 157: 1427–1437.
- Calatayud, V., Cerveró, J., Calvo, E., García-Breijo, F.J., Reig-Armiñana, J. & Sanz, M.J.** 2011. Responses of evergreen and deciduous *Quercus* species to enhanced ozone levels. *Environmental Pollution* 159: 55-63.
- Calfapietra, C., Fares, S. & Loreto, F.** 2009. Volatile organic compounds from Italian vegetation and their interaction with ozone. *Environmental Pollution* 157: 1478-1486.
- Castagna, A. & Ranieri, A.** 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution* 157: 1461–1469.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2012. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2013. Operação Inverno – 2013: Qualidade do ar. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- Chang, J.C. & Hanna, S.R.** 2004. Air quality model performance evaluation. *Meteorology and Atmospheric Physics* 87: 167-196.
- Chappelka, A., Renfro, J., Somers, G. & Nash, B.** 1997. Evaluation of ozone injury on foliage of blackcherry (*Prunus serotina*) and tall milkweed (*Asclepias exalata*) in Great Smoky Mountains National Park. *Environmental Pollution* 95: 3-18.
- Dafré-Martinelli, M., Nakazato, R.K., Dias, A.P.L., Rinaldi, M.C.S. & Domingos, M.** 2011. The redox state of *Ipomoea nil* `Scarlet O Hara growing under ozone in a subtropical area. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 1645-1652.
- Danielsson, H., Karlsson, G.P. & Karlsson, P.-E.** 2003. Ozone uptake modelling and flux-response relationships - an assessment of ozone-induced yield loss in spring wheat. *Atmospheric Environment* 37: 475-485.
- Danielsson, H., Karlsson, P.-E. & Pleijel, H.** 2013. An ozone response relationship for four *Phleum pratense* genotypes based on modelling of the phytotoxic ozone dose (POD). *Environmental and Experimental Botany* 90: 70– 77.
- Davison, A.W., Neufeld, H.S., Chappelka, A.H., Wolff, K. & Finkelstein, P. L.** 2003. Interpreting spatial variation in ozone symptoms shown by cutleaf cone flower, *Rudbeckia laciniata* L. *Environmental Pollution* 125: 61–70.
- Decreto Estadual nº 59.113** de 23/04/2013, dispõe sobre os novos padrões de qualidade do ar e dá providências correlatas. Publicação no DO: 24/04/2013, pp. 1.
- De Temmerman, L., Bell, J.N.B., Garrec, J.P., Klumpp, A., Krause, G.H.M. & Tonneijck, A.E.G.** 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. *In: Klumpp, A., Ansel, W. & Klumpp, G. (eds.). Urban air pollution, bioindication and environmental awareness. Göttingen, Curvillier, pp. 337-373.*
- DETRAN-SP, Departamento Estadual de Trânsito de São Paulo.** 2014. Disponível em: <http://www.detran.sp.gov.br> (acesso em 14.07.2013).
- Dias, A.P.L., Dafré-Martinelli, M., Rinaldi, M.C.S. & Domingos, M.** 2011. How the redox state of tobacco `Bel-W3 is modified in response to ozone and other environmental factors in a sub-tropical area?. *Environmental Pollution* 159: 458-465.

- Dias, A.P.S., Rinaldi, M.C.S. & Moraes, R.M.** 2007. Injúrias latentes e visíveis induzidas pelo ozônio em *Psidium guajava* 'Paluma'. *Hoehnea* 34: 231-238.
- Díaz-de-Quijano, M., Schaub, M., Bassin, S., Volk, M. & Peñuelas, J.** 2012. Ozone visible symptoms and reduced root biomass in the subalpine species *Pinus uncinata* after two years of free-air ozone fumigation. *Environmental Pollution* 169: 250-257.
- Dizengremel, P., Thiec, D.L., Bagard, M. & Jolivet, Y.** 2008. Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution* 156: 11-15.
- Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Cambridge, H.M., Simpson, D. & Tuovinen, J.P.** 2000. Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environmental Pollution* 109: 403-413.
- Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Murray, F., Kuylenstierna, J.C.I, Percy, K.E., Izuta, T., Zheng, Y., Shimizu, H., Sheu, B.H., Liu, C.P., Agrawal, M., Wahid, A., Abdel-Latif, N.M., van Tienhoven, M., Bauer, L.I. & Domingos, M.** 2001. Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. *Water, Air and Soil Pollution* 130: 107-118.
- Emberson, L.D., Buker, P. & Ashmore, M.R.** 2007. Assessing the risk caused by ground level ozone to European forest trees: A case study in pine, beech and oak across different climate regions. *Environmental Pollution* 147: 454-466.
- Emberson, L.D., Bueker, P., Ashmore, M.R., Mills, G., Jackson, L.S., Agrawal, M., Atikuzzaman, M.D., Cinderby, S., Engardt, M., Jamir, C., Kobayashi, K., Oanh, N.T.K., Quadir, Q.F. & Wahid, A.** 2009. A comparison of North American and Asia exposure-response data for ozone effects on crop yields. *Atmospheric Environment* 43: 1945-1953.
- Emberson, L.D., Kitwiroon, N., Beever, S., Buker, P. & Cinderby, S.** 2013. Scorched Earth: how will changes in the strength of the vegetation sink to ozone deposition affect human health and ecosystems?. *Atmospheric Chemistry and Physics* 13: 6741-6755.
- EPA, Environmental Protection Agency.** 2006. Air quality criteria for ozone and related photochemical oxidants (2006 Final). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-05/004aF-cF.
- Esposito, M.P., Ferreira, L.M., Santana, S.R.M, Domingos, M. & Souza, S.R.** 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum*. *Atmospheric Environment* 43: 619-623.
- Fares, S., Loreto, F., Kleist, E. & Wildt, J.** 2008. Stomatal uptake and stomatal deposition of ozone in isoprene and monoterpene emitting plants. *Plant Biology* 10: 44-54.
- Fares, S., McKay, M., Holzinger, R. & Goldstein, A. H.** 2010a. Ozone fluxes in a *Pinus ponderosa* ecosystem are dominated by non-stomatal processes: Evidence from long-term continuous measurements. *Agricultural and Forest Meteorology* 150: 420-431.
- Fares, S., Park, J.H., Ormeno, E., Gentner, D.R., McKay, M., Loreto, F., Karlik, J. & Goldstein, A.H.** 2010b. Ozone uptake by citrus trees exposed to a range of ozone concentrations. *Atmospheric Environment* 44: 3404-3412.
- Fares, S., Weber, R., Park, J.H., Gentner, D., Karlik, J. & Goldstein, A.H.** 2012. Ozone deposition to an orange orchard: Partitioning between stomatal and non-stomatal sinks. *Environmental Pollution* 169: 258-266.

- Feng, Z., Zhuc, J., Tang, H., Oue, H., Uddlinga, J., Pleijel, H., Kobayashi, K. & Guoe, W.** 2012. A stomatal ozone fluxerresponse relationship to assess ozone-induced yield loss of winter wheat in subtropical China. *Environmental Pollution* 164: 16-23.
- Feng, Z. & Kobayashi, K.** 2009. Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis. *Atmospheric Environment* 43: 1510–1519.
- Ferreira, A.L.A. L & Matsubara, S.** 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43: 61-68.
- Fiscus, E.L., Booker, F.L. & Burkey, K.O.** 2005. Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell and Environmental* 28: 997-1011.
- Foyer, C.H. & Noctor, G.** 2005. Oxidation and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environmental* 28: 1056 - 1071.
- Franco, A.C. & Luttge, U.** 2002. Midday depression in savana trees: coordinated adjustments in photochemical efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water-use efficiency. *Oecologia* 131: 356-365.
- Freedman, B.** 1995. *Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses.* Academic Press, San Diego.
- Fowler, D., Flechard, C., Cape, J. N., Storeton-West, R.L. & Coyle, M.** 2001. Measurements of ozone deposition to vegetation quantifying the flux, the stomatal and non-stomatal components. *Water, Air and Soil Pollution* 130: 65-74.
- Fuhrer, J., Skärby, L. & Ashmore, M.R.** 1997. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution* 97: 91-106.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Salatino, A. & Sanz, M.J.** 2007. *Psidium guajava* 'Paluma' as a new bio-indicator of ozone in the tropics. *Environmental Pollution* 147: 691-695.
- Furlan, C.M., Salatino, A. & Domingos, M.** 2004. Influence of air pollution on leaf chemistry, herbivore feeding and gall frequency on *Tibouchina pulchra* leaves in Cubatão (Brazil). *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 253 – 263.
- Gerosa, G., Finco, A., Marzuoli, R. & Tuovinen, J.P.** 2012. Evaluation of the uncertainty in the ozone flux effect modelling: From the experiments to the doseeresponse relationships. *Atmospheric Environment* 54: 44-52.
- Gerosa, G., Finco, A., Mereu, S., Vitale, M., Manes, F. & Denti, A.B.** 2009a. Comparison of seasonal variations of ozone exposure and fluxes in a Mediterranean Holm oak forest between the exceptionally dry 2003 and the following year. *Environmental Pollution* 157: 1737-1744.
- Gerosa, G., Marzuoli, R., Desotgiu, R., Bussotti, F. & Ballarin-Denti.** 2008. Visible leaf injury in young trees of *Fagus sylvatica* and *Quercus robur* in relation to ozone uptake and ozone exposure. An open top chambers experiment in south alpine environmental conditions. *Environmental Pollution* 152: 274-284.
- Gerosa, B., Marzuoli, R., Desotgiu, R., Bussotti, F. & Ballarin-Denti, A.** 2009b. Validation of the stomatal flux approach for the assessment of ozone visible injury in young forest trees. Results from the TOP (transboundary ozone pollution) experiment at Curno, Italy. *Environmental Pollution* 157: 1497-1505.

- Gimeno, B.S., Bermejo, V., Sanz, J., de la Torre, D., Gil, J.M. & Elvira, S.** 2004a. Growth response to ozone of annual species from Mediterranean pastures. *Environmental Pollution* 132: 297–306.
- Gimeno, B.S., Bermejo, V., Sanz, J., de la Torre, D., Gil, J.M. & Elvira, S.** 2004b. Assessment of the effects of ozone exposure and plant competition on the reproductive ability of three therophytic clover species from Iberian pastures. *Atmospheric Environment* 38: 2295–2303.
- González-Fernández, I.** 2009. Flujos estomáticos de ozono y sus efectos sobre la vegetación. relaciones dosis respuesta. Tese de doutorado. Newcastle University.
- González-Fernández, I., Bermejo, V., Elvira, S., de la Torre, D., González, A., Navarrete, L., Sanz, J., Calvete, H., García-Gómez, H., López, A., Serra, J., Lafarga, A., Armesto, A.P., Calvo, A. & Alonso, R.** 2013. Modelling ozone stomatal flux of wheat under mediterranean conditions. *Atmospheric Environment* 67: 149-160.
- González-Fernández, I., Bermejo, V., Elvira, S., Sanz, J., Gimeno, B. & Alonso, R.** 2010. Modelling anual pasture dynamics: aplicaciones to stomatal ozone deposition. *Atmospheric Environment* 44: 2507-2517.
- González-Fernández, I., Calvo, E., Gerosa, G., Bermejo, V., Marzuoli, R., Calatayud, V. & Alonso, R.** 2014. Setting ozone critical levels for protecting horticultural Mediterranean crops: Case study of tomato. *Environmental Pollution* 185: 178-187.
- Gottardini, E., Cristofori, A., Cristofolini, F., Nali, C., Pellegrini, E., Bussotti, F. & Ferretti, M.** 2014. Chlorophyll-related indicators are linked to visible ozone symptoms: Evidence from a field study on native *Viburnum lantana* L. plants in northern Italy. *Ecological Indicators* 39: 65– 74.
- Grulke, N.E., Paoletti, E. & Heath, R.L.** 2007. Comparison of calculated and measured foliar O₃ flux in crop and forest species. *Environmental Pollution* 146: 640-647.
- Grünhage, L., Pleijel, H., Mills, G., Bender, J., Denielsson, H., Lehmann, Y., Castell, J.F. & Bethenod, O.** 2012. Updated stomatal flux and flux-effect models for wheat for quantifying effects of ozone on grain yield, grain mass and protein yield. *Environmental Pollution* 165: 147-157.
- Guidi, L., Cagno, R. & Soldatini, G.F.** 2000. Screening of bean cultivars for their response to ozone as evaluated by visible injury and leaf chlorophylls fluorescence. *Environmental Pollution* 107: 349-355.
- Hayes, F., Wagg, S., Mills, G., Wilkinson, S. & Davies, W.** 2012. Ozone effects in a drier climate: implications for stomatal fluxes of reduced stomatal sensitivity to soil drying in a typical grassland species. *Global Change Biology* 18: 948–959.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C.** 2007. Free radicals in biology and medicine. 4ed. Clarendon Press, Oxford.
- Heath, R.L., Lefohn, A.S. & Musselman, R.C.** 2009. Temporal processes that contribute to nonlinearity in vegetation responses to ozone exposure and dose. *Atmospheric Environment* 43: 2919-2928.
- IAG-USP – Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo.** 2012. Boletim Climatológico Anual da Estação Meteorológica do IAG/USP/. v. 16. IAG/USP, São Paulo.

- Innes, J.L., Skelly, J.M. & Schaub, M.** 2001: Ozone and broadleaved species. A guide to the identification of ozone-induced foliar injury. Ozon, Laubholz- und Krautpflanzen. Ein Führer zum Bestimmen von Ozonsymptomen. Birmensdorf, Eidgenössische Forschungsanstalt WSL. Bern, Stuttgart, Wien; Haupt. 136 S.
- Jacob, D.J.** 1999. Introduction to Atmospheric Chemistry. 1ed. Princeton University Press, New Jersey.
- Jarvis, P.G.** 1976. The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences 273: 593–610.
- Jones, H.G.** 1992. Plants and Microclimate. 2 ed. Cambridge University Press. New York.
- Karlsson, P.-E., Braun, S., Broadmeadow, M., Elvira, S., Emberson, L., Gimeno, B.S., Le Thiec, D., Novak, K., Oksanen, E., Schaub, M., Uddling, J. & Wilkinson, M.** 2007. Risk assessments for forest trees: the performance of the ozone flux versus the AOT concepts. Environmental Pollution 146: 608-616.
- Karlsson, P.-E., Uddling, J., Braun, S., Broadmeadow, M., Evira, S., Gimeno, B.S., Le Thiec, D., Oksanen, E., Vandermeiren, K., Wilkinson, M. & Emberson, L.** 2004. New critical levels for ozone effects on youngtrees based on AOT40 and simulated cumulative leaf uptake of ozone . Atmospheric Environment 38: 2283-2294.
- Karnosky, D.F., Percy, K.E., Chappelka, A.H., Simpson, C. & Pikkarainen, J.** 2003. Air pollution, global change and forests in the new millennium. Elsevier.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. Environmental Pollution 50: 101-137.
- Krupa, S.V., Mcgrath, M.T., Andersen, C.P., Booker, F.L., Burkey, K.O., Chappelka, A.H., Chevone, B.I., Pell, E.J. & Zilinskas, B.A.** 2001. Ambient ozone and plant health. Plant Disease 85: 4-12.
- Laisk, A., Kull, O. & Moldau, H.** 1989. Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. Plant Physiology 90: 1163–1167.
- Larcher, W.** 2000. Ecofisiologia Vegetal. RiMa Artes e Textos, São Carlos.
- Lefohn, A.S., Laurence, J.A. & Kohut, R.J.** 1988. A comparison of indices that describe the relationship between exposure to ozone and reduction in the yield of agricultural crops. Atmospheric Environment 22: 1229–1240.
- Lelieveld, J., Butler, T.M., Crowley, J.N., Dillon, T.J., Fischer, H., Ganzeveld, L., Harder, H., Lawrence, M.G., Martinez, M., Taraborrelli, D. & Williams, J.** 2008. Atmospheric oxidation capacity sustained by a tropical forest. Nature 452: 737-740.
- Low, M., Herbinger, K., Nunn, A.J., Haberle, K.H., Leuchner, M., Heerdt, C., Werner, H., Wipfler, P., Pretzsch, H., Tausz, M. & Matyssek, R.** 2006. Extraordinary drought of 2003 overrules ozone impact on adult beech trees (*Fagus sylvatica*). Trees 20: 539-548.
- LRTAP Convention.** 2011. Mapping Manual 2004. Manual on methodologies and criteria for modeling and mapping critical loads & levels and air pollution effects, risks and trends. Chapter 3. Mapping critical levels for vegetation, 2011 revision Available at <http://www.icpmapping.org/Mapping_Manual>.
- Machado, E.C. & Lagôa, A.M.M.A.** 1994. Trocas gasosas e condutância estomática em três espécies de gramíneas. Bragantina 53: 141-149.
- Manes, F., Vitale, M., Fabi, A. M., De Santis, F. & Zona, D.** 2007. Estimates of potential ozone stomatal uptake in mature trees of *Quercus ilex* in a Mediterranean climate. Environmental and Experimental Botany 59: 235-241.

- Mansfield T.A.** 1998. Stomata and plant water relations: does air pollution create problems? *Environmental Pollution* 101: 1–11.
- Massman, W.J.** 1998. A review of the molecular diffusivities of H₂O, CO₂, CH₄, CO, O₃, SO₂, NH₃, N₂O, NO, and NO₂ in air, O₂ and N₂ near STP - polar and polyatomic gases. *Atmospheric Environment* 32: 1111-1127.
- Matyssek, R., Bytnerowicz, A., Karlsson, P.-E., Paoletti, E., Sanz, M., Schaub, M. & Wieser, G.** 2007. Promoting the O₃ flux concept for European forest trees. *Environmental Pollution* 146: 587-607.
- Medina, J. C., Castro, J. V., Sigrist, J. M. M., Martin, Z. N., Kato, K., Maia, M. L., Garcia, A. E. B. & Leite, R. S. S. F.** 1988. Goiaba: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. (2 Eds.), Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, pp. 224.
- Merchegui, R., Bem Mansoura, A., Laffray, X., Albouchi, A., Akrimi, N. & Garrec, J.P.** 2009. Ozone level assessment on the Boukornine National Park (Tunisia) using plant biomonitoring: influence of altitudinal parameter and meteorological conditions. *Water, Air and Soil Pollution* 204: 285-297.
- Mills, G., Pleijel, H., Braun, S., Büker, P., Bermejo, V., Calvo, E., Danielsson, H., Emberson, L., González-Fernández, I., Grünhage, L., Harmens, H., Hayes, F., Karlsson, P.-E. & Simpson, D.** 2011. New stomatal flux-based critical levels for ozone effects on vegetation. *Atmospheric Environment* 45: 5064-5068.
- Moraes, J.A.P.V. & Prado, C.H.B.A.** 1998. Photosynthesis and water relations in Cerrado vegetation. *In: Scarano, F.R. & Franco, A.C. (eds.). Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the neotropics. Series Oecologia Brasiliensis, vol. IV. PPGE-UFRJ.*
- Moraes, R.M., Furlan, C. M., Meirelles, S.T., Santos, D.Y.A.C., Souza, S. R., Viola, S.R.A.S., Rezende, F.M., Barbosa, J.M. & Domingos, R. L.** 2011. Avaliação da sensibilidade da goiabeira 'Pedro Sato' ao ozônio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 971-978.
- Musselman, R.C., Lefohn, A.S., Massman, W.J. & Heath, R.L.** 2006. A critical review and analysis of the use of exposure and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmospheric Environment* 40: 1869-1888.
- Novak, K., Skelly, J.M., Schaub, M., Kräuchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P.** 2003. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environmental Pollution* 125: 41-52.
- Nunn, A.J., Kozovits, A.R., Reiter, I.M., Heerdt, C., Leuchner, M., Lütz, C., Liu, X., Löw, M., Winkler, J.B., Grams, T.E.E., Häberle, K.H., Werner, H., Fabian, P., Rennenberg, H & Matyssek, R.** 2005. Comparison of ozone uptake and sensitivity between a phytotron study with young beech and a field experiment with adult beech (*Fagus sylvatica*). *Environmental Pollution* 137: 494-506.
- Oliveira Filho, D., Mantovani, E. C. & Pereira, S.** 2014. Tecnologia de determinação da umidade do solo via reflectometria no domínio do tempo. *In: Encontro de energia no meio rural. 3, 2000, Campinas. Proceedings online...* Available from: http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000022000000200052&lng=en&nrm=abn. Access on: 19 Feb. 2014.

- Op de Beeck, M., De Bock, M., Vandermeiren, K., de Temmerman, L. & Ceulemans, R.** 2010. A comparison of two stomatal conductance models for ozone flux modelling using data from two Brassica species. *Environmental Pollution* 158: 3251-3260.
- Paoletti, E. & Grulke, N.E.** 2010. Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. *Environmental Pollution* 158: 2664-2671.
- Paoletti, E. & Manning, W.J.** 2007. Toward a biologically significant and usable standard for ozone that will also protect plants. *Environmental Pollution* 150: 85-95.
- Paoletti, E., Ranieri, A. & Lauteri, M.** 2008. Moving toward effective ozone flux assessment. *Environmental Pollution* 156: 16–19.
- Peñuelas, J., Ribas, A., Gimeno, B.S., Filella, I.** 1999. Dependence of ozone biomonitoring on meteorological conditions of different sites in Catalonia (Spain). *Environmental Monitoring Assessment* 56: 221-224.
- Pereira, P.A.P., Santos, L.M.B., Sousa, E.T. & Andrade, J.B.** 2004. Alcohol- and gasohol-fuels: A comparative chamber study of photochemical ozone formation. *Journal Brazilian Chemical Society* 15: 646-651.
- Pina, J.M.** 2010. Trocas gasosas, sintomas foliares visíveis e atividade enzimática antioxidativa em plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' expostas ao ozônio no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica de São Paulo.
- Pina, J.M. & Moraes, R.M.** 2007. Ozone-induced foliar injury in saplings of *Psidium guajava* 'Paluma' in São Paulo, Brazil. *Chemosphere* 66: 1310-1314.
- Pina, J.M. & Moraes, R.M.** 2010. Gas exchange, antioxidants and foliar injuries in saplings of a tropical woody species exposed to ozone. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 685–691.
- Pleijel, H.** 2011. Reduced ozone by air filtration consistently improved grain yield in wheat. *Environmental Pollution* 159: 897-902.
- Pleijel, H., Danielsson, H., Emberson, L., Ashmore, M.R. & Mills, G.** 2007. Ozone risk assessment for agricultural crops in Europe: Further development of stomatal flux and flux–response relationships for European wheat and potato. *Atmospheric Environment* 41: 3022-3040.
- Pleijel, H., Danielsson, H., Ojanper, K., De Temmerman, L., Högy, P., Badiani, M. & Karlsson, P.-E.** 2004. Relationships between ozone exposure and yield loss in European wheat and potato—a comparison of concentration- and flux-based exposure indices. *Atmospheric Environment* 38: 2259–2269.
- Pleijel, H., Danielsson, H., Vandermeiren, K., Blum, C., Colls, J. & Ojanperä, K.** 2002. Stomatal conductance and ozone exposure in relation to potato tuber yield – results from the European CHIP programme. *European Journal of Agronomy* 17: 303-317.
- Pollastrini, M., Desotgiu, R., Camin, F., Ziller, L., Gerosa, G., Marzuoli, R. & Bussotti, F.** 2014. Severe drought events increase the sensitivity to ozone on poplar clones. *Environmental and Experimental Botany* 100: 94-104.
- Prado, C.H.B.A., Wenhui, Z., Rojas, M.H.C. & Souza, G.M.** 2004. Seasonal leaf gas exchange and water potential in a woody cerrado species community. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 7-16.
- Pudasainee, D., Sapkota, B., Shrestha, M.L., Kaga, A., Kondo, A. & Inoue, Y.** 2006. Ground level ozone concentrations and its association with NO_x and meteorological parameters in Kathmandu valley, Nepal. *Atmospheric Environment* 40: 8081-8087.

- Resolução CONAMA 03/1990**, de 28/06/1990, dispõe sobre os padrões de qualidade do ar previstos no PRONAR. Publicação DOU: 22/08/1990, pp. 15937-15939.
- Rezende, F.M. & Furlan, C.M.** 2009. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. *Chemosphere* 76: 1445-1450.
- Ribas, A., Filella, I., Gimeno, B. S. & Peñuelas, J.** 1998. Evaluation of tobacco cultivars as bioindicators and biomonitors of ozone phytotoxic levels in Catalonia. *Water, Air, and Soil Pollution*. 107: 347-365.
- Robinson, M.F., Heath, J. & Mansfield, T.A.** 1998. Disturbances in stomatal behaviour caused by air pollutants. *Journal of Experimental Botany* 49: 461-469.
- Saintains, C.J., Katsaras, D.H., Riga-Karandinos, A.N., Lekkas, D.B. & Arapis, G.** 2004. Evaluation of ozone phytotoxicity in the greater area of a typical Mediterranean small city (Volos) and in the nearby forest (Pelion Mt.), Central Greece. *Environmental Contamination Toxicology* 72: 1268-1277.
- Sánchez-Ccoylo, O.R., Ynoue, R.Y., Martins, L.D. & Andrade, M.F.** 2006. Impacts of ozone precursor limitation and meteorological variables on ozone concentration in São Paulo, Brazil. *Atmospheric Environment* 40: S552-S562.
- Sant'Anna, S.M., Espósito, M.P., Domingos, M. & Souza, S.R.** 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Atmospheric Environment* 151: 389-394.
- Saviranta, N.M.M., Julkunen-Tiitto, R., Oksanen, E. & Karjalainen, R. O.** 2010. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. *Environmental Pollution* 158: 440-446.
- Saxe, H.** 1990. Air pollution, primary plant physiological responses and diagnostic tools. Cornell University. New York.
- Schmidt, U., Thoni, H. & Kaupenjohann, M.** 2000. Using a boundary line approach to analyze N₂O flux data from agricultural soils. *Nutrient Cycling Agroecosystem* 57:119-129.
- Schuh, G., Heiden, A.C., Hoffmann, T., Kahl, J., Rockel, P., Rudolph, J. & Wildt, J.** 1997. Emissions of volatile organic compounds from sunflower and beech: dependence on temperature and light intensity. *Journal of Atmospheric Chemistry* 27: 291-318.
- Serrano, L.A.L., Marinho, C.S., Lima, I.M., Martins, M.V.V., Ronchi, C.P. & Tardin, C.P.** 2008b. Fenologia da goiabeira 'Paluma' sob diferentes sistemas de cultivos, épocas e intensidades de poda de frutificação. *Bragantia*: 67: 701-712.
- Serrano, L.A.L., Marinho, C.S., Silva, M.G. & Tardin, C.P.** 2008a. Características fenológicas e produtivas da goiabeira 'paluma' podada em diferentes épocas e intensidades no norte fluminense. *Ceres* 55: 416-424.
- Simpson, D., Ashmore, M.R., Emberson, L. & Tuovinen, J.-P.** 2007. A comparison of two different approaches for mapping potential ozone damage to vegetation. A model study. *Environmental Pollution* 146: 715-725.
- Souza, S.R., Sant'Anna, S.M.R., Rinaldi, M.C. & Domingos, M.** 2009. Short-term leaf responses of *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' to ozone under the environmental conditions of São Paulo, SE - Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 251-258.
- Soares, A.M.S. & Machado, O.L.T.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* 1: 1- 9.

- Tang, H., Pang, J., Zhang, G., Takigawa, M., Liu, G., Zhu, J. & Kobayashi, K.** 2014. Mapping ozone risks for rice in China for years 2000 and 2020 with flux-based and exposure-based doses. *Atmospheric Environment* 86: 74-83.
- Tausz, M., Grulke, N.E. & Wieser, G.** 2007. Defense and avoidance of ozone under global change. *Environmental Pollution* 147: 525-531.
- Thomas, S.C. & Winner, W.E.** 2002. Photosynthetic differences between saplings and adult trees: an integration of field results by meta-analysis. *Tree Physiology* 22: 117-127.
- Tresmondi, F.** 2010. Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de *Psidium guajava* 'Paluma' expostas em ambiente com ozônio. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo.
- Tresmondi, F. & Alves, E.S.** 2011. Structural changes in *Psidium guajava* 'Paluma' leaves exposed to tropospheric ozone. *Acta Botanica Brasilica* 25: 122-129.
- Wagg, S., Mills, G., Hayes, F., Wilkinson, S. & Davies, W.J.** 2013. Stomata are less responsive to environmental stimuli in high background ozone in *Dactylis glomerata* and *Ranunculus acris*. *Environmental Pollution* 175: 82-91.
- Wang, X., Zheng, Q., Feng, Z., Xie, J., Feng, Z., Ouyang, Z. & Manning, W.J.** 2008. Comparison of a diurnal vs steady-state ozone exposure profile on growth and yield of oilseed rape (*Brassica napus* L.) in open-top chambers in the Yangtze Delta, China. *Environmental Pollution* 156: 449-453.
- Wellburn, A.R.** 1990. Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers?. *New Phytologist* 115: 395-429.
- Wieser, G. & Emberson, L.D.** 2004. Evaluation of the stomatal conductance formulation in the EMEP ozone deposition model for *Picea abies*. *Atmospheric Environment* 38: 2339-2348.
- Yamaguchi, M., Hoshino, D., Inada, H., Akhtar, N., Sumioka, C., Takeda, K. & Izuta, T.** 2014. Evaluation of the effects of ozone on yield of Japanese rice (*Oryza sativa* L.) based on stomatal ozone uptake. *Environmental Pollution* 184: 472-480.
- Yan, K., Chen, W., He, X., Zhang, G., Xu, S. & Wang, L.** 2010. Responses of photosynthesis, lipid peroxidation and antioxidant system in leaves of *Quercus mongolica* to elevated O₃. *Environmental and Experimental Botany* 69: 198-204.
- Yu, S., Eder, B., Dennis, R., Chu, S.-H. & Schwartz, S. E.** 2006. New unbiased symmetric metrics for evaluation of air quality models. *Atmospheric Science Letters* 7: 26-34.
- Zapletal, M., Pretel, J., Chroust, P., Cudlín, P., Edwards-Jonášová, M., Urban, O., Pokorný, R., Czerný, R. & Hunová, I.** 2012. The influence of climate change on stomatal ozone flux to a mountain Norway spruce forest. *Environmental Pollution* 169: 267-273.