

JÉSSICA CRISTINA CASSIMIRO

Avaliação de índice de proteção à vegetação baseado na dose fitotóxica de ozônio

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
2015

JÉSSICA CRISTINA CASSIMIRO

Avaliação de índice de proteção à vegetação baseado na dose fitotóxica de ozônio

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

AGRADECIMENTOS

À minha família,

Meus pais Valter e Cristina por todo o amor incondicional, pela minha educação e condições de estudo. Obrigada por fazer o impossível para sempre me proporcionar o melhor. Minhas irmãs Sabrina e Amanda, pelas incontáveis risadas e pela força no trabalho de campo. Meu marido Fernando, pela companhia desde meus 14 anos e por todo o apoio e motivação. Amo vocês!

À minha orientadora,

Dra. Regina, pela paciência e dedicação desde minha iniciação científica. Por me compreender nos momentos difíceis da minha vida pessoal, com carinho e preocupação de mãe. Pela confiança no meu trabalho e na minha capacidade em iniciar uma pesquisa inovadora. Enfim, obrigada por me ensinar a fazer ciência!

Ao Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (IBt),

pelo espaço e infra-estrutura para o desenvolvimento desta pesquisa e em especial ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente.

Às Instituições FAPESP e CAPES,

pelo apoio financeiro ao “Projeto” e pela bolsa de mestrado concedida (Proc. 2013/02309-9).

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,

por conceder permissão ao uso da área para a realização da parte experimental deste estudo.

Às funcionárias da Seção de Ecologia,

Amariles, Dorinha e Marli pela ajuda diária e atenção e por tornarem as atividades mais divertidas.

Ao Instituto de Astronomia, Geofísica-PEFI,

pelo empenho em nos fornecer os dados climáticos durante todo o experimento.

Aos colaboradores do projeto,

Jéssica Picolli e Giselle Pedrosa pelas aulas de inglês e pela ótima companhia no trabalho de campo. Wilton Sala pelas discussões e os momentos de reflexão no Jardim da USP e por ser meu companheiro durante a faculdade.

Aos Pesquisadores,

Dra. Marisa Domingos, pela bolsa concedida no início do meu Mestrado; Dr. Sérgio Tadeu Meirelles; Dra. Mirian Rinaldi, Dra. Sílvia Ribeiro, Dra. Patrícia Bulbovas, Dra. Carla Zuliani, Dra. Maria Teresa Grombone-Guaratini, Dra. Márcia Lopes e pelas trocas de conhecimento e conversas agradáveis.

Aos amigos da Ecologia,

Francine, por compartilhar o desespero no processo seletivo, nas disciplinas, na qualificação e nesta reta final. Pedro Ivo pelas discussões e conhecimento passado. Jéssica Nobre, pelos ensinamentos iniciais e as conversas no almoço. Ricardo Nakazato, pelos conselhos, as discussões, por ser esta pessoa tão prestativa com todos. Daiane Teixeira, Marcelle Dafré, Ana Paula, Leonardo Fujita, Andressa Ribeiro, Patrícia Giampaoli, Marcela e Solange, pelo convívio agradável.

Aos amigos aquáticos,

Simone Wengrat, Estefano Zorzal, Luciane Maria, Gabrielle Araujo e Simone Oliveira, pelas conversas divertidíssimas, os conselhos e a companhia na hora do almoço.

À banca,

por dispor de seu tempo para compartilhar e acrescentar ao nosso trabalho seus conhecimentos.

À Deus,

por ter colocado em meu caminho todas essas pessoas especiais. Obrigada Deus pelo seu filho e por me abençoar tanto!

Índice

<i>Resumo</i>	i
<i>Abstract</i>	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Local de Estudo.....	10
3.2 Espécie estudada.....	10
3.3 Cultivo e exposição.....	11
3.4 Condições Meteorológicas e concentração de ozônio.....	12
3.5 Condutância Estomática.....	14
3.6 Modelo multiplicativo de condutância estomática.....	14
3.6.1 Cálculo da condutância estomática máxima, mínima e relativa.....	15
3.6.2 Parametrização da condutância estomática.....	15
3.6.3 Condutância modelada ($g_{s\text{ modelada}}$).....	17
3.7 Dose Fitotóxica de ozônio.....	17
3.8 Índice de concentração acumulada de ozônio.....	18
3.9 Variáveis-resposta.....	18
3.9.1 Senescência foliar.....	18
3.9.2 Injúria foliar.....	18
3.10 Análise estatística.....	19
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	20
4.1 Condições meteorológicas e concentração de ozônio.....	20
4.1.1 Ar ambiente.....	20
4.1.2 Ar filtrado.....	24
4.2 Modelo multiplicativo de condutância estomática.....	25
4.2.1 Condutância estomática.....	25
4.2.2 Parametrização da condutância estomática.....	28
4.2.3 Condutância Modelada ($g_{s\text{ modelada}}$).....	33
4.3 Índices.....	39
4.4 Variáveis-resposta.....	42
4.5 Dose-resposta.....	47
5. CONCLUSÃO	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

Resumo

Apesar das concentrações de ozônio (O_3) aumentarem anualmente na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), no Brasil não existem índices para a proteção da vegetação contra os efeitos deste poluente. Alguns países do hemisfério norte têm adotado níveis críticos baseados na dose fitotóxica de ozônio (DFO) absorvida pelos estômatos (modelo DO_3SE). Este tem mostrado melhor correlação com as respostas das plantas, comparado às métricas baseadas na concentração acumulada de ozônio. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a aplicabilidade do modelo baseado na DFO para a espécie tropical *Astronium graveolens* Jacq. e comparar sua performance com índices de concentração acumulada: EAO40 (soma das concentrações acumuladas de ozônio acima de 40 ppb), SOMA00 (soma das concentrações acumuladas de ozônio) e SOMA06 (soma das concentrações acumuladas de ozônio acima de 60 ppb). As injúrias foliares visíveis e a senescência foliar induzidas pelo O_3 foram as variáveis-resposta. A parte central do modelo é a condutância estomática, que foi medida em condições ambientais visando determinar como os parâmetros ambientais a modulam. O desempenho do modelo foi avaliada através de análise de regressão entre a g_s medida e a modelada. Diferentes níveis críticos foram testados para a DFO. Os sintomas foliares foram quantificados durante todo o experimento e relacionados com os índices. Análise de regressão entre a condutância medida e a modelada mostrou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,40. As análises apontaram uma relação significativa entre a SOMA00 e DFO0. Ambos os índices responderam de forma similar, explicando melhor as injúrias foliares do que a EAO40. O estudo sugere que o modelo DO_3SE pode ser aplicado na avaliação dos riscos do ozônio à vegetação tropical. No entanto, são necessários mais estudos para aumentar sua capacidade preditiva.

Palavras-chave: fluxo de ozônio, condutância estomática, injurias foliares.

Abstract

Although ozone concentrations (O_3) have increased in the Metropolitan Region of São Paulo (MRSP) annually, critical levels for vegetation protection against O_3 adverse effects do not exist. Some northern countries have adopted critical levels based on the phytotoxic ozone dose (DFO) absorbed by the stomata (DO₃SE model), which has shown better correlation with injuries than concentration-based metrics. The aim of this study was to investigate the applicability of the model based on DFO for the tropical species *Astronium graveolens* Jacq. and to compare its performance with accumulated concentration indices AOT40 (the sum of hourly ozone concentrations over a threshold of 40 ppb), SUM00 (the sum of all daytime ozone concentration) and SUM06 (all hourly concentrations over a threshold of 60 ppb) in predict leaf injuries. Visible foliar injury and leaf senescence induced by O_3 were the response variables. The central part of the model is stomatal conductance (g_s), this one was measured at ambient conditions to evaluate the influence of environmental parameters on it. The model performance was assessed through the relationship between the measured and modeled g_s . Different rate thresholds for the phytotoxic ozone dose were calculated. The foliar injury were analyzed throughout the study and associated with indices. Modeled versus measured relative stomatal conductance, shows a coefficient of determination (R^2) of 0.40. Analyses revealed a significant relationship between SUM00 and POD0. Both performing equally well and they were superior, as compared to AOT40, for explain foliar injury. The conclusion is that the DO₃SE model can be applied to ozone risk assessment to tropical vegetation. However further investigation is necessary to improve its predictive capacity.

Keywords: Ozone flux; stomatal conductance; foliar injuries.

1. INTRODUÇÃO

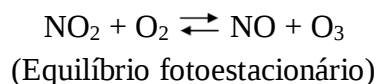
A atividade antrópica introduz na atmosfera diferentes gases e partículas que modificam as proporções de seus compostos naturais, comprometendo suas propriedades, funções e a qualidade do ar. A má qualidade do ar tem se tornado um dos principais problemas ambientais, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao rápido crescimento econômico e industrial, o aumento do tráfego de veículos, o alto consumo de energia e o escasso controle de emissões de poluentes atmosféricos.

Segundo a Resolução Conama Nº 3, de 28/06/1990 poluente atmosférico consiste em “qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade”.

De acordo com sua origem os poluentes atmosféricos são classificados como primários e secundários. Os poluentes primários são aqueles emitidos diretamente das fontes poluidoras, como por exemplo, monóxido de carbono, dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio e material particulado. Estes componentes podem reagir entre si ou com os constituintes naturais da atmosfera e dar origem a poluentes secundários, como o ozônio (O₃) e o nitrato de peroxi-acetila (PAN). O nível de poluição atmosférica é determinado através da quantificação de um número restrito de poluentes, definidos devido a sua maior ocorrência e aos efeitos adversos que causam ao meio ambiente e à saúde humana. Estes são os chamados indicadores universais de qualidade do ar e dentre eles está o O₃ (CETESB 2013).

O O₃ é um componente natural da atmosfera. Cerca de 90% do seu total encontra-se na estratosfera a 20 km de altitude, na chamada camada de O₃ (Krupa 1997). O restante está na baixa atmosfera e pode proceder tanto do transporte da estratosfera como da própria formação fotoquímica que ocorre na troposfera (Bermejo *et al.* 2010).

Em uma atmosfera não alterada pela atividade humana, o dióxido de nitrogênio (NO₂), na presença de luz solar, é decomposto em monóxido de nitrogênio (NO) e oxigênio atômico, que por sua vez reage com a molécula de gás oxigênio (O₂) e produz o O₃. Estas reações estão em equilíbrio fotoestacionário, uma vez que o NO pode atuar no consumo de O₃ e dar origem ao NO₂ e oxigênio atômico.



Em uma atmosfera poluída, o aumento das concentrações de O₃ troposférico se deve à perda do equilíbrio fotoestacionário devido a reações com outros poluentes primários. A reação mais comum ocorre com os compostos orgânicos voláteis (COV), como os hidrocarbonetos emitidos durante a queima incompleta de combustíveis fósseis (Ashmore 2005). Na presença de luz solar o radical hidroxila (OH[•]) naturalmente presente na atmosfera, reage com os hidrocarbonetos produzindo radical peróxi (RO₂[•]) (Equação 1). O radical peróxi oxida o NO a NO₂ sem que ocorra o consumo de O₃ (Equação 2). Assim, as moléculas de O₃ formadas pela fotólise do NO₂ ficam estocadas na atmosfera (Krupa & Manning 1988).



(Equação 1)



(Equação 2)

As concentrações de O₃ registradas em um local resultam da dinâmica entre os processos de formação, transporte e destruição do O₃, que são determinados por diversos fatores, dentre eles a distância da fonte emissora e padrões meteorológicos (Klumpp *et al.* 2001). No interior das cidades as emissões de óxido de nitrogênio procedentes principalmente dos veículos participam dos processos de destruição do O₃, o que mantém os níveis do poluente mais baixos, comparados aos das áreas rurais. Tanto o O₃ como seus precursores podem ser transportados a longas distâncias. Estima-se que entre 10 e 30% dos níveis de O₃ registrados na Europa ocidental podem ser provenientes do transporte de precursores entre os continentes (Bermejo *et al.* 2010). Deste modo, elaborar estratégias de controle do poluente se torna uma questão complexa e de interesse global.

As relações entre o O₃ atmosférico e os danos induzidos nos vegetais envolvem uma série de interações em cadeia (**figura 1**). Sendo um poluente gasoso, sua entrada na planta se dá através dos estômatos durante as trocas gasosas de CO₂ e H₂O. O O₃ que atinge o interior da planta é proporcional à sua concentração no ar, porém parte do poluente se perde durante esse transporte da atmosfera até os tecidos vegetais. Segundo Bermejo *et al.* (2010) este processo pode ser explicado através de uma analogia a um sistema de resistências, sendo elas a resistência aerodinâmica (Ra), da camada limítrofe (Rl), cuticular (Rc) e estomática (Re).

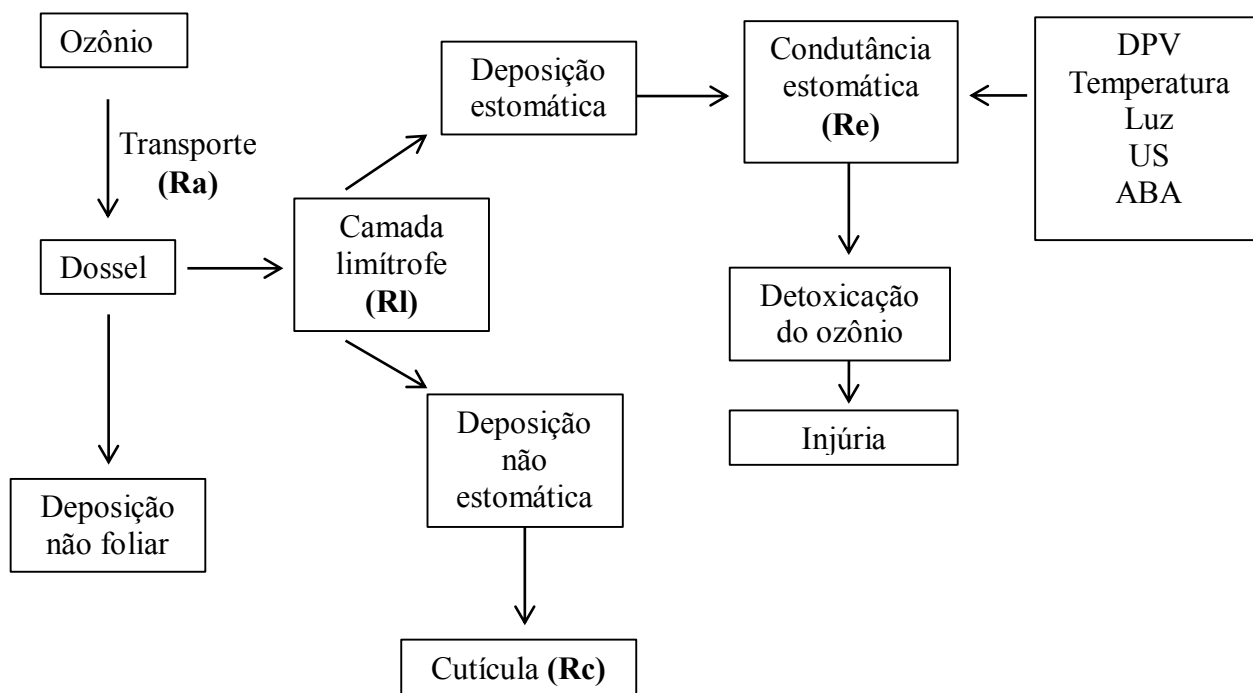


Figura 1. Vias de deposição do ozônio atmosférico até alcançar o interior da planta, incluindo as resistências enfrentadas, a detoxicação e os efeitos induzidos ao tecido vegetal. Resistência aerodinâmica (Ra); resistência da camada limítrofe (Rl); resistência cuticular (Rc); resistência estomática (Re); déficit de pressão de vapor (DPV); umidade relativa do solo (US); ácido abscísico (ABA). Adaptado de Musselman & Minnick (2000).

A resistência aerodinâmica é responsável por delimitar o caminho do gás desde a atmosfera até a camada de ar em contato com a superfície da vegetação. É inversamente proporcional à altura da planta, ou seja, quanto mais alta a planta menor será a resistência aerodinâmica sofrida pelo poluente. Também é influenciada pela estrutura do dossel e rugosidade da superfície (Angelocci 2002, González-Fernández 2009, UNECE 2010). Ao atingir o dossel o poluente enfrenta a resistência da camada limítrofe, uma camada de ar estagnada próxima da superfície foliar. Esta varia com características morfológicas das folhas, sendo diretamente proporcional à forma e área foliar. É influenciada também por fatores ambientais como o vento e a temperatura que, ao causarem turbulência, facilitam a difusão do poluente (Angelocci 2002, González-Fernández 2009). Por fim, a fração de O₃ que entra em contato com a folha enfrenta ainda a resistência cuticular, considerada uma via de alta resistência, e a resistência estomática. Esta última é determinada pela densidade estomática, por fatores ligados à fenologia da planta e pela condutância estomática. O grau de abertura dos estômatos pode variar ao longo do dia em função das condições ambientais (temperatura, VPD, luz, umidade do solo, ventos) e das concentrações de fitohormônios (Emberson *et al.* 2000, Musselman & Minnick 2000).

O O_3 é um oxidante forte que no interior da planta reage prontamente produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) que oxidam moléculas vitais, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Foyer & Noctor 2005). No entanto, a magnitude e o tipo de resposta do vegetal dependem do tempo de exposição e do poder de detoxicação da espécie estudada (Krupa *et al.* 2001, Klumpp *et al.* 2006).

Com o aumento das ERO, o sistema natural de defesa da planta deve agir produzindo antioxidantes, como os compostos fenólicos. Se a produção das ERO exceder a capacidade de neutralização dos antioxidantes, a planta entrará em estresse oxidativo (Foyer & Noctor 2005, Halliwell & Gutteridge 2006). O estresse oxidativo induzido pelo O_3 pode afetar vários processos, como os metabolismos primário e secundário, resultando na antecipação da senescência foliar, manifestação de cloroses e necroses foliares em espécies sensíveis, diminuição do crescimento e da produtividade (Gimeno *et al.* 2004ab, Ashmore 2005). Estima-se que a poluição por O_3 esteja relacionada com uma perda econômica global anual entre 14 e 26 milhões de dólares (Ainsworth *et al.* 2012).

Em regiões urbanas e rurais as concentrações de O_3 troposférico têm aumentado globalmente à taxa média de 1,5% ao ano (Karnosky *et al.* 2003) e já atinge níveis capazes de produzir injúrias em espécies sensíveis, reduzir a produtividade agrícola, além de constituir um risco às comunidades vegetais e ecossistemas (Krupa *et al.* 2001, Andersen 2003). 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).

Projeções para o século 21 baseadas nas concentrações médias de O_3 no passado, presente e em diferentes cenários futuros preveem que a concentração global de fundo ultrapassará 70 ppb até o ano de 2060. Este valor está bem acima do padrão internacional de qualidade do ar, que estabelece a concentração de 40 a 50 ppb para proteção à saúde humana, cultivos e vegetação natural (Vingarzan 2004). Estudos indicam que o acréscimo nas concentrações globais de O_3 está relacionado com o aumento das emissões de seus precursores, principalmente do NO_x (Fusco & Logan 2003, Karnosky *et al.* 2003, Vingarzan 2004).

No estado de São Paulo o O_3 é o poluente que mais ultrapassa os padrões de qualidade do ar (CESTESB 2013), e a principal fonte de precursores é a exaustão de motores veiculares. A frota veicular da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) tem aumentado ano após ano

e já contabiliza mais de 24,5 milhões de veículos tanto leves (carros e motos) quanto pesados (ônibus e caminhões), sendo 40% da frota automotivo do país (DETRAN-SP 2011). Veículos pesados representam 59% das emissões de NO_x. Já carros e motos são responsáveis por uma parcela menor, porém são grandes fontes de hidrocarbonetos, representando cerca de 60% de suas emissões (DETRAN-SP 2014). Esta alta porcentagem é em grande parte devido à idade da frota. Veículos mais velhos tendem a emitir mais COV por não apresentarem tecnologias de redução da emissão desses poluentes (CETESB 2012). Sob este cenário, em 2012 foi assinado um decreto estadual que oferece um incentivo financeiro à renovação da frota de veículos. Ainda neste ano, foram estabelecidos limites máximos de emissões veiculares mais restritos. Estes decretos complementam o Programa de Controle de Poluição Veicular (PROCONVE), que foi baseado na experiência internacional dos países desenvolvidos.

Políticas e estratégias de gestão ambiental como estas são necessárias para a redução da emissão dos precursores de O₃. Ashmore *et al.* 2006 apresentam uma previsão global para as concentrações mundiais de O₃ baseadas em um cenário de legislação vigente. Considerando a adoção de medidas eficazes de controle dos precursores do poluente e o desenvolvimento econômico individual dos países, os autores previram resultados favoráveis em menos de 30 anos, principalmente no hemisfério sul com um decréscimo de 3 ppb/ano, e em escala menor no hemisfério norte (1 ppb/ano). Por outro lado foi previsto um quadro de piora em algumas regiões asiáticas (acrécimo aproximado de 5 ppb/ano).

As altas concentrações de O₃ troposférico, somadas ao risco que ele representa à saúde humana e à vegetação, tem motivado estudos em diversos países com os objetivos de determinar os limites de concentração desse poluente que não devem ser superados de modo a garantir a integridade dos seres vivos (níveis críticos) e estabelecer estratégias de redução da poluição que evitariam a superação dos níveis críticos (UNECE 2007). Nível crítico é definido como a concentração limite acima da qual ocorrem efeitos deletérios nos receptores sensíveis (UNECE 1988).

Segundo Pleijel *et al.* (2002), a evolução dos índices empregados no estabelecimento de níveis críticos passou por três etapas, com os primeiros índices sendo baseados em concentrações médias, depois em concentrações acumuladas acima de um limite (AOT, *Accumulated exposure Over a Threshold*) e, por fim, na dose absorvida de O₃ por via estomática (AFst, *absorbed stomatal flux*).

Os índices de exposição baseados em concentrações médias foram adotados nos EUA e Europa no final da década de 1980, utilizando a média de 24 h. 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 próximas à zero, passou-se a utilizar médias de 7, 10 ou 12 h, conforme o regime das concentrações (EPA 2006). A CETESB, agência ambiental paulista, utilizava até 2013 médias horárias para identificação da máxima horária por dia e cálculo da média das máximas de meses e anos e identificação da máxima concentração horária do ano. A partir de 2013 utiliza-se a média de 8 horas consecutivas. Nos EUA utiliza-se a média do período de 7h em que são registradas as maiores concentrações diárias (EPA 2006).

O problema mais importante dos índices baseados em médias é não distinguir as diferentes distribuições da concentração e assumir que todas as concentrações incluídas na média têm um mesmo efeito sobre as plantas, o que não é correto. Por isso, foram desenvolvidos índices que consideram a exposição de O₃ acumulada. A AOT40 (*accumulated ozone concentration over the threshold of 40 ppb h*, concentração acumulada de O₃ acima do limite de 40 ppb h, neste estudo traduzida para Exposição Acumulada de Ozônio – EAO40) foi proposta por Fuhrer *et al.* (1997), baseada em experimentos realizados com trigo. Este índice foi testado com espécies herbáceas e arbóreas e foram definidos valores máximos permitidos para estações de crescimento de três ou seis meses. Ainda é o índice mais empregado na Europa, tendo similares nos EUA: SUM00, SUM40 e SUM06, respectivamente, a soma de todas as concentrações horárias de O₃ (SOMA_x), a soma das concentrações superiores a 40 ppb e a 60 ppb (EPA 2006). Até 2013 a CETESB utilizava a EAO40 em termos comparativos, uma vez que não existe ainda nenhum índice de proteção à vegetação em nosso país.

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 entrada 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 sua tomada pela planta (Emberson *et al.* 2000).

Considerando que condições climáticas podem acarretar diferentes respostas das plantas dada uma mesma concentração de poluente, a utilização de métricas como a EAO40 apresenta muitas limitações e incertezas. Portanto, no ano 2000 reconheceu-se a importância de se desenvolver um índice que considere a concentração estimada de O₃ absorvida pelo vegetal,

Dose Fitotóxica de Ozônio (DFO). O índice DFO tem maior embasamento biológico, pois considera através de um modelo matemático (Deposition of Ozone for Stomatal Exchange – Deposição de O₃ por Troca Estomática – DO₃SE), os fatores ambientais que influem na condutância estomática e as resistências enfrentadas pelo poluente, desde a atmosfera até a sua absorção (UNECE 2010).

No entanto, o dano final induzido pelo O₃ irá depender do sistema antioxidante da planta que não é considerado no modelo DO₃SE. Esta é uma das limitações para o bom desempenho do índice DFO na predição de danos no tecido vegetal. Por esse motivo, estudos com o índice adotam a terminologia DFO_y (dose fitotóxica de O₃ acima do limiar y), assumindo que concentrações inferiores a esse limiar serão neutralizadas pelo sistema antioxidante. Segundo Musselman *et al.* (2006) o DFO_y pode ser descrito como a dose efetiva de O₃ ou fluxo efetivo.

O primeiro trabalho com o modelo DO₃SE foi desenvolvido por Emberson *et al.* 2000. Os autores mapearam o fluxo estomático para a Europa e compararam com o mapeamento da EAO40, utilizando duas espécies da região que são sensíveis ao O₃. Os mapeamentos foram distintos, indicando que algumas políticas públicas para locais com baixa EAO40 poderiam não ser adequadas à vegetação local, expondo-a a possíveis riscos.

Desde então, pesquisas vêm comparando a capacidade preditiva dos diferentes índices quanto às respostas dos vegetais. Como resultado, o DFO tem explicado melhor as variações dos danos induzidos pelo O₃. Apesar de seu bom desempenho, o DFO deve estar sobre constante refinamento com a inclusão ou retirada de novas funções, para que suas estimativas sejam cada vez mais precisas e confiáveis (Matyssek *et al.* 2007). Assim, pesquisas com o índice tem calibrado o modelo DO₃SE para diferentes espécies de arbóreas, herbáceas e cultivos, com o objetivo de estabelecer níveis críticos baseados na dose absorvida de O₃ por espécies de interesse (Emberson *et al.* 2000, Musselman *et al.* 2006, Alonso *et al.* 2007, Emberson *et al.* 2007, Karlsson *et al.* 2007, Gerosa *et al.* 2008, entre outros). Recentemente, oito níveis críticos foram revisados e atualizados para espécies agrícolas e florestais e de vegetação semi-natural (Mills *et al.* 2011, UNECE 2010).

O modelo tem ganhado importância no cenário mundial, inclusive no auxílio à adoção de políticas públicas para a vegetação e a saúde humana. Recentemente, no Reino Unido o modelo DO₃SE foi utilizado com o propósito de auxiliar os estudos dos efeitos induzidos pelo O₃ sobre a saúde humana. Os autores verificaram claramente a importância da capacidade de absorção de O₃ pela vegetação na determinação do risco à saúde humana, uma vez que ao retirar o poluente do ar, a vegetação pode reduzir consideravelmente o número de mortes por problemas respiratórios (Emberson *et al.* 2013).

No Brasil, não há nenhum tipo de índice de proteção à vegetação contra os efeitos induzidos pelo O₃. O padrão de qualidade do ar utilizado pela CETESB tem como objetivo a proteção da saúde humana, sendo baseado no proposto pela Organização Mundial da Saúde. Em São Paulo, as condições meteorológicas são favoráveis à formação do O₃ durante praticamente o ano todo e diversos estudos indicam que suas concentrações atingem níveis fitotóxicos (Pina & Moraes 2007, Sant'Anna *et al.* 2008, Souza *et al.* 2009, Pina & Moraes 2010, Dafré-Martinelli *et al.* 2011, Dias *et al.* 2011, Moraes *et al.* 2011, Moura *et al.* 2014a). Ainda assim, estudos que objetivam estabelecer métricas baseadas na absorção do poluente por espécies nativas da região são inexistentes. Recentemente o modelo DO₃SE foi testado para a cultivar de goiabeira, e foi considerado aplicável as condições ambientais da cidade de São Paulo (Assis *et al.* 2015). Estudos com espécies arbóreas nativas contribuem para o conhecimento da aplicabilidade do DO₃SE no Brasil.

Assim a pergunta a ser respondida por este estudo é: o DFO se correlacionará mais fortemente com as manifestações de injúrias foliares e da abscisão foliar do que os índices baseados na concentração acumulada de ozônio (AOT40, SOMA00 e SOMA06)? A hipótese é que sim, pois os estômatos são a principal via de entrada para o ozônio e a sua atividade é modulada por fatores ambientais (temperatura, luz, déficit de pressão de vapor, umidade do solo), que favorecerão a uma maior e menor absorção do poluente e são considerados no modelo DO₃SE.

2. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de se estabelecer métricas que representem o risco imposto pelo O₃ à vegetação, o presente estudo objetiva:

1. Testar a capacidade preditiva do modelo de fluxo estomático de O₃ - DO₃SE - para a espécie tropical *Astronium graveolens*;
2. Comparar a capacidade preditiva entre o modelo de fluxo e as métricas baseadas em concentração acumulada de O₃ (EAO40, SOMA00 e SOMA06).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

A Região Metropolitana de São Paulo está localizada na Bacia do Alto Tietê, a cerca de 760 m de altitude. Possui área de 8.051 km² e é composta pela cidade de São Paulo e mais 38 municípios (CETESB 2010). Seu clima é caracterizado por apresentar verão chuvoso e inverno seco com precipitação anual de aproximadamente 1900 mm e temperatura média anual de 19,3°C. Durante o inverno, formações de alta pressão produzem frequentes inversões térmicas, desfavoráveis à dispersão de poluentes (Castanho 1999, Silva Jr. & Andrade 2013). Como agravante, a capital apresenta um alto potencial de formação de ozônio, uma vez que há grande emissão de precursores, principalmente de origem veicular (CETESB 2013).

O estudo foi realizado na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira (23°33'58''S, 46°43'53''W), zona oeste da capital paulista, no Fitotério do Instituto de Biociências. Este local é próximo a uma estação de monitoramento de qualidade do ar da CETESB que monitora ininterruptamente as concentrações de O₃, NO e NO₂. Desde 2007, quando a estação foi instalada, tem sido registradas altas concentrações de O₃ neste local, com frequentes ultrapassagens do padrão nacional de qualidade do ar (160 µg m⁻³ ≈ 79 ppb), estabelecido pela Resolução CONAMA nº 03/90, e do padrão de atenção (200 µg m⁻³ ≈ 102 ppb) determinado pela legislação estadual de São Paulo (CETESB 2013). Com relação ao NO₂, o padrão de qualidade do ar (260 µg m⁻³ ≈ 131ppb) foi ultrapassado apenas nos anos de 2010 e 2011. Nos demais, as concentrações máximas tenderam a não ultrapassar 200 µg m⁻³, sendo a menor máxima registrada no ano de 2013 (140 µg m⁻³).

3.2 Espécie estudada

Astronium é uma Anacardiaceae e compreende 23 espécies cuja ocorrência se estende do México até o Paraguai. *Astronium graveolens* Jacq., conhecida popularmente como guaritá, é uma espécie secundária inicial que pode atingir de 15 a 25 m de altura e de 40 a 60 cm de diâmetro (Lorenzi 2002, Ribeiro *et al.* 2005). No Brasil é amplamente distribuída, ocorrendo desde o sul da Bahia, nas formações florestais do complexo atlântico, até a região Sul do país, na floresta latifoliada semidecidual (Barkley 1968). Nos fragmentos florestais da região sudeste é uma das espécies com maior valor de importância devido sua grande ocorrência, sendo por isso muito empregada na recuperação de ecossistemas perturbados (Hiram 2010).

A floração ocorre do início do inverno ao início da primavera. Seu fruto é seco, com cálice persistente para auxiliar na dispersão (Santin 1989). A produção anual de sementes é bastante considerável e a dispersão é do tipo anemocórica (Salomão & Leite 1992). As folhas de *A. graveolens* são compostas por 4 a 7 pares de folíolos; são dotadas de um cheiro característico e de elevada concentração de metabólitos secundários (Rodriguez-Burbano *et al.* 2010, Hernandez *et al.* 2013).

Sua importância comercial deve-se principalmente ao uso da madeira. No entanto, estudos recentes tem investigado a aplicabilidade da espécie na indústria farmacêutica devido a seu alto potencial antioxidante, atribuído à presença abundante em suas folhas de flavonóides e derivados do ácido gálico (Barbosa *et al.* 2011).

3.3 Cultivo e exposição

Indivíduos jovens de *A. graveolens* com cerca de 30 cm de altura, foram obtidos em viveiro de espécies nativas, localizado em Ibaté (SP). As mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 4,5 L, utilizando como substrato a mistura de casca de *Pinus* Plantmax (Eucatex) e vermiculita fina na proporção 3:1. Em seguida, permaneceram em casa de vegetação com ar filtrado por aproximadamente um mês para a total recuperação pós-transplante. Neste período as plantas receberam irrigação adequada e foram adubadas mensalmente com 100 mL de solução nutritiva de NPK (10:10:10).

O modelo de exposição das plantas foi adaptado do proposto por Arndt & Schweizer (1991). Em um suporte metálico de aproximadamente 1,2 m de altura foram colocadas duas caixas plásticas preenchidas com água, sobre as quais se apoiou uma grade de arame galvanizado coberta por um filme de plástico escuro e por placas de isopor com 5 cm de espessura com buracos em que foram encaixados os vasos (**figura 2**); isto garantiu a sustentação dos vasos e evitou a proliferação de algas e larvas. Além disso, os vasos possuíam cordas de náilon inseridas em sua base, de modo que uma das extremidades da corda estava em contato com a água das caixas enquanto a outra em contato com o solo e as raízes da planta, garantindo assim uma irrigação contínua por capilaridade (VDI 2003). O posicionamento dos suportes em campo foi estabelecido com bússola para padronizar a insolação das plantas. Uma radiação intermediária mais adequada à espécie, conforme definido em testes prévios, foi proporcionada com o uso de sombrite 35%.

As plantas foram divididas em dois lotes, cada um com vinte indivíduos. Um lote foi exposto na área de estudo enquanto o outro foi mantido em casa de vegetação com filtrado para obtenção de resultados sob concentração de O₃ próximas a zero.

Foram realizadas quatro exposições com duração de três meses cada, com início em janeiro/2013 e término em fevereiro/2014 (**1ª exposição:** 21/01/2013 a 22/04/2013; **2ª exposição:** 25/04/2013 a 21/07/2013; **3ª exposição:** 23/07/2013 a 21/10/2013 e **4ª exposição:** 13/11/2013 a 14/02/2014).



Figura 2. **A.** Casa de vegetação onde as plantas foram cultivadas no Instituto de Botânica; **B.** detalhes de mudas de *A. graveolens*; **C.** modo de exposição no campo.

3.4 Condições meteorológicas e concentração de ozônio

No campo, os dados de temperatura do ar (°C), umidade relativa do ar (%), precipitação pluviométrica (mm), radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e velocidade do vento (m s^{-1}) foram monitorados pela equipe executora do projeto com uma estação meteorológica (WatchDog, Spectrum, IL, USA) instalada junto às plantas (**figura 3**). Quando ausentes, os

dados foram fornecidos pela CETESB, sendo provenientes da estação situada junto à Ponte dos Remédios na Marginal Tiête.

Os valores médios e máximos de temperatura e umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação foram coletados a cada 10 minutos por sensores conectados a um registrador de dados. Para os valores de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), foram coletados dados do IAG situado no PEFI. Os valores foram multiplicados por um fator de atenuação exercido pelos vidros da casa de vegetação e o sombrite. 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 de 14%.

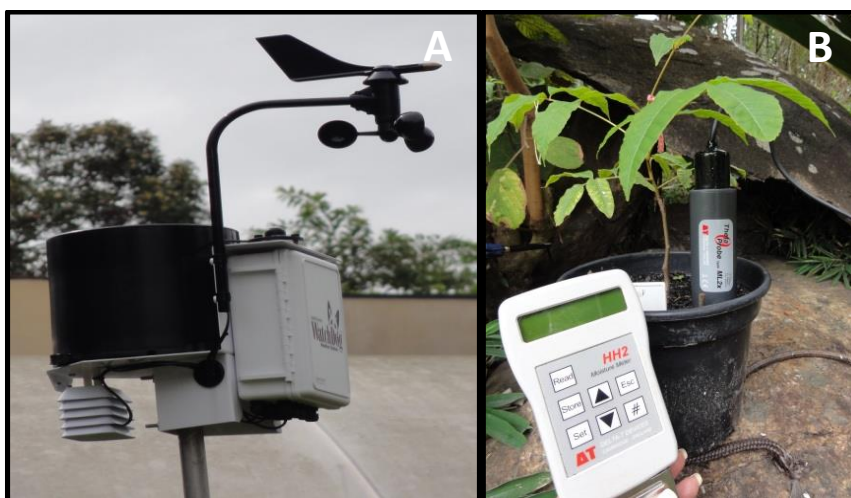


Figura 3. A. Estação meteorológica instalada no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo; **B.** medição da umidade relativa do solo pelo método TDR.

Para o cálculo da Dose Fitotóxica de Ozônio (DFO) são necessárias médias horárias dos parâmetros ambientais durante todo o período de estudo. No entanto, a umidade relativa do solo nos vasos, foi obtida de forma manual e descontínua com um sensor TDR mini *trase* (Soilmoisture Inc., CA, USA). Os dados faltantes foram estimados através da equação obtida na análise de regressão entre a umidade do solo e a precipitação acumulada ao longo dos sete dias anteriores às medições.

As concentrações de O_3 na área de estudo foram obtidas junto à CETESB. Para cada exposição, foi calculada a concentração média e máxima de O_3 , e registrado o número de ultrapassagens do padrão de qualidade do ar nacional.

3.5 Condutância estomática

Cursos diurnos (das 8:00 h às 16:00 h, horário solar) foram realizados semanalmente com um analisador portátil de gases por infravermelho (LI-6400XT, LI-COR, NE, USA) operando em condições ambientais de temperatura, umidade relativa do ar e radiação fotossinteticamente ativa e concentração de CO₂ fixada em 390 ppm (**figura 4**). As medidas foram tomadas em plantas escolhidas aleatoriamente (n = 10), utilizando folhas com o limbo totalmente expandido, referentes ao 3º ou 4º nó a partir do ápice. Os dados de g_s e das condições ambientais medidas pelo analisador de gases foram utilizados na parametrização da condutância de *A. graveolens*, descrita abaixo.



Figura 4. Medição de condutância estomática em indivíduos jovens de *Astronium graveolens* Jacq. expostos no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

3.6 Modelo multiplicativo de condutância estomática

O modelo de condutância estomática utilizado neste estudo foi baseado no elaborado por Jarvis (1976) e adaptado por Emberson *et al.* (2000). Neste modelo a g_s máxima é multiplicada por fatores que modulam a resposta dos estômatos, como expresso abaixo:

$$g_{s \text{ modelada}} = g_{\max} * f_{\text{RFA}} * f_{\text{fen}} * \max\{f_{\min}, * (f_{\text{temp}} * f_{\text{DPV}} * f_{\text{US}})\}$$

onde g_{s modelada} representa a condutância estomática ao vapor de água expressa em (mmol H₂O m⁻² s⁻¹); g_{max} representa a condutância estomática máxima da espécie; f_{RFA} representa a influência da radiação fotossinteticamente ativa em g_{max}; f_{fen} representa a influência das mudanças fenológicas em g_{max}, baseada nos dias do ano (calendário juliano); f_{min} representa o

percentual da condutância estomática mínima em relação a $g_{\max}$; 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 (%) em $g_{\max}$.

3.6.1 Cálculo da condutância estomática máxima, mínima e relativa

Foram calculados os percentis acima de 95% e abaixo de 5% do conjunto de dados de condutância estomática. Em seguida, foi realizada a análise descritiva desses percentis, sendo que os valores de $g_{\max}$ e $g_{\min}$ corresponderam à média do percentil que apresentou menor dispersão de valores (desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variância). Na equação, a $g_{\max}$ é expressa em $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Já o valor de condutância estomática mínima ($g_{\min}$) é transformado em fração ($f_{\min}$) da condutância máxima ($g_{\min} g_{\max}^{-1}$).

Os dados de condutância estomática superiores e inferiores a $g_{\max}$ e $g_{\min}$ foram excluídos e, então, calculada a condutância relativa. A g_s relativa é dada pela divisão da condutância medida pela condutância máxima, sendo distribuída em valores de 0 a 1.

3.6.2 Parametrização da condutância estomática

A parametrização da g_s significa obter as funções matemáticas que melhor descrevem a relação entre g_s relativa, a fenologia e as variáveis ambientais a serem utilizadas no modelo (temperatura, déficit de pressão de vapor, radiação fotossinteticamente ativa e umidade do solo). As funções foram calculadas segundo UNECE (2010), com exceção da f_{DPV} que foi estabelecida pela interação dos demais parâmetros.

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

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

onde, “ e ” se refere ao número de Euler, constante igual a 2,71, indicando a função exponencial de base e ; “RFA” é a radiação fotossinteticamente ativa; e “ α ” é o coeficiente de inclinação da reta que define a curva de g_s em relação a RFA.

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

$$f_{\text{temp}} = [(T - T_{\min}) / (T_{\text{otm}} - T_{\min})] * [(T_{\max} - T) / (T_{\max} - T_{\text{otm}})]^{b_t}$$

onde, “T” é a temperatura do ar em °C, “T_{min}” e “T_{max}” 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:

$$bt = (T_{\max} - T_{otm}) / (T_{otm} - T_{\min})$$

• Função para o umidade do solo (f_{US}):

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

$$y = -0,327x + 1,8917$$

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

$$f_{US} = \min\{ 1, \{f_{\min}, ((1-f_{\min})*(US_{\min}-US) / (US_{\min}- US_{\max})) + f_{\min}\} \}$$

• Função fenologia (f_{feno}):

Quando $A_{\text{início}} \leq DA < (A_{\text{início}} + fDA_c)$

$$fDA = (1-fDA_a) * [(DA-A_{\text{início}}) / fDA_c] + fDA_a$$

Quando $(A_{\text{início}}+fDA_c) \leq DA \leq (A_{\text{final}}-fDA_d)$

$$fDA = 1$$

Quando $(A_{\text{final}} - fDA_d) < DA \leq A_{\text{final}}$

$$fDA = (1 - fDA_b) * [(A_{\text{final}} - DA) / fDA_d] + fDA_b$$

onde “DA” é o dia do ano; “A_{início}” e “A_{final}” são os dias do ano para o início e fim do período de exposição ao ozônio, respectivamente; “fDA_a” e “fDA_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 “fDA_c” e “fDA_d” são parâmetros específicos da planta que descrevem a forma da função.

O ajuste destas funções define um ou mais atributos, os parâmetros, que serão utilizados nos modelos de g_s (condutância modelada) e do fluxo (DFO), como: a temperatura mínima ($T_{\min}$) e máxima ($T_{\max}$) 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 ($DPV_{\max}$) e mínima ($DPV_{\min}$) e os valores de umidade do solo em que a condutância é máxima ($US_{\max}$) e mínima ($US_{\min}$); o valor do ângulo de inclinação da reta que define a relação entre g_s e RFA (coeficiente α); além do perfil da condutância estomática de *A. graveolens* ao longo do ano.

3.6.3 Condutância modelada ($g_{s \text{ modelada}}$)

Com os parâmetros definidos, estimou-se para cada hora o impacto das variáveis ambientais em g_s , sendo estes expressos em termos de seu efeito relativo em $g_{\max}$ (escalonados de 0 a 1). Por fim, foram obtidos dados horários de condutância estomática modelada ao vapor de água.

3.7 Dose fitotóxica de ozônio

A dose fitotóxica de ozônio (DFO) por unidade de área foliar ($\text{nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi estimada utilizando-se o modelo DO_3SE (Deposition of Ozone for Stomatal Exchange – Deposição de Ozônio por Troca Estomática, Emberson *et al.* 2000), representado pela seguinte equação:

$$\text{DFO} = c\text{O}_3 * g_{s\text{modelada}} * \text{DO}_3/\text{H}_2\text{O} * rc/rb + rc$$

onde $rc = 1/g_{s\text{modelada}} \text{ O}_3 + g_{\text{ext}}$; $rb = 11,7 \text{ s m}^{-1}$, $g_{\text{ext}} = 0,0004 \text{ m s}^{-1}$, $c\text{O}_3$ = concentração média horária de O_3 ; “ rc ” é a resistência da superfície foliar (resistência estomática); “ g_{ext} ” é a condutância foliar cuticular e “ rb ” é a resistência da camada limite, que leva em consideração a velocidade média horária do vento e a dimensão média da folha. Esses valores foram calculados com base na diferença entre a difusividade do vapor de água e de O_3 na atmosfera; $\text{DO}_3/\text{H}_2\text{O} = 0,663$ (Massman 1998).

Adiante, obteve-se a DFO (mmol m^{-2}) para cada semana em que foram realizadas medidas das variáveis–resposta e para todo o período de exposição. Todas essas equações e suas constantes são apresentadas em UNECE (2010).

3.8 Índices de concentração acumulada de ozônio

A partir das médias horárias de O₃, três índices de concentração acumulada foram calculados. A EAO40 (concentração acumulada de O₃ acima de 40 ppb), que representa a soma dos valores horários excedentes a 40 ppb durante o período de luz; a SOMA0, que é a soma de todas as concentrações horárias de ozônio registradas em um determinado período de experimento e a SOMA06, definida como a soma das concentrações horárias acima de 60 ppb.

3.9 Variáveis-resposta

3.9.1 Senescência foliar

No início do experimento folhas totalmente expandidas foram numeradas com fitilhos de cor laranja e as mais novas foram marcadas com fitilhos azuis. Semanalmente contou-se o número de folhas que apresentaram seus folíolos totalmente caídos. Isto foi feito tanto nas plantas expostas em campo quanto nas mantidas em casa de vegetação com ar filtrado, para avaliar uma possível ação do ozônio na aceleração da senescência foliar.

3.9.2 Injúria foliar

A avaliação das injúrias foliares visíveis foi realizada semanalmente com o auxílio de uma lupa (aumento de 10x). Os critérios utilizados para classifica-las como induzidas pelo ozônio foram baseados na literatura de referência (Innes *et al.* 2001 *apud* Novak *et al.* 2003, Sanz *et al.* 2002) e em estudos anteriores realizados com a espécie (Cassimiro 2012, Moura 2013, Moura *et al.* 2013). Folhas com injúrias, mas que apresentavam sinais da presença de patógenos e/ou insetos, foram encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisas em Anatomia do Instituto de Botânica, onde foi feita a validação dos sintomas pela bióloga Francine F. Fernandes.

De modo geral, as injúrias foliares em *A. graveolens* se manifestam como pequenas pontuações escuras intervenais rodeadas por cloroses, que surgem inicialmente em folhas mais velhas e atingem primeiramente a superfície abaxial (Moura 2013, Moura *et al.* 2014b). Com esses dados, foram calculados os índices de incidência e severidade e a porcentagem de área foliar ocupada pelos sintomas. Segundo Chappelka *et al.* (1997), a incidência é o número de indivíduos com sintomas foliares em porcentagem do número total de indivíduos e

severidade é o número de folhas com danos em porcentagem do número total de folhas das plantas que possuem danos.

As folhas foram classificadas conforme a área coberta por injúrias em intervalos de 1 – 5 % (classe 1), 6 – 25 % (classe 2), 26 – 50 % (classe 3), 51 – 75 % (classe 4) e 76 – 100 % (classe 5). Com os dados das classes foi calculado o Índice de Injúria Foliar (IIF), adaptado de El-Khatib (2003) por Furlan *et al.* (2007):

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

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

3.10 Análise estatística

Para determinar as funções matemáticas foi empregada a técnica das “*curvas envolventes*” (Schmidt *et al.* 2000, Gonzales-Fernandez *et al.* 2010), em que os valores de cada variável ambiental e da gs relativa são organizados em classes de frequências. Para cada classe calcula-se o percentil 99, obtendo-se “boundary points” que definem a curva a ser ajustada. Assim, a modelagem torna-se menos dependente de *outliers* que poderiam representar medições de qualidade duvidosa.

Para verificar a força do modelo em prever as variações na gs de *A. graveolens*, foi realizada uma análise de regressão entre a condutância medida e a modelada. Em seguida, foram determinados os coeficientes de correlação R e de determinação R². O nível de significância estatística adotado foi $p > 0,05$.

Os resultados de condutância modelada e medida foram comparados por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para verificar a capacidade preditiva dos índices foi feito uma análise de regressão linear entre as variáveis-explicativas (DFO, EAO40, SOMA00 e SOMA06) e as variáveis-respostas (IIF, índice de incidência e severidade e senescência foliar).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições meteorológicas e concentração de ozônio

4.1.1 Ar Ambiente

No período de estudo, as condições meteorológicas e as concentrações de ozônio, apresentaram um perfil anual característico da RMSP. Na **figura 5**, as variações mensais de precipitação e temperatura apontam uma sazonalidade marcada pela existência de duas estações, uma seca com temperaturas amenas (maio a setembro) e outra, úmida e quente (outubro a abril).

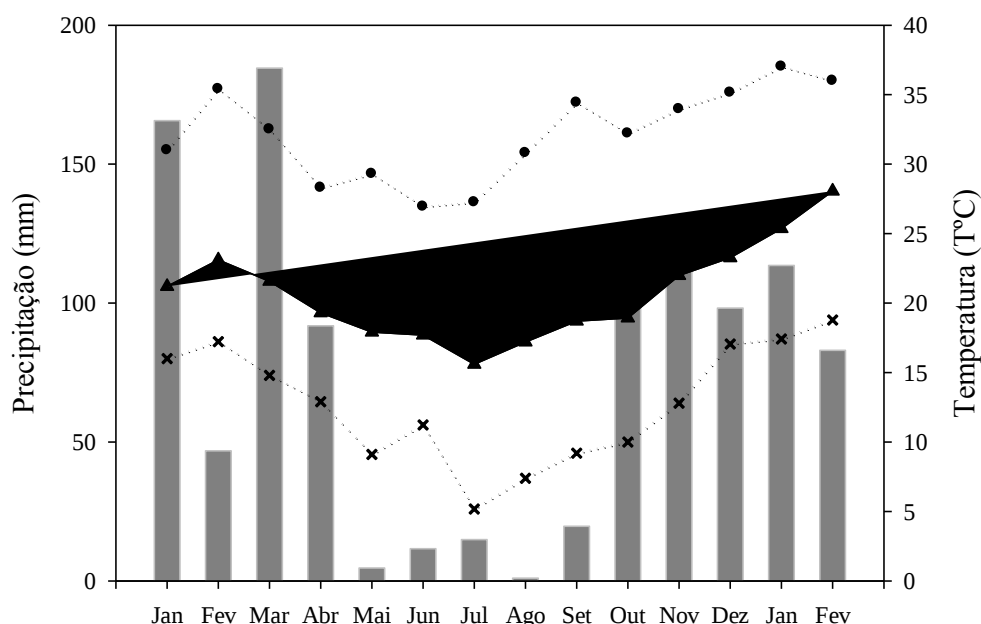


Figura 5. Médias (—▲—), máximas (··●··) e mínimas (··✕··) mensais de temperatura do ar, em °C, e volume de precipitação, em mm, registrados no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, durante o período de estudo (janeiro/2013 a fevereiro/2014).

A temperatura média foi mais elevada nos períodos chuvosos, com as maiores máximas atingidas nos meses de fevereiro/2013 e janeiro/2014 (36 - 37°C). Na estação seca, houve uma maior amplitude térmica (mínima de 5°C e máxima de 34°C), principalmente devido às baixas temperaturas registradas no mês de julho (média 15°C). De modo geral, durante o período de estudo as médias mensais foram mais altas que a média histórica (1933-2013) (IAG-USP, 2013). Já o total de chuva acumulada ficou abaixo da média climatológica anual (1419 mm),

sendo os meses de maio (4,7 mm, 96% abaixo da média climatológica) e agosto (0,8 mm, 94% abaixo da média climatológica) os mais críticos do ano.

Uma sequência de dias sem chuva no mês de agosto ocasionou a menor umidade relativa do ar registrada, em torno de 14%. A umidade relativa máxima foi praticamente constante ao longo do ano. Assim, o aspecto sazonal foi dado pelos valores de médias e mínimas, que foram menores na estação seca (**figura 6**).

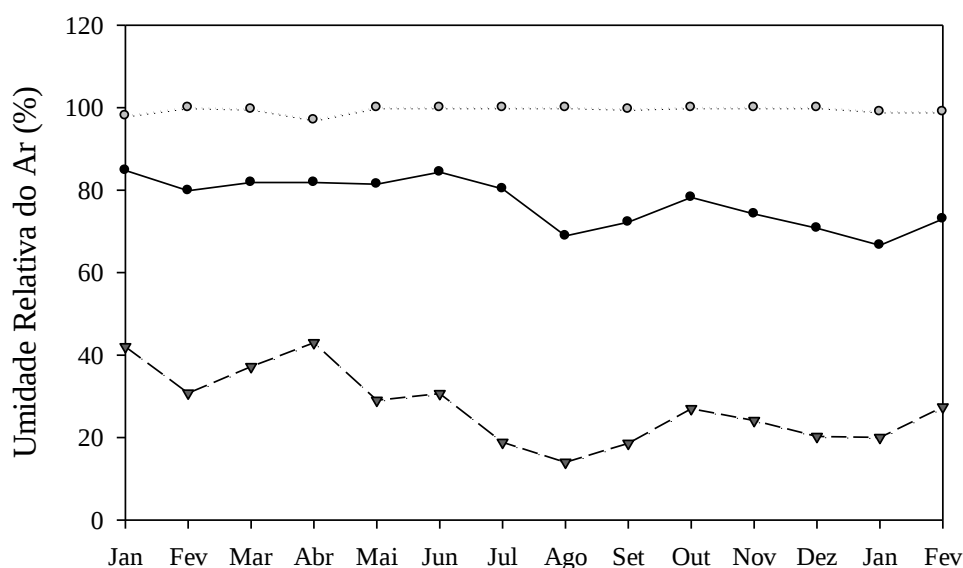


Figura 6. Médias (—●—), máximas (·○·) e mínimas (·▼·) mensais de umidade relativa (UR) do ar, em %, registrados no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, durante o período de estudo (janeiro/2013 a fevereiro/2014).

O período seco também compreendeu os menores valores de radiação fotossinteticamente ativa, com média mais baixa no mês de junho ($160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As médias mais altas (entre 427 e $677 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram durante a estação úmida, período em que também ocorreram as maiores concentrações de ozônio (**figura 7**).

As médias mensais de O_3 no período das 8 às 18 h se mantiveram em torno de 31 ppb e as máximas em 100ppb. Apesar das concentrações tenderem a ser menores no período seco, foi observado picos de ozônio nos meses de agosto e setembro (78 e 110 ppb). Neste período, as condições de temperatura e radiação elevada somada a baixa ocorrência de chuvas, proporcionaram uma maior formação do poluente (CETESB 2013).

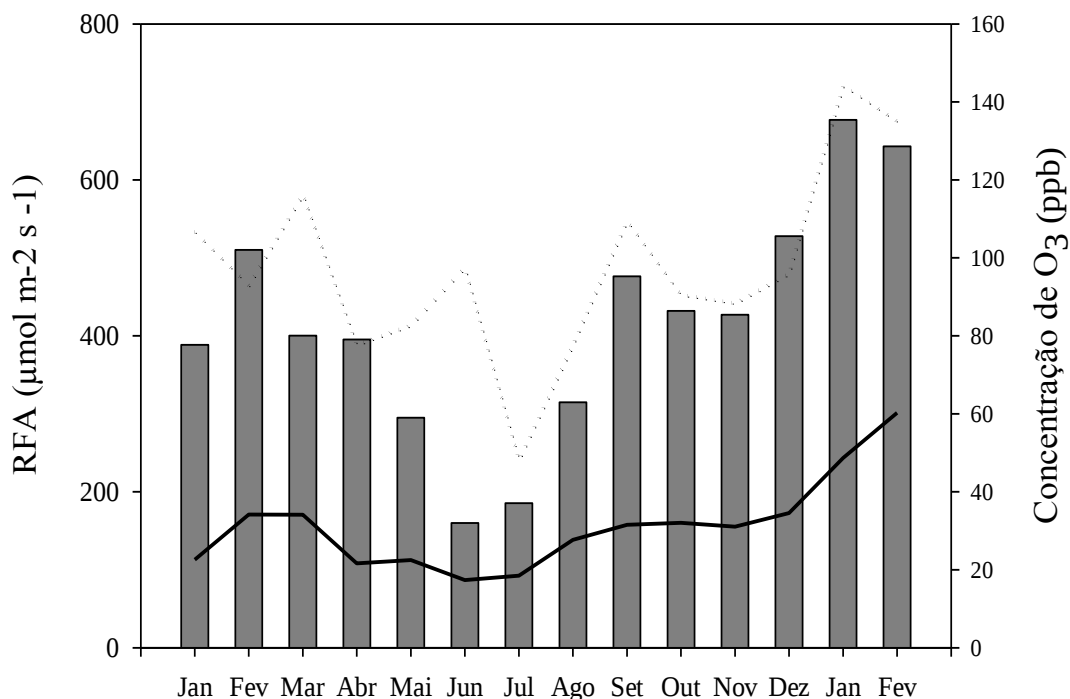


Figura 7. Médias mensais de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (■) e concentrações médias (—) e máximas de ozônio (· · ·) das 8h-18h, em ppb, registrados no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, durante o período de estudo (janeiro/2013 a fevereiro/2014).

A ocorrência de chuvas torna a atmosfera instável, o que favorece a dispersão e remoção dos poluentes. Os dias excessivamente secos podem provocar períodos de grande estabilidade atmosférica, circunstância recorrente no inverno da capital paulista. De acordo com CETESB (2013), a maior parte dos dias desfavoráveis à dispersão dos poluentes ocorreu justamente na estação seca, devido ao número de episódios de inversões térmicas e consequente calmaria. É neste período de inverno, que as maiores concentrações de poluentes primários costumam ocorrer. Já o perfil anual do ozônio é diferente dos demais, pois sua formação é decorrente de reações fotoquímicas dependentes da alta intensidade luminosa.

Considerando a distribuição de ozônio ao longo do ano, não foi possível identificar uma sazonalidade clara. Na RMSP as concentrações de ozônio tendem a ser mais altas durante a primavera-verão, mas neste ano as diferenças entre estações foram mais suaves. Isto pode ser resultado das condições favoráveis a sua formação que ocorreram tanto na estação seca quanto na úmida. Estas condições são peculiares de regiões tropicais, como temperaturas elevadas e alta incidência de radiação solar ao longo do ano. Em regiões temperadas, períodos chuvosos são relacionados com a redução das concentrações de ozônio (Blum *et al.* 1997, Blum & Didyk 2006, Pudasainee *et al.* 2006). No entanto, as chuvas de verão em São Paulo

são concentradas no final da tarde, o que permite que o ozônio seja formado durante as horas anteriores e que suas concentrações sejam altas mesmo na estação úmida. Estes fatos sugerem que a influência do ozônio na vegetação tropical, pode ocorrer durante o ano todo, diferente das florestas de clima temperado, onde as concentrações de ozônio no verão são mais altas que no inverno devido a redução da temperatura e da radiação (Emberson *et al.* 2003, Castell-Balaguer *et al.* 2012).

Neste estudo, plantas jovens de *Astronium graveolens* foram expostas às condições ambientais nas diferentes estações do ano (**figura 8**).

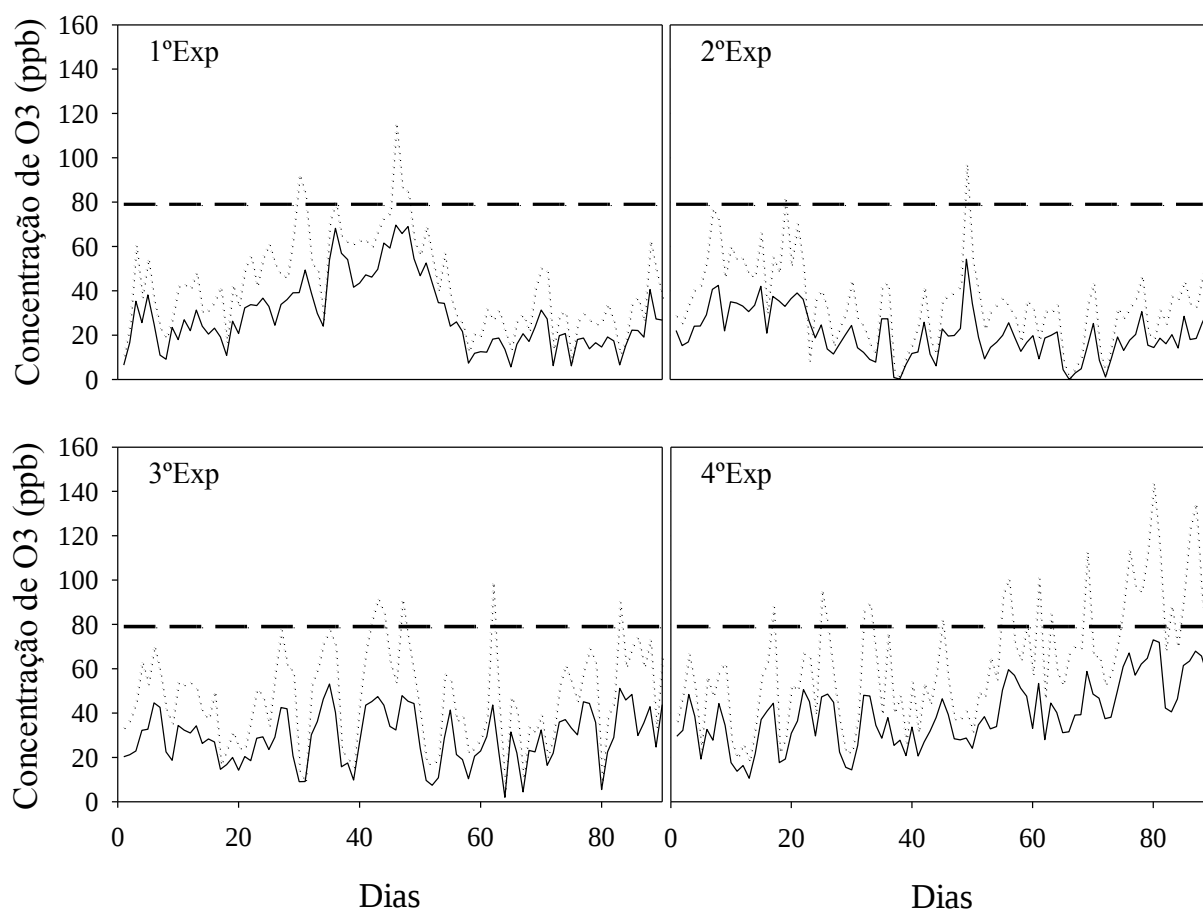


Figura 8. Concentrações máximas (.....) e médias (—) de ozônio (ppb) no período de luz (8 às 18 h), durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, São Paulo, SP. A linha tracejada indica o padrão de qualidade do ar estabelecido pelo CONAMA 03/90, de ≈ 80 ppb.

A 1ª exposição abrangeu o verão de 2013, no qual as plantas foram submetidas a picos de ozônio nos meses de fevereiro e maio, quando a máxima de 116 ppb foi registrada (**figura 8**). Com a entrada do outono, as concentrações caíram gradativamente. Na 2ª exposição, o padrão de qualidade do ar nacional foi ultrapassado 4 vezes e a concentração de ozônio se manteve mais constante. Em agosto houve vários dias com condições desfavoráveis à dispersão de poluentes, por isso, neste período (3ª exposição) houve 13 ultrapassagens do padrão de qualidade do ar e a concentração máxima de ozônio foi de 99 ppb. Por fim, as plantas da 4ª exposição foram expostas ao verão de 2014, período de pior qualidade do ar; com elevadas concentrações de ozônio e 67 ultrapassagens do padrão nacional.

Deve-se ressaltar, que as plantas do presente estudo foram expostas na cidade de São Paulo. Contudo sabe-se que as concentrações de ozônio em áreas rurais são mais elevadas que em centros urbanos (Paolletti 2009, Bermejo *et al.* 2010, Calfapietra *et al.* 2013). Assim, é possível que os fragmentos florestais circundantes à RMSP estejam sujeitos a maiores concentrações de O₃ do que as registradas na Cidade Universitária.

4.1.2 Ar filtrado

Na casa de vegetação, as médias mensais de temperatura variaram entre 19 e 25 °C (**tabela 1**). A maior máxima ocorreu no mês de outubro e as menores temperaturas foram verificadas no mês de julho, quando os termômetros registraram mínima de 8 °C. As plantas do campo e do ar filtrado foram expostas a condições de temperatura média e mínima similares. No entanto, as máximas na casa de vegetação foram altas em alguns dias. As médias diárias de umidade relativa do ar foram menores do que no ar ambiente, com valores frequentemente abaixo dos 80%. Quanto à radiação, as plantas no ar filtrado receberam 14% a menos de luz do que as expostas no campo.

Tabela 1. Médias, máximas e mínimas mensais de temperatura (°C) e umidade (%), registradas na Casa de Vegetação do Instituto de Botânica de São Paulo. (Durante o período de janeiro a dezembro de 2013).

	T°C média	T°C máxima	T°C mínima	UR% média	UR% máxima	UR% mínima
Jan	24	42	18	72	97	28
Fev	25	44	20	66	96	18
Mar	24	41	18	69	96	26
Abr	23	38	15	70	95	28
Mai	22	41	14	75	99	25
Jun	22	45	12	75	94	13
Jul	19	42	8	72	90	15
Ago	25	46	10	62	91	15
Set	19	34	9	74	100	19
Out	19	40	11	78	99	29
Nov	19	33	17	76	99	28
Dez	20	35	16	75	98	27

4.2 Modelo multiplicativo de condutância estomática

4.2.1 Condutância estomática

A. graveolens apresentou condutância máxima ($g_{\max}$) de 152 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, valor considerado baixo comparado aos de espécies arbóreas de regiões temperadas (180 - 432 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, Alonso *et al.* 2008, Fares *et al.* 2013, Kinose *et al.* 2014).

A $g_{\max}$ é o parâmetro mais importante do modelo, devido à sua grande influência sobre as estimativas finais do fluxo de ozônio. No entanto, é identificada como uma das principais fontes de incertezas da modelagem (Gerosa *et al.* 2012), uma vez que pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta, com a área de ocorrência e com diferenças intraespecíficas (Kolb & Matyssek 2001; González-Fernández *et al.* 2010, 2014). Por exemplo, a $g_{\max}$ estabelecida para duas cultivares do trigo (*Triticum aestivum*), variou 22% entre diversos estudos realizados na região do Mediterrâneo (González-Fernández *et al.* 2013) e, segundo estes autores, chegou a 40% de variação em estudos que compararam várias cultivares. É possível que a grande variabilidade genética da nativa *A. graveolens* tenha sido expressa em diferenças na g_s entre os indivíduos e isto pode ter enfraquecido a precisão da modelagem. Neste caso, seria necessário avaliar a condutância de indivíduos de diferentes procedências, crescendo em diferentes regimes de luz, temperatura e disponibilidade hídrica, entre outros, para se aproximar mais do padrão fisiológico da espécie, o que auxiliaria na

exclusão de dados anômalos. Cabe ressaltar, entretanto, que a coleta de dados foi intensiva, entre as maiores em estudos de fluxo estomático de O_3 .

Quase não há na literatura estudos sobre a fisiologia da espécie. Gutiérrez-Soto *et al.* (2008) descreve a gs média de *A. graveolens* variando aproximadamente entre 100-220 mmol $H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$. Estes valores são coerentes com os apresentados por Pacheco (2001), porém maiores do que as médias obtidas neste estudo (50 - 90 mmol $H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$) e por Ribeiro *et al.* (2005) ($< 100\ mmol\ H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$). Esse conjunto de estudos, entretanto, confirma que a gs de *A. graveolens* é baixa.

Dados horários distinguiram uma condutância mais alta no período da manhã, com média próxima a 100 mmol $H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$ (**Figura 9**). A partir das 10 horas a gs apresentou uma redução significativa, quando as médias de irradiância e temperatura do ar atingiram 700 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ e 29 °C, respectivamente. Ao fim da tarde, a taxa média de gs às 16 horas foi de 50 mmol $H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$, ocorrendo valores próximos à zero.

O aumento da temperatura, da radiação e do déficit de pressão de vapor nas horas centrais do dia induziu o fechamento estomático. Esta resposta dos estômatos ao ambiente é bem conhecida e relatada em diversos estudos ecofisiológicos (Emberson *et al.* 2000, Franco & Lüttge 2002, Prado *et al.* 2004). Para evitar a perda excessiva de água, a planta reduz a abertura estomática durante o período de altas temperaturas e consequente maior taxa de transpiração (Gerosa *et al.* 2009b). A transpiração muito alta altera a g_{max} da planta tornando as modelagens menos precisas. Por isso, este efeito foi incorporado ao modelo por alguns autores (Danielsson *et al.* 2003, 2013, González-Fernández *et al.* 2013, Azuchi *et al.* 2014, Kinose *et al.* 2014, Yamaguchi *et al.* 2014), através da inclusão da função $f_{hora\ do\ dia}$.

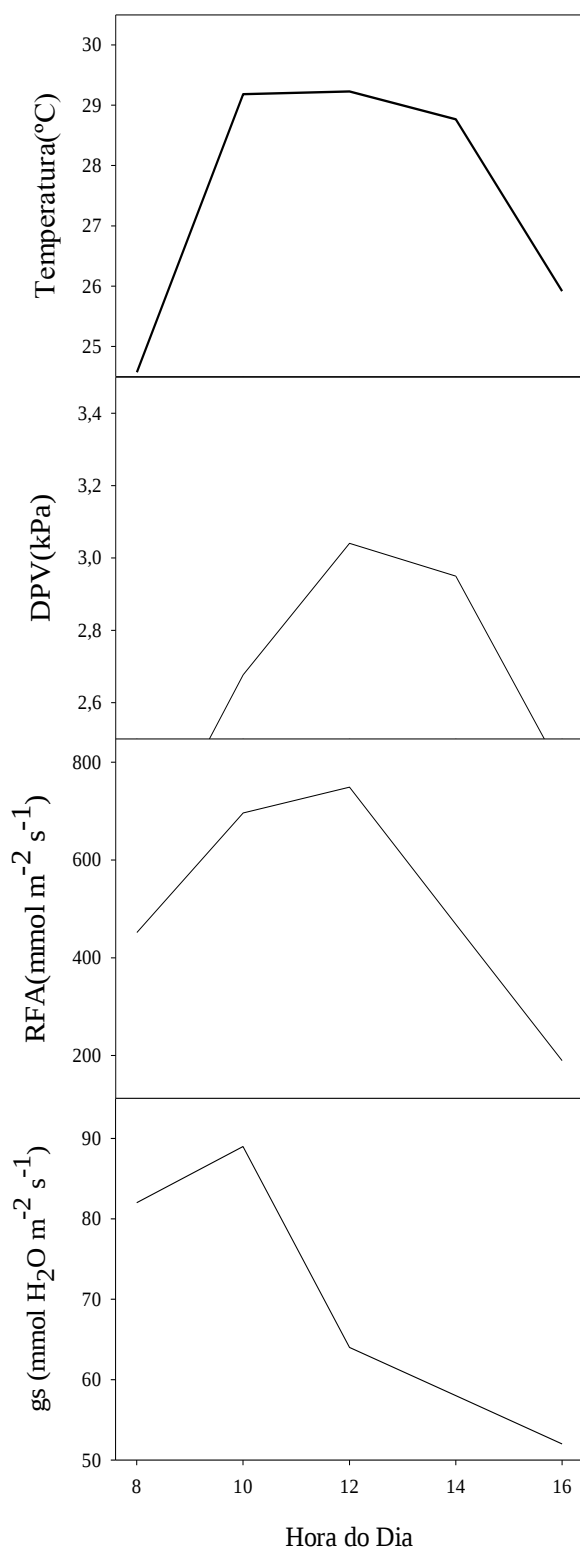


Figura 9. Médias horárias de temperatura, déficit de pressão de vapor (DPV), radiação fotossinteticamente ativa (RFA) durante o estudo e taxa de condutância estomática (gs) em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos de janeiro/2013 a fevereiro/2014, no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Danielsson *et al.* (2003) constataram ao final da tarde uma redução na condutância estomática do trigo, mesmo quando a temperatura e o DPV estavam baixos e a RFA alta o suficiente para manter os estômatos abertos. A reabertura estomática não ocorreu porque a planta perdeu água via transpiração a uma taxa maior do que foi repostada pelas raízes. Para esta hora do dia o ozônio que entrou no vegetal foi superestimado e a $f_{\text{hora do dia}}$ foi considerada um fator de correção. A inclusão desta função resultou na melhora da capacidade preditiva do modelo também em estudos mais recentes, com as espécies *Fagus crenata* e o trigo (González-Fernández *et al.* 2013, Azuchi *et al.* 2014). No entanto, o ganho ao se utilizar esta função ainda está em discussão. Alguns experimentos não apontaram influência significativa das horas do dia na gs (Kinose *et al.* 2014, Yamaguchi *et al.* 2014). Os autores discutem que para espécies onde as variações da condutância no final da tarde são explicadas pelas funções f_{temp} , f_{RFA} e f_{DPV} , o acréscimo da $f_{\text{hora do dia}}$ pode ser redundante.

Neste estudo a não reabertura estomática no final da tarde, pode não ter sido influenciada pela diferença na taxa de transpiração e absorção pela raiz, pois as plantas foram mantidas irrigadas continuamente por capilaridade. Como a função é aplicada apenas para a correção dessas últimas horas do dia e buscam-se sempre modelagens mais simples, a $f_{\text{hora do dia}}$ não foi considerada para o modelo de *A. graveolens*.

4.2.2 Parametrização da condutância estomática

As funções utilizadas foram determinadas pela técnica dos “boundary line”, com exceção da f_{DPV} que foi estabelecida pela interação desses parâmetros. Todos os valores da parametrização estão representados na **tabela 2**.

O conteúdo hídrico do solo não limitou g_{max} , pois as plantas foram mantidas bem irrigadas durante todas as exposições, por isso optou-se por não incluir a f_{US} no modelo. As temperaturas mínima (T_{min}) e máxima (T_{max}) para o fechamento estomático em *A. graveolens* foram de 13 e 40 °C e a condição ótima para gs foi 27 °C. O rendimento quântico aparente para a condutância é representado pelo coeficiente “ α ”, ele indica a eficiência entre captação de luz e condução de água através dos estômatos e seu valor foi 0,035. O déficit de pressão de vapor em que a condutância é máxima (DPV_{max}) foi de 1,1 kPa, enquanto o valor em que a condutância é mínima (DPV_{min}) foi 3,9 kPa. Considerando que no Brasil as plantas crescem ao longo de todo o ano, para obtenção da função fenologia foi estabelecido como início e fim do período de exposição ao ozônio ($A_{\text{início}}$ e A_{final} , respectivamente) o primeiro ($A_{\text{início}} = 0$) e o

último dia do ano ($A_{\text{final}} = 365$). As taxas de condutância estomática em *A. graveolens*, foram quase constantes durante o ano, com uma leve queda no 100º dia, correspondente ao começo do outono.

Tabela 2. Parametrização do modelo de condutância estomática para *A. graveolens*.

Parâmetros		Unidade	Valor
g_{max}		mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	152
f_{min}		fração	0,059
f_{temp}	T_{min}	°C	13
	T_{opt}	°C	27
	T_{max}	°C	40
f_{RFA}	α	μmol m ⁻² s ⁻¹	0,035
f_{DPV}	DPV_{max}	kPa	1,1
	DPV_{min}	kPa	3,9
f_{fen}	SGS	Dia do ano	0
	EGS	Dia do ano	365
	A	Dias	0
	B	Dias	0
	C	Dias	100
	D	Dias	198
	E	Dias	240
	F	Dias	281
	$f_{\text{fen_a}}$	fração	1
	$f_{\text{fen_b}}$	fração	1
	$f_{\text{fen_c}}$	fração	0,7
	$f_{\text{fen_d}}$	fração	1

g_{max} condutância estomática máxima; f_{min} fração $g_{\text{min}}/g_{\text{max}}$; T_{min} e T_{max} temperatura para o fechamento estomático; T_{opt} sem limitações em gs; f_{RFA} saturação da gs em resposta a radiação fotossinteticamente ativa; DPV_{max} e DPV_{min} definem o valor em que o déficit de pressão de vapor limita a gs; f_{fen} influência dos dias do ano na gs.

Em relação às variáveis ambientais, a resposta da condutância estomática foi o esperada do ponto de vista fisiológico. A resposta de g_s à temperatura foi semelhante à verificado por Gerosa *et al.* (2009a) em experimento com arbóreas na Itália, onde a maior atividade estomática ocorreu em uma faixa pequena de temperatura. Isto indica uma maior dependência da condutância a este parâmetro, ao contrário do observado para algumas espécies de clima temperado, em que a condutância pode ocorrer sob temperaturas mais extremas com grande amplitude entre máximas e mínimas (-5 e 39°C) (Buker *et al.* 2007).

Em *A. graveolens*, o déficit de pressão de vapor se tornou limitante à condutância estomática a partir de 1,1 kPa. Valor igual ao encontrado por Elvira *et al.* (2007), para *Pinus halepensis* e semelhante ao padrão de 1,0 kPa (DPV_{max}) apresentado em UNECE (2010) para espécies arbóreas decíduas. A dependência da condutância ao DPV é bastante conhecida, sendo esta relação inversamente proporcional. Quanto mais seco estiver o ar, menor será a g_s , uma vez que para evitar a perda de água, a planta mantém seus estômatos fechados. Entretanto, algumas espécies têm maior plasticidade a ambientes com ar atmosférico extremamente seco. Azuchi *et al.* (2014) e Kinose *et al.* (2014) observaram que em *Fagus crenata* a g_s ocorreu em uma faixa ampla de DPV (1,2 kPa a 12 kPa), inferindo a maior tolerância da planta a este fator ambiental. *A. graveolens* se mostrou mais sensível a valores altos de DPV (>3,9 kPa), comportamento semelhante ao da maioria das espécies perenes do mediterrâneo, com DPV_{min} de 4,0 kPa (UNECE 2010), e das decíduas faia e bétula (DPV_{min} 3,0 kPa, Buker *et al.* 2007). O contrário foi observado em espécies de regiões com grande disponibilidade hídrica, como *Carapa guianensis*, cuja condutância foi muito reduzida com DPV inferiores a 3,0 kPa (Costa & Marengo 2007).

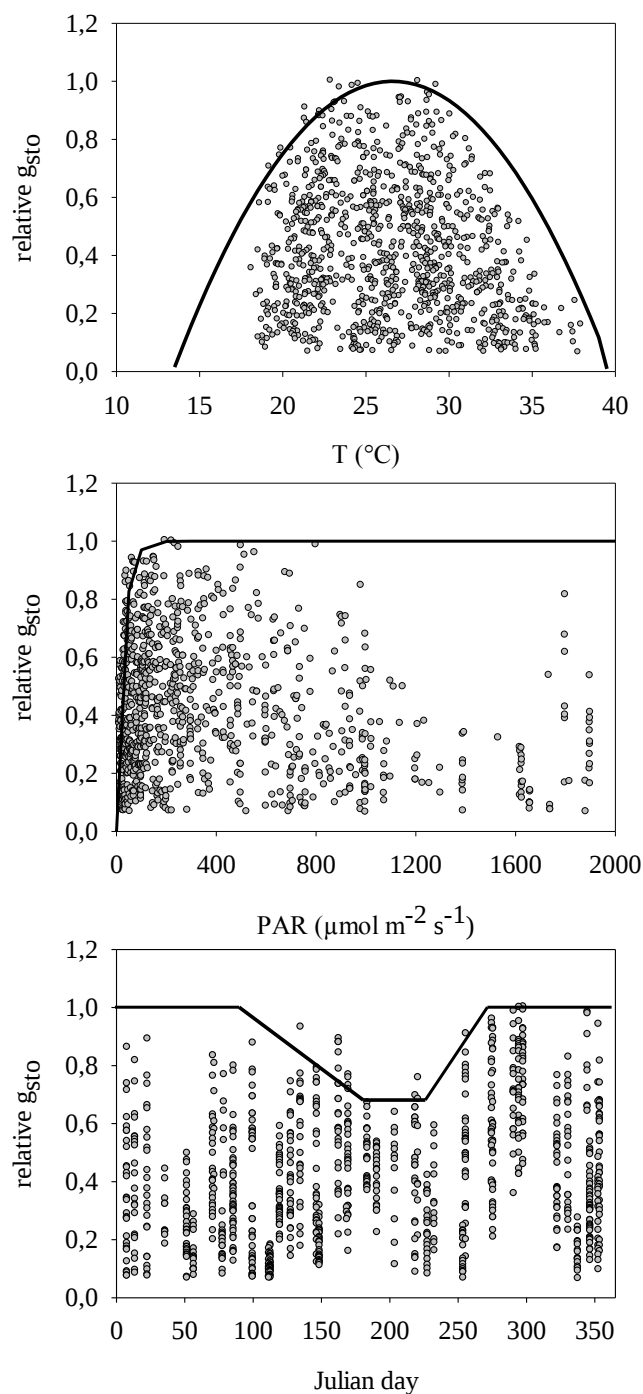


Figura 10. Funções que descrevem a dependência entre a condutância estomática relativa e a temperatura do ar (°C), a radiação fotossinteticamente ativa (RFA, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e o dia do ano em *A. graveolens*.

Segundo Heath *et al.* (2009), a g_s tende a aumentar conforme o aumento da luz até atingir um nível em que se mantém constante, mesmo recebendo mais irradiância. Estes fatos corroboram com o observado para *A. graveolens*, que atingiu sua $g_{s\max}$ a aproximadamente $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A partir deste valor a atividade estomática se manteve constante, como previsto, no entanto a alta RFA mostrou ter limitado a g_s da espécie a partir de $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este baixo intervalo de luz para a atividade estomática, pode estar relacionado com o seu grupo funcional. Espécies pioneiras e secundárias apresentam diferentes características fotossintéticas. Secundárias iniciais como a espécie *A. graveolens* (Ribeiro *et al.* 2005) podem ser mais sensíveis à alta condição de irradiância (Strauss-Debenedetti & Bazzaz 1996). Além disso, o regime de redução da luminosidade a que elas estiveram submetidas também colaborou para uma aclimação da g_s a valores menores de RFA.

A eficiência quântica do fotossistema II é facilmente afetada pelo excesso de luz, que pode causar a fotoinibição. Ribeiro *et al.* (2005) estudaram as diferenças no aparato fotossintético em espécies de pioneiras e secundárias, expostas sob radiação ambiente ($1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e em condições de sombreamento ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os autores verificaram em *A. graveolens*, fotoinibição e queda na assimilação de carbono. Espécies pioneiras, ao contrário, apresentaram aumento significativo na assimilação do carbono na mesma intensidade de luz. Como pode se observar na **figura 10** neste estudo, irradiâncias acima de $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, podem ter ocasionado fotoinibição nas plantas. Dados de fluorescência da clorofila *a* foram obtidos por integrantes do grupo de estudo, mas ainda não foram tratados.

Quanto à função fenologia, *A. graveolens* não apresentou variações sazonais marcantes em sua g_s . As funções fenológicas, que são padrão, preveem valores máximos de g_s na primavera e verão e valores mais baixos no outono e inverno (Emberson *et al.* 2000, UNECE 2010). No entanto, a espécie em estudo tem crescimento contínuo e suas folhas se fazem presentes durante a maior parte do ano, com exceção de breves períodos de troca de folhas no final da estação seca, nos quais a queda pode superar a brotação (Gutierrez-Soto *et al.* 2008). Esta característica também foi encontrada por Elvira *et al.* (2007) em estudo com o pinheiro. Os autores concluíram que para melhorar o desempenho da parametrização o período de crescimento deve ser ajustado para espécies que crescem ao longo do ano, como no presente estudo.

A f_{fen} representa a variação da g_s com relação a processos periódicos associados à sazonalidade, inclusive a senescência foliar natural. Outra função incorporada ao modelo que

é relacionada à senescência foliar é a função ozônio ($f_{\text{ozônio}}$) (Pleijel *et al.* 2007, Hoshika *et al.* 2012, Fares *et al.* 2013, Dumont *et al.* 2013, Hoshika *et al.* 2015).

Altas concentrações de ozônio podem induzir a morte celular e promover a senescência prematura (Bortier *et al.* 2000, Martin *et al.* 2001). Em locais com alta concentração do poluente, a $f_{\text{ozônio}}$ parece ser mais limitante que a f_{fen} , uma vez que pode restringir a g_s primeiro (Elvira *et al.* 2007). Para minimizar o efeito redundante destas funções, Danielsson *et al.* (2013) consideraram a $f_{\text{ozônio}}$ apenas quando seu valor relativo foi mais limitante para a planta do que a fenologia. Porém alguns autores concluem que o efeito do poluente deve ser considerado, mesmo quando a função da fenologia é incluída (Dumont *et al.* 2013).

Neste estudo a inclusão da $f_{\text{ozônio}}$ poderia melhorar o potencial preditivo do modelo, pois *A. graveolens* mostrou redução de sua atividade fotossintética quando exposta a concentrações elevadas de ozônio em condições de fumigação (Moura *et al.* 2013) e aceleração da senescência foliar em condições de campo (Cassimiro 2012). Yamaguchi *et al.* (2014), testaram a inclusão de funções que refletiam os efeitos agudo e crônico do ozônio sobre a g_s de *Oryza sativa* L. Estas funções melhoraram o modelo em 7%, o que evitou a superestimação da concentração de O_3 absorvida.

4.2.3 Condutância Modelada ($g_{s \text{ modelada}}$)

Após a parametrização da g_s de *A. graveolens*, a condutância estomática modelada ($g_{s \text{ modelada}}$) foi calculada e comparada com a condutância estomática medida ($g_{s \text{ medida}}$). A importância desta relação reside no fato da condutância ser a parte central do modelo de fluxo absorvido de O_3 . Deste modo, esta relação permite avaliar a precisão da modelagem proposta.

A condutância prevista utilizando-se a parametrização (**tabela 2**) está representada na **figura 11**. A relação entre a condutância estomática modelada e medida foi significativa ($P < 0,001$) e a regressão aponta um coeficiente de determinação (R^2) de 0,40. A intercepção 1:1 indica que o modelo superestima os valores de condutância mais baixos e subestima os mais altos.

Desde que o modelo DO_3SE foi proposto, as condutâncias estomáticas de várias espécies arbóreas e cultivos agrícolas foram modeladas. Alguns autores obtiveram boas correlações entre a g_s modelada e medida, com variações de R^2 entre 0,60 e 0,80 (Gerosa *et al.* 2009a, Azuchi *et al.* 2014, Tang *et al.* 2014). Kinose *et al.* (2014) verificaram a resposta de

algumas espécies arbóreas em câmara de fumigação e as parametrizações explicaram 50% das variações de g_s para *Fagus crenata*, 44% para *Quercus serrata* e 34% para *Betula platyphylla*. Já em modelos propostos para cultivares de brócolis e tomate, o desempenho foi menor, com a g_s medida explicando, respectivamente, apenas 31% e 35% da g_s modelada para esses cultivares.

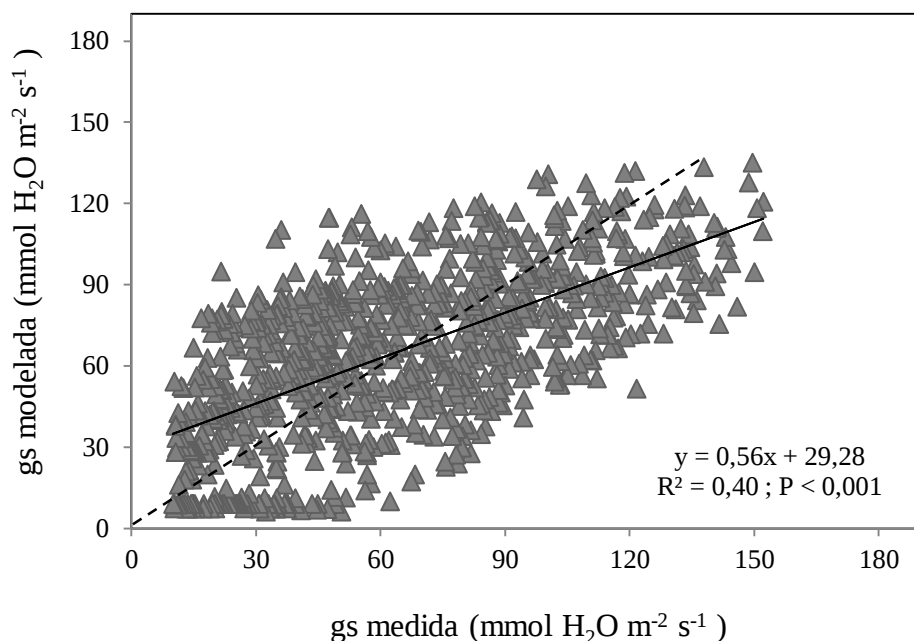


Figura 11. Análise de regressão linear entre a condutância estomática (g_s) modelada e medida em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos de janeiro/2013 a fevereiro/2014, no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Estes últimos valores são próximos aos obtidos no presente estudo, pois a parametrização de *A. graveolens* explicou 40% das variações na condutância da espécie. Embora não seja alta, essa explicabilidade é aceitável, considerando que se trata de uma primeira abordagem do modelo de fluxo com uma espécie florestal tropical. Porém são necessários mais estudos que abordem a reparametrização do modelo para *A. graveolens*.

A reparametrização é frequente e até mesmo necessária. Feng *et al.* (2012) por exemplo, trabalhou com um cultivar de trigo (*Triticum aestivum* L.), utilizando modelo feito por Pleijel *et al.* (2007). Os autores obtiveram uma resposta ao DPV mais restritiva e o fechamento estomático sob altas temperaturas foi atribuído somente ao aumento do déficit de pressão de vapor. Assim a f_{temp} foi omitida e a nova parametrização explicou 9% a mais das variações

na condutância de trigo do que o modelo inicial, que apresentou R^2 de 0,67. Cabe ressaltar, que a parametrização de cultivares do trigo, assim como de algumas espécies arbóreas, vem sendo realizada há mais de 15 anos por diversos grupos de pesquisadores de diferentes países. Esse esforço conjunto tem resultado na melhoria da parametrização do modelo de gs e, portanto, no aumento de sua precisão. Além disso, Gonzáles-Fernandez *et al.* (2013) em estudo com duas cultivares de trigo, utilizaram dados fenológicos acumulados em 30 anos de pesquisa. Assim, eles contam com um maior conhecimento da biologia das espécies e com muitas pessoas trabalhando com as mesmas espécies em diversos locais. Em situação oposta se encontram os estudos no Brasil. Com base nisso, pode-se considerar que os resultados obtidos no presente estudo foram satisfatórios.

Ainda sobre a parametrização, buscou-se verificar a importância individual que cada parâmetro exerce sobre a previsão da condutância modelada e consequentemente no R^2 , realizando-se um teste em que as funções foram excluídas uma a uma. Verificou-se que a função mais importante para o modelo foi a f_{DPV} , seguido pela f_{temp} e f_{RFA} visto que a exclusão destas funções ocasionou uma redução dos valores de R^2 de 0,40 para 0,04, 0,35 e 0,35, respectivamente. O baixo R^2 de 0,04 indica que a influência do DPV na modulação da condutância estomática (f_{DPV}) é muito importante para a modelagem.

O modelo superestimou a gs de *A. graveolens* durante a maior parte do dia (**figura 12**). Às 8 horas a condutância modelada média foi superior à média da gs medida em $6 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A hora do dia em que as médias foram mais próximas foi às 10 horas. Somente ao meio-dia a gs foi subestimada e nas horas seguintes o modelo previu uma condutância maior que a atingida pela planta, com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$). Nas primeiras horas do dia, a temperatura e o DPV foram baixos enquanto a RFA atingiu $450 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (**figura 9**), condições favoráveis à condutância da espécie. No entanto, a gs medida foi menor do que a prevista. O contrário ocorreu ao meio dia, quando a gs foi subestimada porque a condutância se manteve constante mesmo sob valores altos de DPV. Esta super e subestimação da gs às 8 h e 12 h podem ser resultado da ação do ozônio na sensibilidade dos estômatos de *A. graveolens*.

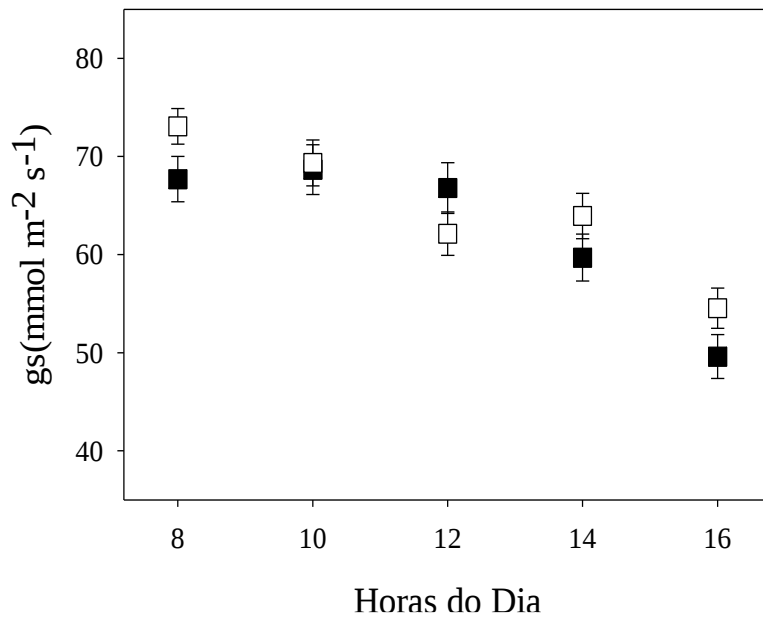


Figura 12. Comparação entre a média horária da condutância modelada (□) e da condutância medida (■) em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos de janeiro/2013 a fevereiro/2014, no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Em algumas espécies, a exposição a concentrações elevadas de ozônio pode reduzir a sensibilidade da resposta estomática a estímulos ambientais (Paoletti & Grulke 2010, Wagg *et al.* 2012). Wagg *et al.* (2013) demonstraram que plantas de *Dactylis glomerata* e *Ranunculus acris* expostas ao ozônio diminuíram sua capacidade de regular os movimentos estomáticos frente as alterações na temperatura, no déficit de pressão de vapor e na irradiância. Dumont *et al.* (2013) observaram o efeito do ozônio no curso diurno da *gs* nas espécies *Populus deltoides* e *Populus nigra* em câmaras de fumigação. As plantas expostas ao poluente apresentaram um atraso na abertura estomática com a aplicação de luz pela manhã e também no fechamento dos estômatos com o aumento do déficit de pressão de vapor. O atraso na redução da condutância em plantas expostas a concentrações altas de O₃ expõe a planta a doses maiores do poluente. É possível que isso seja causado por alterações na resposta das células guardas ao ácido abscísico (Mills *et al.* 2009) através da produção de etileno (Wilkinson & Davies 2010). Embora a $f_{\text{ozônio}}$ tenha sido acrescentada em muitos modelos, ela representa a redução da condutância devido à antecipação da senescência foliar. Porém os mecanismos que resultam nesse retardamento da resposta estomática ao poluente ainda não são totalmente esclarecidos.

Como dito anteriormente no **tópico 4.2.1**, a não reabertura dos estômatos com a redução do DPV no final da tarde, pode ser explicada pela baixa irradiância neste horário no local de estudo. Entretanto, em nosso modelo, a influência da luz na gs foi menor que a do DPV, por isso a partir das 14 horas a gs modelada tende a superestimar a medida. A redução da sensibilidade da condutância estomática ao DPV durante o final da tarde é bastante frequente (Elvira *et al.* 2007, Pleijel *et al.* 2007, Danielsson *et al.* 2013) e recentemente foi acrescentada à modelagem através do fator ΣVPD . Esta nova função representa a soma dos valores de DPV durante as horas de luz do dia. No estudo de Gonzalez-Fernandez *et al.* (2013) com o trigo, a função $f\Sigma DPV$ melhorou a capacidade preditiva do modelo. Entretanto, estes resultados não foram encontrados para as espécies arbóreas estudadas por Kinose *et al.* (2014), em que o aumento do R^2 não foi significativo.

A variação entre gs modelada e gs medida ao longo do período de estudo é apresentada na **figura 13**. As exposições 1º, 3º e 4º abrangem o período chuvoso e as 2º e 3º abrangem o período seco. A maior diferença entre as médias de gs ocorreu (**Tabela 3**) no período úmido, principalmente na primeira exposição, sendo a gs modelada em sua maior parte superestimada. Nas demais exposições as diferenças entre a condutância prevista e a observada foi menor, com uma subestimação significativa apenas no final da tarde durante o período seco (2ª exposição) e outra ao meio-dia na 4ª exposição. De modo geral, a capacidade preditiva do modelo em *A. graveolens* apresentou melhor desempenho durante a 2ª e 3ª exposições, período mais seco, quando os valores de gs medida e modelada foram bastante próximos.

Tabela 3. Medianas de condutância em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Med = condutância medida; Mod = condutância modelada. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre a condutância modelada e a medida.

Hora	1ºExp		2ºExp		3ºExp		4ºExp	
	med	mod	med	mod	med	mod	med	mod
8	64 a	74a	72 a	73 a	82 a	82 a	56 a	66 a
10	59 b	89 a	70 a	77 a	75 a	83 a	53 a	75 b
12	69 a	84 a	56 a	57 a	81 a	75 a	52 a	50 b
14	32 b	52 a	69 a	73 a	88 a	91 a	46 a	48 a
16	31 b	54 a	53 a	42 b	65 a	74 a	36 a	40 a

Considerando que a parametrização de *A. graveolens* resultou em um R^2 baixo, pode-se inferir que a condutância da espécie foi influenciada por fatores não considerados no modelo. Segundo Jarvis (1976), o número baixo de amostragens, com coleta de dados em uma pequena faixa de variação dos parâmetros ambientais, faria com que o valor da g_s modelada não fosse representativo. Entretanto, isto não se aplica ao presente estudo uma vez que a quantidade de dados amostrais foi suficiente para demonstrar as relações existentes entre estes parâmetros e a condutância estomática de *A. graveolens*.

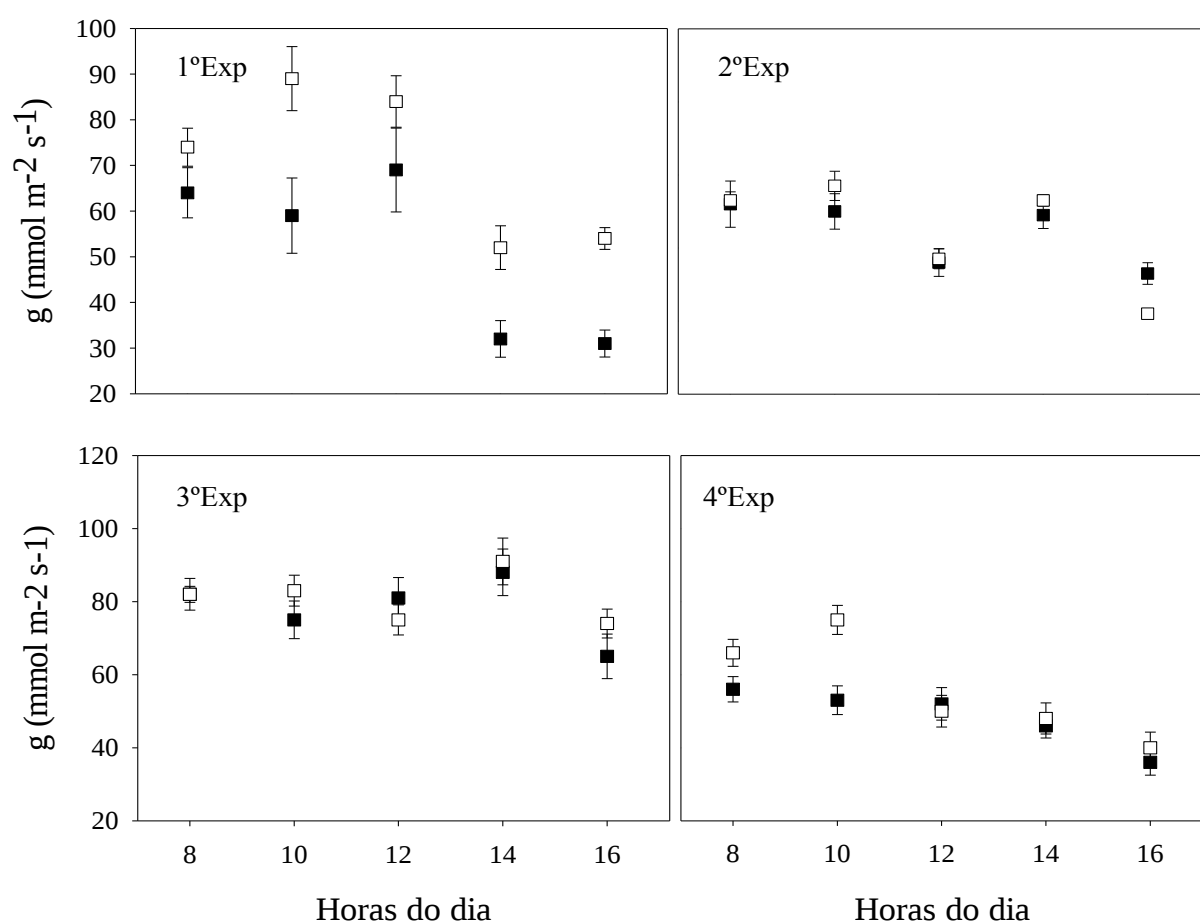


Figura 13. Médias horárias da condutância modelada ($\square$) e da condutância medida ($\blacksquare$) de indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

4.3. Índices

Tanto os índices de concentração acumulada (EAO40, SOMA00 e SOMA60) como o baseado no fluxo estomático de ozônio (DFO), acompanharam a sazonalidade dos valores de concentração do poluente, apresentados no **item 1.1**.

Dentre todas, a 1º e a 4º exposição (período chuvoso) apresentaram os maiores fluxos, totalizando uma dose absorvida pela planta de 5 e 4 mmol m⁻², respectivamente (**figura 14**). Na 2º exposição, após os 20 primeiros dias a absorção de ozônio pelos estômatos foi quase constante e atingiu 2 mmol m⁻² aos 90 dias, o menor fluxo durante todo o período de experimento. Apesar da 3º exposição ter sido caracterizada por dias seguidos de dose absorvida de ozônio abaixo de 1 mmol m⁻², na última semana o fluxo ultrapassou o valor obtido pela 2º exposição.

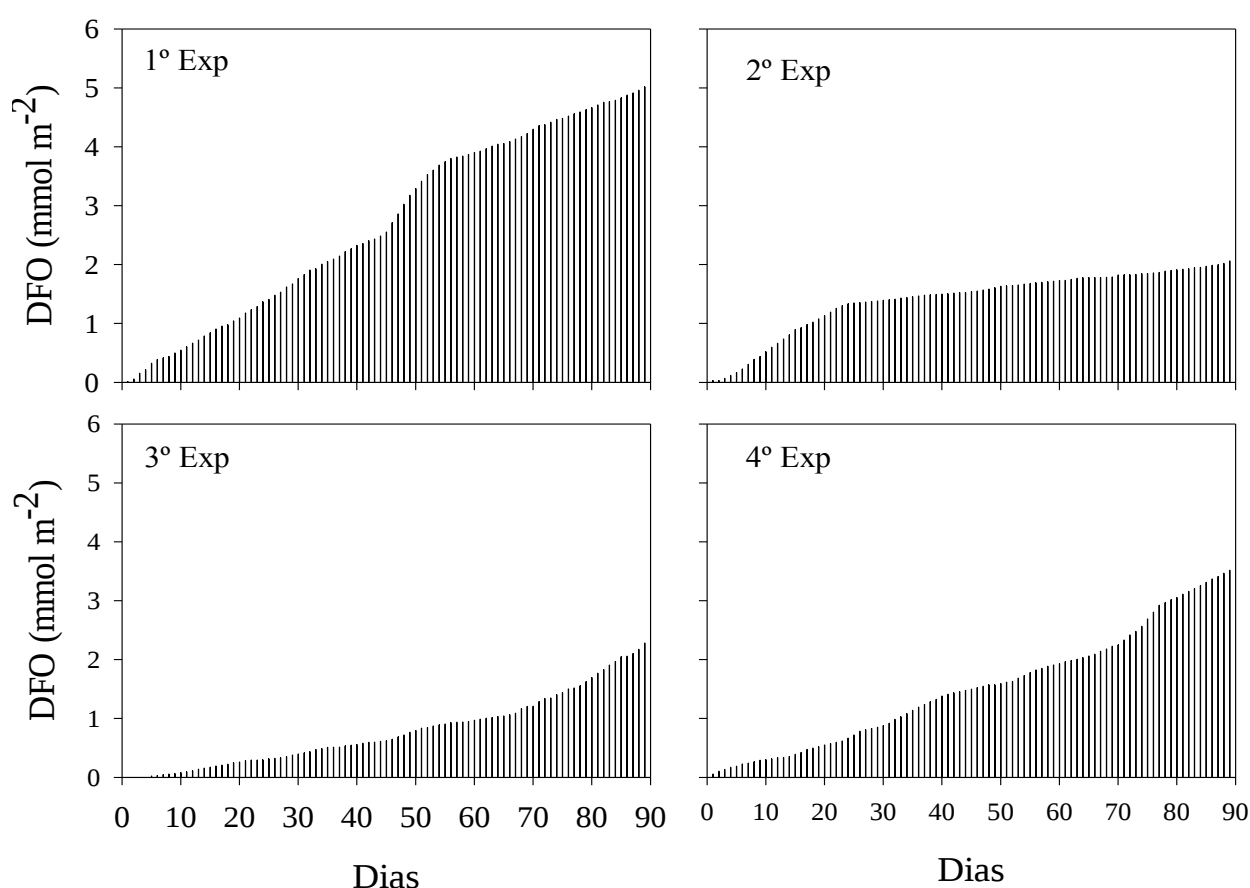


Figura 14. Perfil da dose fitotóxica de O₃ (DFO, nmol m⁻²) em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Os índices baseados na concentração acumulada de ozônio seguiram o mesmo padrão entre si, sendo crescentes ao longo dos dias de exposição (**figuras 15 a 17**). Na 2ª exposição os valores de EAO40 foram mais constantes e ultrapassaram 1 ppm apenas após 7 semanas de experimento, com uma concentração acumulada de 1,20 ppm, a mais baixa registrada (**figura 15**). O maior valor de EAO40 foi obtido na 4ª exposição, em torno de 10 ppm. Nesta exposição as plantas foram expostas a EAO40 acima de 1 ppm logo no primeiro mês. A SOMA00 variou menos entre as exposições, porém ainda pode se observar diferenças entre o período seco e chuvoso. Na segunda semana de experimento os valores variaram de 3,2 a 6,6 ppm na 3ª e na 4ª exposição, respectivamente (**figura 16**). Assim como a EAO40, o menor valor de SOMA00 foi obtido na 2ª exposição (26 ppm) e o maior na 4ª (56 ppm). A SOMA06 também seguiu este padrão e variou de 0,20 a 3,4 ppm, na 2ª e 4ª exposição respectivamente (**figura 17**). De modo geral, considerando todos os índices, a maior concentração foi registrada na 4ª exposição, seguida pela 1ª, 3ª e 2ª.

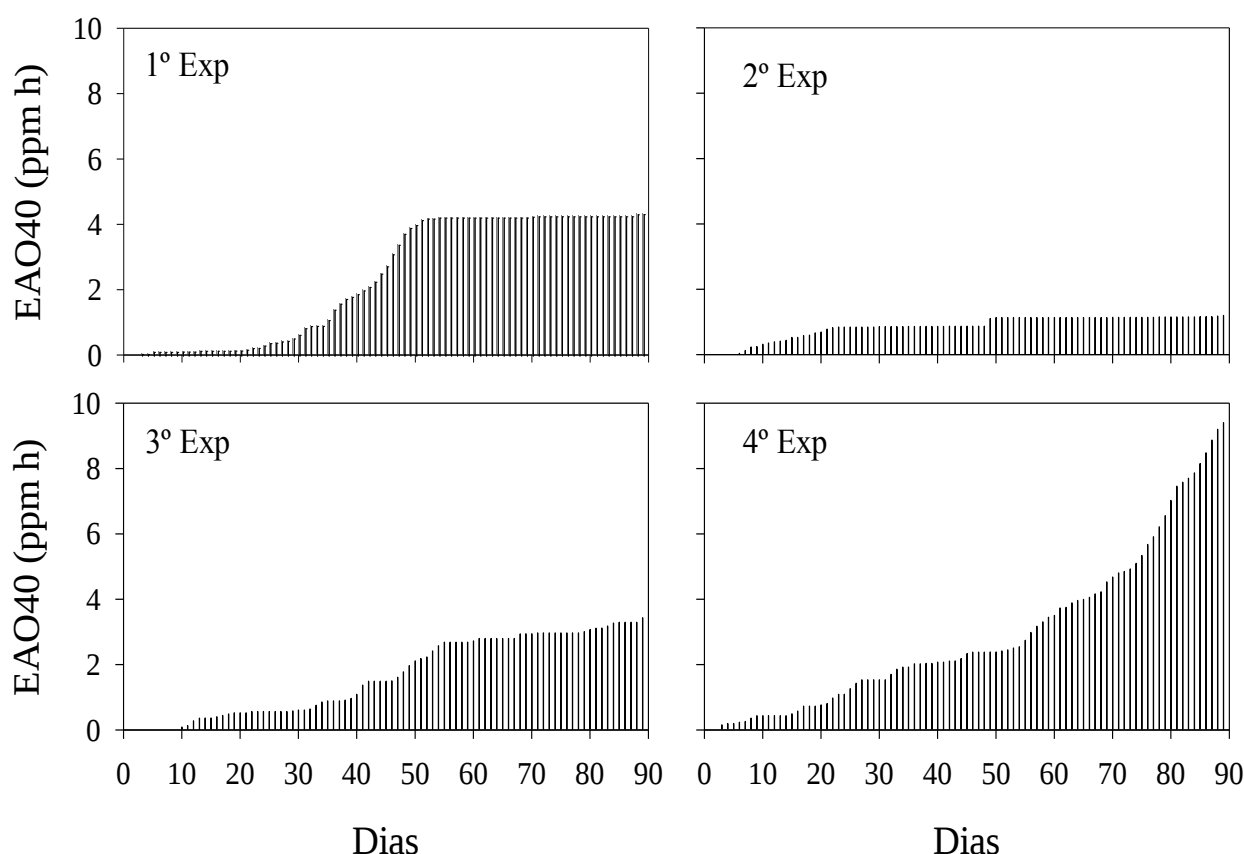


Figura 15. Perfil da exposição acumulada de ozônio acima de 40 ppb (EAO40) em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

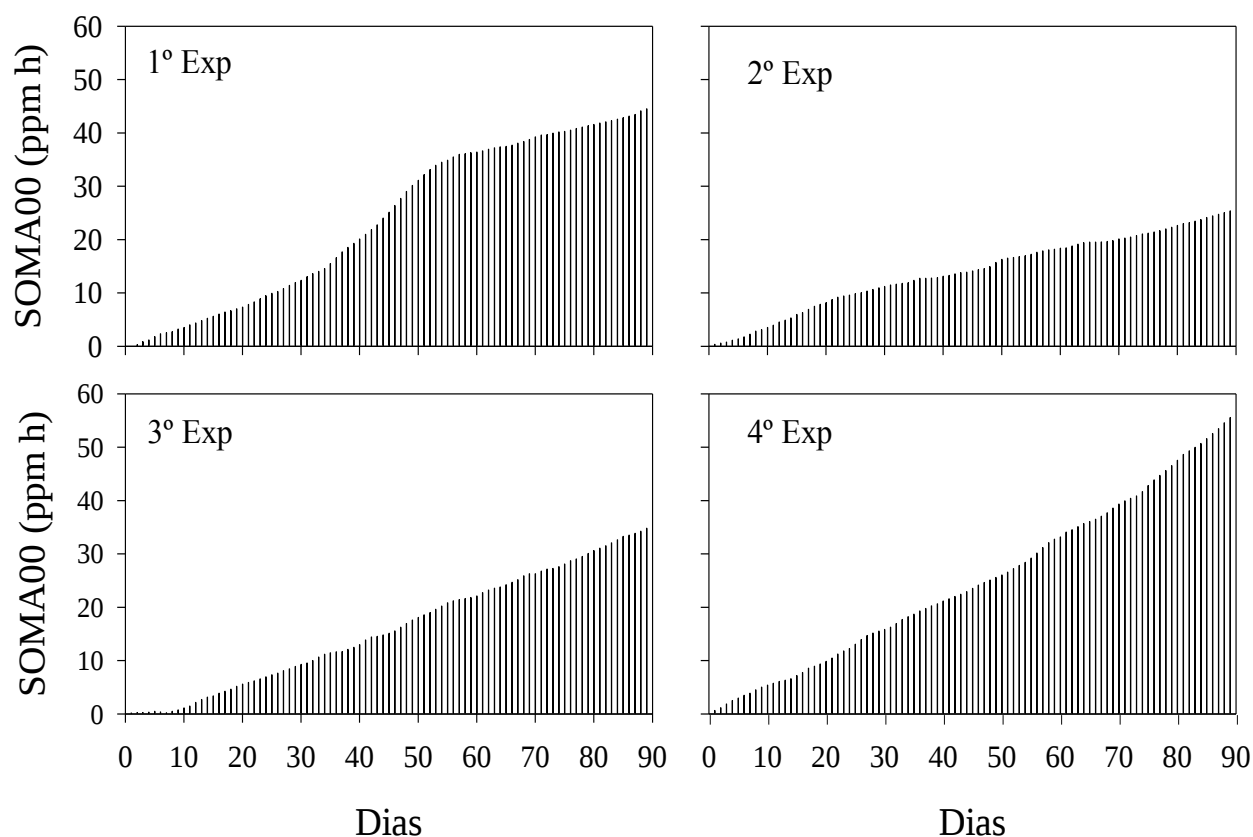


Figura 16. Perfil da soma das concentrações acumuladas (SOMA00) em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

A análise de regressão entre os índices apontou uma melhor correlação do fluxo com a SOMA00 ($R^2 = 0,76$), como também verificado por Panek *et al.* (2002). Estes autores, em experimento realizado na Califórnia, verificaram que o fluxo estimado para *Pinus ponderosa* se correlacionou mais com a SOMA00 do que com os demais índices (SOMA06, SOMA08 e W126). Contudo, em *A. graveolens* esta relação se mostrou forte apenas nos períodos em que a abertura estomática não foi restringida pela umidade do ar, pois, uma vez que os estômatos estão limitados, a dose absorvida de ozônio é superestimada pelos índices que consideram apenas a concentração do poluente no ar.

No presente estudo o coeficiente de determinação entre o DFO e a SOMA00 foi mais alto na estação úmida ($R^2 = 0,93$) do que no período seco ($R^2 = 0,86$). É possível que esta pequena diferença nos valores esteja relacionada com as condições ambientais limitantes à atividade estomática de *A. graveolens*, visto que durante a estação seca a sequência de dias sem chuva ocasionou a menor umidade relativa do ar e consequente aumento no déficit de pressão de vapor (Figuras 5 e 6).

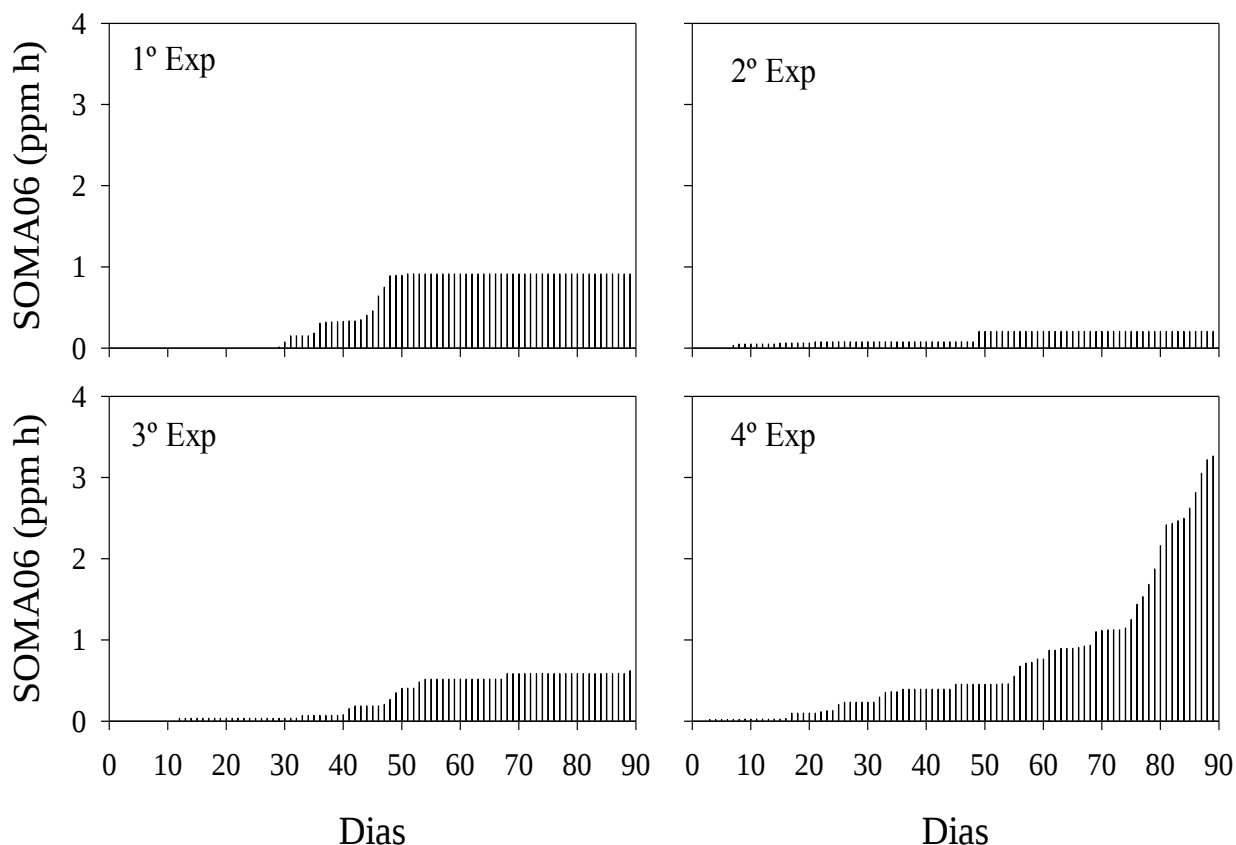


Figura 17. Perfil da soma das concentrações acumuladas acima de 60ppb - 0,06 ppm (SOMA06) em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

4.4 Variáveis - resposta

As plantas expostas no campo apresentaram maior queda de folhas do que os indivíduos mantidos em ar filtrado. Além disso, a maior porcentagem de plantas com folhas senescentes ocorreu durante a 1º e 4º exposição (**figura 18**), justamente quando as maiores concentrações de ozônio foram registradas. Estes resultados permitem inferir a influência do poluente no processo de abscisão foliar, o que foi confirmado por Fernandes (2015) que observou, por meio de análises microscópicas, marcadores de senescência celular acelerada em folhas das mesmas plantas utilizadas neste estudo. A senescência foliar acelerada (em inglês Accelerated Cell Senescence – ACS) é uma das características de estresse induzido pelo O₃ (Vollenweider *et al.* 2003, Ribas *et al.* 2005, Ranford & Reiling 2007, Paoletti *et al.* 2009).

A espécie *Populus nigra* exposta em câmaras de topo aberto e em local com elevado ozônio, apresentou redução no crescimento, na assimilação do carbono e na condutância estomática e aumento da senescência prematura (Bortier *et al.* 2000). No presente estudo, a ACS somada às injúrias foliares induzidos pelo ozônio, ocasionou a queda acentuada das folhas de *A. graveolens*.

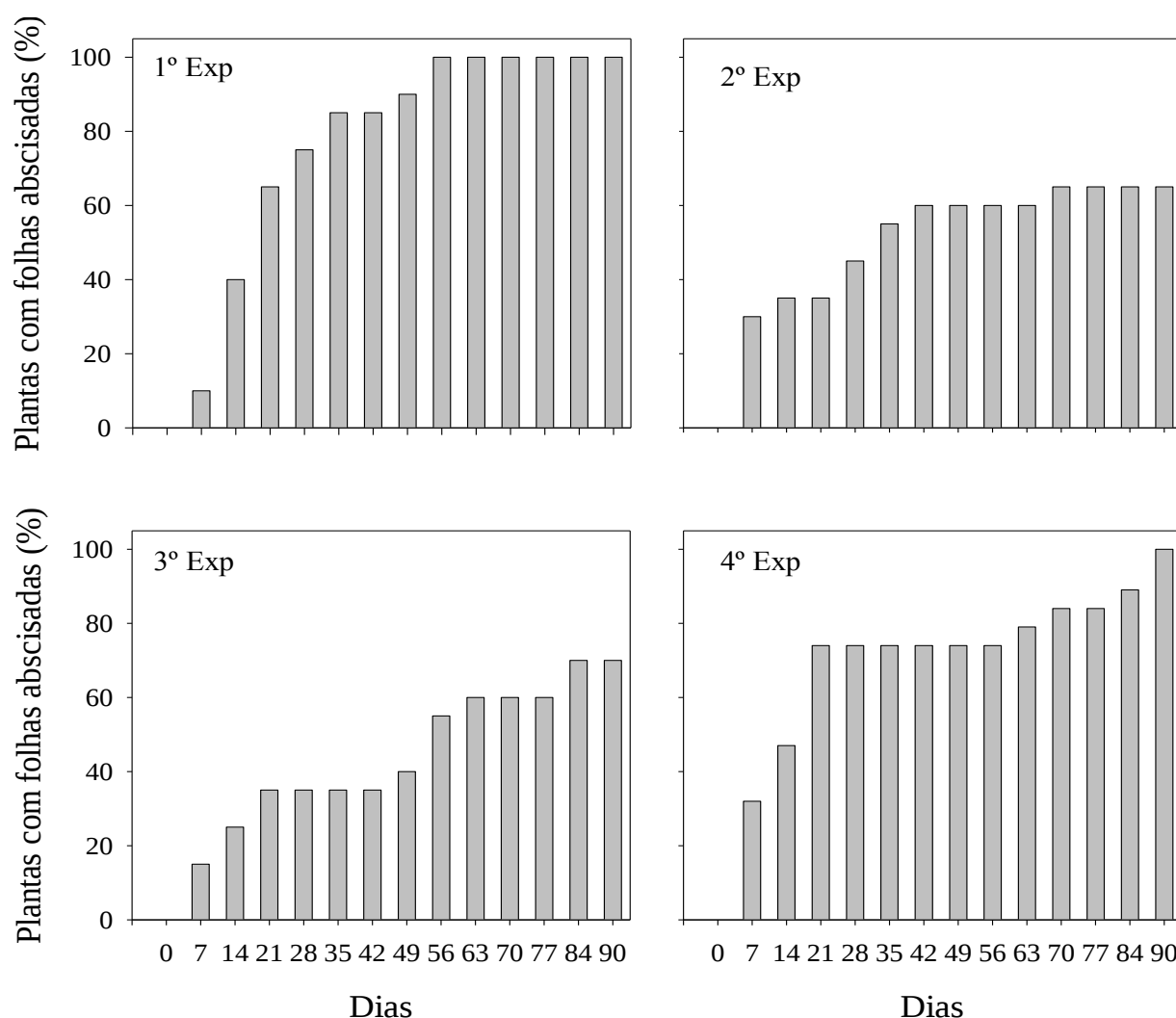


Figura 18. Porcentagem de indivíduos jovens de *A. graveolens* que apresentaram folhas abscisadas durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014); plantas expostas no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Os sintomas foliares visíveis foram semelhantes aos obtidos em estudos anteriores com *A. graveolens* (Cassimiro 2012, Moura 2013, Moura *et al.* 2014b), descritos no **item 3.9.2**. Em experimento paralelo a este, Fernandes (2015) verificou através de estudo de Anatomia, que a oxidação de compostos fenólicos foi responsável pelo aparecimento de injúrias visíveis (*stipplings*) em *A. graveolens* (**figura 19**).



Figura 19. Aspectos dos sintomas foliares semelhantes aos induzidos pelo O₃ em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, SP. **A:** superfície adaxial; **B:** superfície abaxial.

Na **tabela 4** estão representadas as diferenças estatísticas entre a senescência foliar e os índices de injúria, registrados durante as exposições. A porcentagem de plantas com injúrias visíveis foi significativamente maior na 1^o e na 4^o exposições (**tabela 4**). A incidência foliar foi mais alta no final da 1^o exposição (60%) (**figura 20**), porém as injúrias se manifestaram primeiro na 4^o exposição, pois em de duas semanas 10% dos indivíduos estavam injuriados. O oposto foi observado na 2^o exposição, quando as injúrias tardaram a aparecer (após 11 semanas) e atingiram apenas 5% das plantas. Os sintomas foram crescentes em todas as exposições com exceção da última, quando ao final do período a porcentagem de plantas injuriadas decaiu.

Tabela 4. Medianas dos índices de injúrias foliares visíveis em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1^a exposição (21/02 a 22/04/2013), 2^a exposição (25/04 a 28/07/2013), 3^a exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4^a exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as exposições.

	1 ^a exposição	2 ^a exposição	3 ^a exposição	4 ^a exposição
Incidência	55,0 a	0,0 b	10,0 ab	30,0 a
Severidade	37,5 ab	0,0 c	7,5 bc	41,0 a
IIF	6,2 ab	0,0 b	6,4 a	7,3 a
Senescência Foliar	87,5 a	60,0 bc	37,5 c	74,0 ab

As injúrias, assim como os índices, foram mais intensas e precoces no período chuvoso (1º e 4º exposições) (**figura 20**). Apesar das métricas baseadas na concentração acumulada de ozônio serem maiores durante a 4º exposição, os sintomas foram mais altos na 1º, quando o fluxo estomático foi mais alto (**figura 14**).

Em todas as exposições a severidade das injúrias foi crescente nas primeiras semanas, porém decaiu nos últimos dias de experimento. A severidade foi maior no período chuvoso, durante 4º exposição 70% das folhas estavam injuriadas (**figura 21**) No período seco, os sintomas tardaram a se manifestar, principalmente na 2º exposição. Porém a porcentagem de folhas com injúrias foi similar à atingida durante a 3º exposição (23 - 29%).

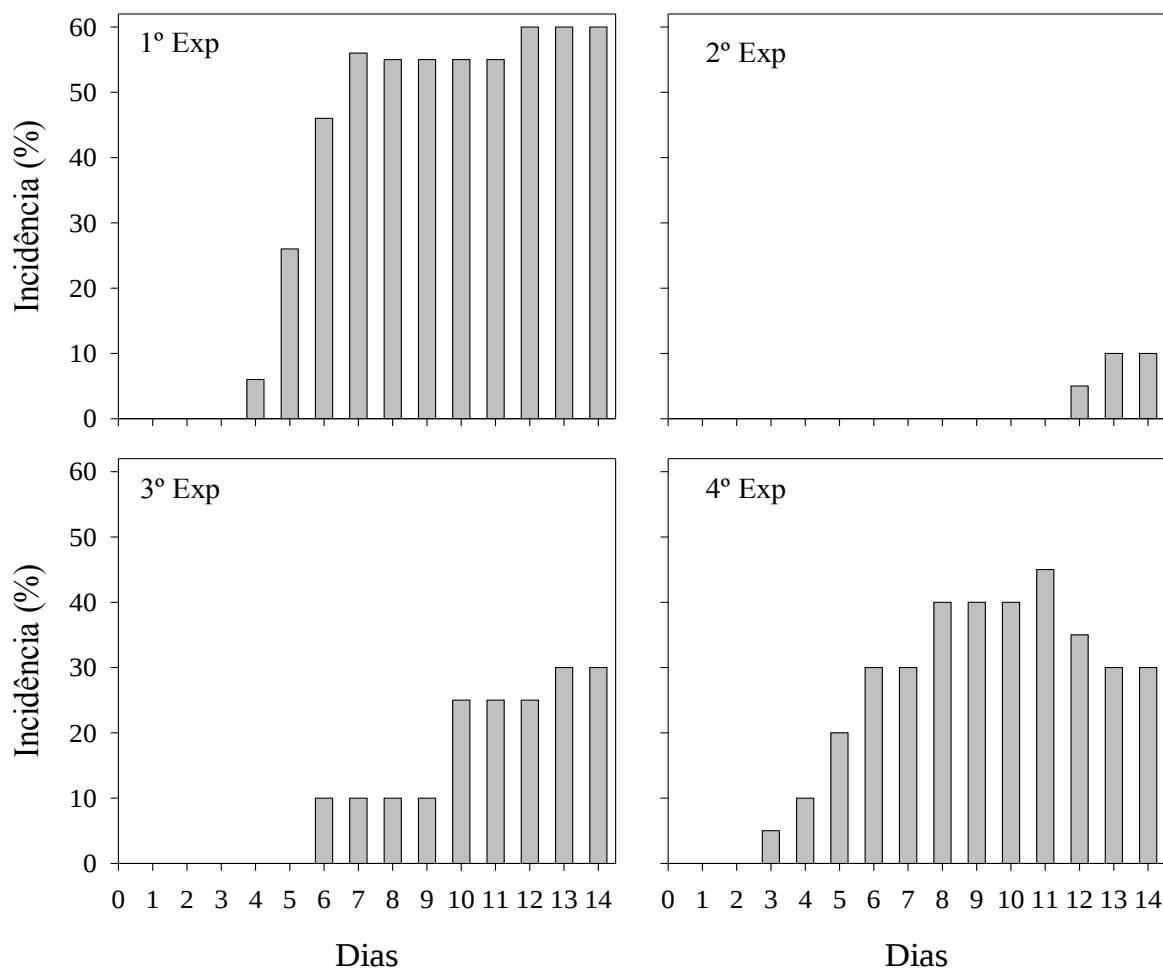


Figura 20. Incidência de injúrias foliares visíveis (%) em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

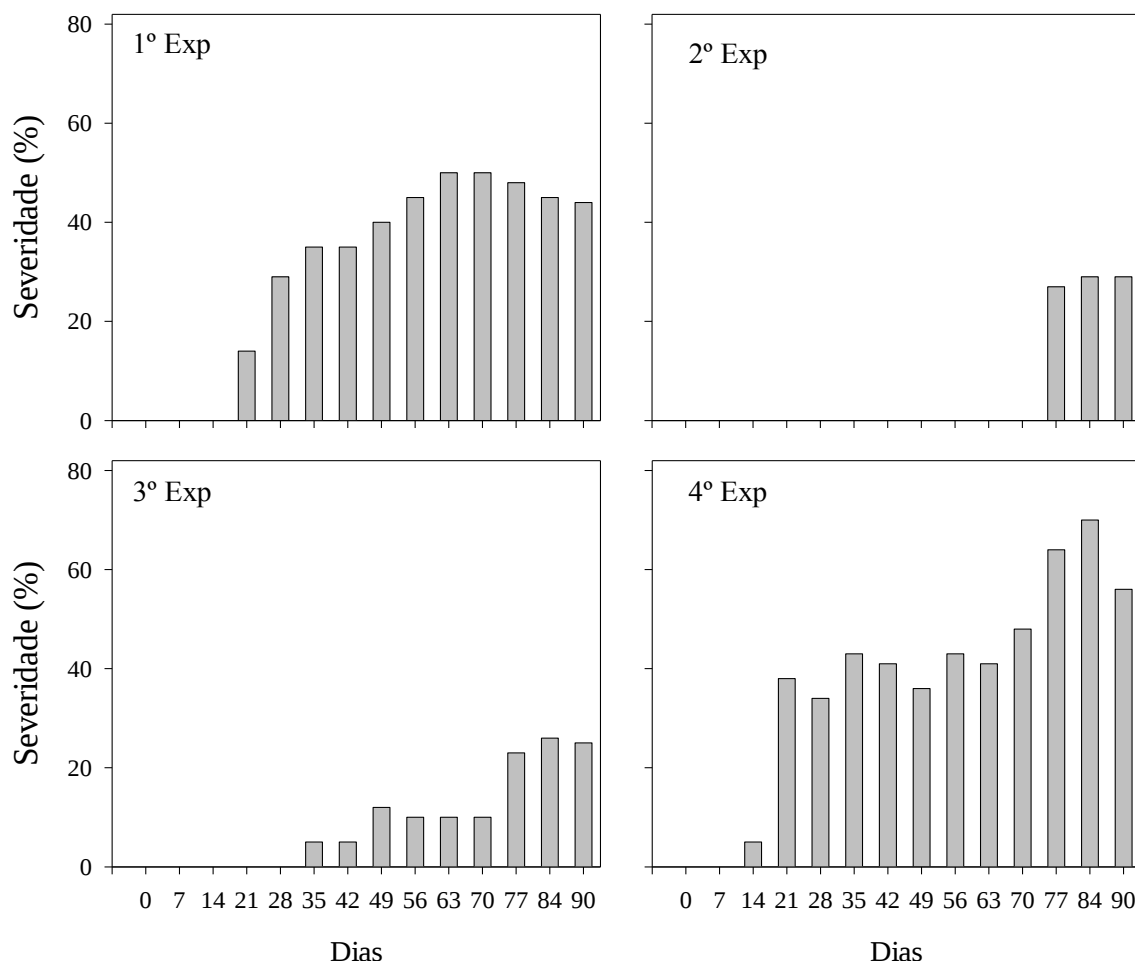


Figura 21. Severidade das injúrias foliares visíveis em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

O IIF não apresentou um padrão definido, mas foi mais elevado na 4ª exposição (**Figura 22**). Em todas as exposições a porcentagem de área foliar ocupada pelos sintomas se limitou às classes 1 (1-5%) e 2 (6-25%) e o surgimento das injúrias não apresentou nenhum padrão. As oscilações na incidência, severidade e IIF devem-se à abscisão das folhas mais velhas com injúrias (Novak *et al.* 2003). Quando o percentual de injúria é alto a planta transloca substâncias para tecidos mais jovens, ocorrendo a queda dessas folhas injuriadas. Este processo ocasiona a redução dos índices de injúria.

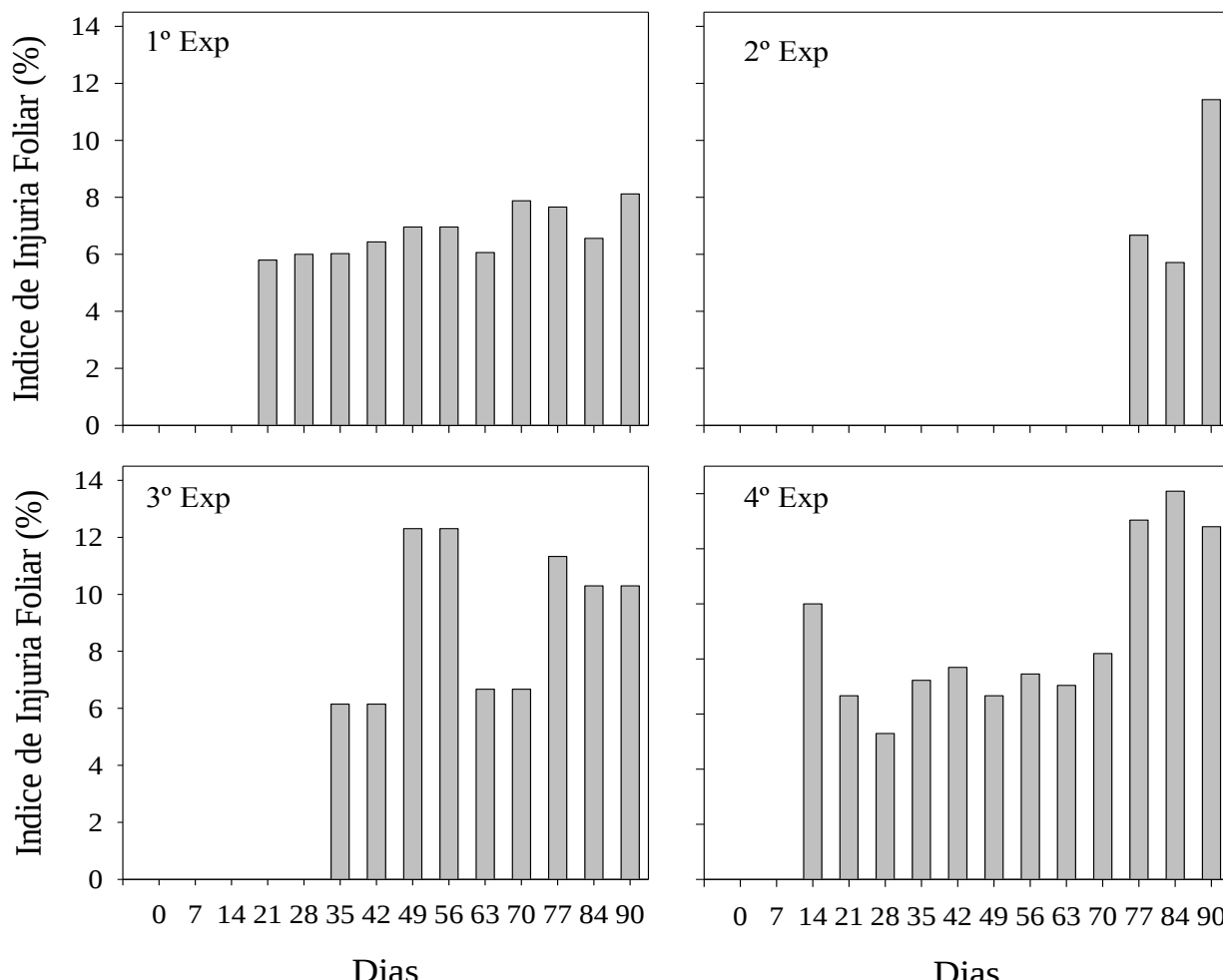


Figura 22. Índice de injúria foliar (%) em indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos durante a 1ª exposição (21/02 a 22/04/2013), 2ª exposição (25/04 a 28/07/2013), 3ª exposição (28/07 a 21/10/2013) e 4ª exposição (13/10 a 14/02/2014), no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

4.5 Dose-resposta

Diferentes limiares de dose fitotóxica de O_3 (DFO_y) foram testados, de 0 a 6 nmol, para definir o melhor a ser utilizado na previsão dos efeitos do ozônio, como proposto em diversos estudos (Gonzalez *et al.* 2010, UNECE 2010, Mills *et al.* 2011, Gonzalez *et al.* 2014). A comparação entre estes níveis críticos foi baseada na análise de regressão entre DFO_y e as injúrias e está representada na **tabela 5**. Dentre todos os índices testados, a correlação de DFO_y sem limiar de ozônio (DFO_0) foi aquela que melhor explicou a variação das injúrias durante todo o período de experimento. Comparado a limiares menores, os mais altos ($> 2 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) resultaram em coeficientes de determinação mais baixos, com a incidência ($R^2 = 0,43$), a severidade ($R^2 = 0,23$), o IIF ($R^2 = 0,04$) e a senescência foliar ($R^2 = 0,45$). Isto indica que a espécie *A. graveolens* respondeu rapidamente às concentrações de ozônio a que foi exposta, ao contrário de outras espécies descritas na literatura (UNECE 2010, Mills *et al.* 2011), em que limiares menores resultaram em baixa explicabilidade.

Tabela 5. Valores do coeficiente de determinação (R^2) da análise de regressão entre os danos induzidos pelo ozônio e a dose fitotóxica de ozônio (DFO) estimada utilizando diferentes limiares (de 0 a 6 nmol O₃ m⁻² s⁻¹).

	DFO ₀	DFO ₁	DFO ₂	DFO ₃	DFO ₄	DFO ₅	DFO ₆
Incidência	0,66*	0,51*	0,43*	0,51*	0,50*	0,49*	0,47*
Severidade	0,50*	0,31*	0,23*	0,26*	0,24*	0,21*	0,19*
Índice de Injúria Foliar	0,25*	0,81	0,04	0,05	0,06	0,04	0,03
Senescência Foliar	0,75*	0,55*	0,45*	0,41*	0,34*	0,30*	0,28*

*valores significativos ($p < 0,001$).

Gonzalez-Fernandez *et al.* (2014), verificaram para um cultivar de tomate, uma relação mais forte com o limiar 6 nmol m⁻² s⁻¹ ($R^2 = 0,60$). Para espécies mais sensíveis de trigo, com o nível crítico de 14 nmol m⁻² s⁻¹ o fluxo explicou melhor a perda de biomassa (Gonzalez-Fernandez *et al.* 2010a). Estes valores altos de DFO_y são relacionados a um sistema mais eficiente de defesa do vegetal. O DFO_y considera que no interior da folha parte do poluente é detoxicado e não induz o aparecimento de injúrias visíveis (Musselman *et al.* 2006). Em outras palavras, os limiares estariam representando a ação dos antioxidantes no processo de neutralização das espécies reativas originadas pela entrada do ozônio na folha. Segundo alguns autores, a não inclusão deste sistema de proteção da planta no modelo de fluxo, pode ocasionar a superestimação da dose efetiva do poluente (Musselman *et al.* 2006, Castagna & Ranieri 2009, Heath *et al.* 2009).

No entanto, considerar limiares constantes para representar a parcela de ozônio detoxicada parece ter pouca relevância biológica. Uma vez que este processo é dinâmico, podendo os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos variar com a espécie e idade do vegetal (Musselman *et al.* 2006) e com as condições ambientais (Matyssek *et al.* 2007). Para *A. graveolens* a melhor dose-resposta ocorreu justamente com DFO_y sem limiar. Este resultado pode estar relacionado à característica das injúrias presentes na espécie. Como dito anteriormente, em *A. graveolens* os danos de coloração marrom (“stipplings”) são o efeito da ação de antioxidantes (Fernandes 2015). Sendo assim, utilizar diferentes limiares de DFO não seria necessário, pois a detoxicação do ozônio pelo sistema de defesa da planta já está expresso no aparecimento das injúrias foliares. O mesmo ocorre na espécie arbórea de clima tropical *Psidium guajava* L. ‘Paluma’, onde as injúrias são produto do acúmulo de antocianina (Rezende e Furlan 2009) e foram melhor explicadas com o índice DFO₀ (Assis *et al.* 2015).

Outra hipótese a ser levantada é que a determinação do nível crítico depende da parametrização utilizada para estimar o DFO_y. A parametrização de *A. graveolens* pode ter influenciado a melhor resposta de limiares menores, devido à baixa g_{max} da espécie. No entanto a ação dos antioxidantes parece ter maior influência na determinação do limiar, pois o melhor desempenho do DFO0 também foi visto para espécies com g_{max} maior que a determinada para *A. graveolens* (Assis *et al.* 2015).

Quanto às análises de regressão entre as injúrias e os índices, dos baseados na concentração acumulada de ozônio, a SOMA00 foi o que apresentou relação mais forte com as injúrias ($R^2 > 0,56$) (**Tabela 6**). A EAO40 é um índice sazonal definido por um período de duração que varia conforme o crescimento da planta (média de seis meses para arbóreas). É o índice mais utilizado na Europa para prever os efeitos do ozônio na vegetação (UNECE 2010).

Tabela 6. Valores do coeficiente de determinação (R^2) da análise de regressão entre medidas de injúrias foliares e diferentes métricas de O_3 . Todos os valores foram significativos ($p < 0,001$).

	Dano	r^2
SOMA00	Incidência	0,60
	Severidade	0,61
	Índice de Injúria Foliar	0,56
	Senescência Foliar	0,71
SOMA06	Incidência	0,31
	Severidade	0,49
	Índice de Injúria Foliar	0,41
	Senescência Foliar	0,38
EAO40	Incidência	0,49
	Severidade	0,59
	Índice de Injúria Foliar	0,52
	Senescência Foliar	0,53
DFO0	Incidência	0,67
	Severidade	0,50
	Índice de Injúria Foliar	0,27
	Senescência Foliar	0,75

No Brasil, estudos com a EAO40 e espécies de vegetação tropical não obtiveram um bom desempenho (Pina 2010, Moura *et al.* 2014a, Assis *et al.* 2015). Moura *et al.* (2014a) discutem que índices baseados na concentração anual, como a SOMA00 e SOMA06 são mais apropriados que os índices sazonais como a EAO40, para prever as injúrias induzidas pelo ozônio na região de Campinas (SP) coberta por Mata Atlântica semi-decidual. Isto porque muitas espécies tropicais não apresentam estação de crescimento bem definida. No presente estudo calculou-se a EAO40 durante todas as exposições e ao longo do ano. Ainda assim, o índice que melhor se correlacionou com as injúrias de *A. graveolens* foi a SOMA00. Uma teoria para este resultado baseia-se no perfil horário da condutância da espécie e da concentração de ozônio.

As concentrações de ozônio são baixas no início da manhã, aumentam à medida que a radiação e a temperatura se elevam e atingem seu pico por volta do meio-dia, quando as concentrações voltam a cair. Já a condutância da espécie apresentou um perfil inverso, com valores decrescentes do início da manhã (g_{max}) ao fim da tarde (**ver item 4.2.1**). Isto significa que na hora do dia em que a abertura estomática é máxima o ozônio se encontra em baixa concentração. Como a EAO40 considera somente valores de ozônio acima de 40 ppb e apenas durante o período de luz (8 às 18 horas), a relação deste índice com as injúrias é prejudicada, pois nesta hora do dia os estômatos do vegetal não estão totalmente abertos. Diferente da SOMA00, que considera a soma de todas as concentrações, até mesmo as mais baixas registradas logo no início da manhã quando ocorre a maior atividade estomática da espécie. É possível que as injúrias de *A. graveolens* sejam mais dependentes das baixas concentrações do poluente do que do pico de ozônio no início da tarde. Além disso, como discutido anteriormente, a relação dose-resposta tem melhor desempenho quando não considerado nenhum limiar. No caso da EAO40 e da SOMA06 considera-se os limiares de 40ppb e 60ppb, respectivamente, o que pode ter reduzido o desempenho destes índices em prever as injúrias.

Quanto ao número de indivíduos com sintomas, ou seja, a incidência, o coeficiente de determinação mais alto foi obtido com o DFO0 ($R^2 = 0,75$) seguido pela SOMA00 ($R^2 = 0,71$), EAO40 ($R^2 = 0,49$) e SOMA06 ($R^2 = 0,31$). Estas correlações suportam a ideia de que o fluxo é melhor para explicar os efeitos de injúria do que os índices baseados na concentração de ozônio atmosférica (Pleijel *et al.* 2002). Porém nem sempre os estudos apontam uma melhor resposta do fluxo estomático de ozônio (Elvira *et al.* 2004). Karlsson *et al.* (2004) combinaram dados de diversas espécies e encontraram na grande maioria delas melhor correlação da EAO40. A resposta pode variar conforme a sensibilidade das espécies, sendo que as menos sensíveis apresentam tendência a se correlacionar melhor com a EAO40

(Karlsson *et al.* 2007). Em Gonzalez-Fernandez *et al.* 2014, quando os cultivares considerados resistentes foram excluídos, o R^2 aumentou, quando juntos (resistentes e sensíveis) a EAO40 obteve melhor performance do que o fluxo ao prever os danos nas espécies.

Diferenças na resposta à sensibilidade ao ozônio, provavelmente estão relacionadas à capacidade de detoxicação de cada indivíduo. Variações intraespecíficas na sensibilidade do ozônio são reportadas por diversos autores (Mills *et al.* 2007).

Os índices SOMA00 e o DFO0 responderam de maneira similar, sendo o primeiro ligeiramente melhor. Resultado que está de acordo com o verificado por Panek *et al.* (2002), para espécies de pinheiro na Califórnia. A relação dose-resposta entre o DFO0 e as injúrias poderia ser mais forte, porém algumas incertezas na parametrização, já discutidas anteriormente (**item 4.2.1**) podem ter reduzido à capacidade preditiva do modelo de fluxo estomático de ozônio.

Alguns estudos sugerem que experimentos com duração superior a um ano e em diferentes locais, geralmente apresentam melhor correlação entre as injúrias e os índices baseados no fluxo estomático do que os baseados em concentrações acumuladas de ozônio (Gonzalez-Fernandez *et al.* 2010, Pleijel *et al.* 2007). No presente estudo, a pequena variação das condições meteorológicas pode estar relacionada à similaridade no desempenho entre a SOMA00 e o DFO0. Além disso, índices como a SOMA00 assumem uma condutância constante, o que seria menos realístico do ponto de vista fisiológico. No entanto, a gs da espécie *A. graveolens* no ano de estudo não apresentou grandes variações, o que resultou em uma dose-resposta similar entre estes dois índices. De modo geral, a utilização da SOMA00 para prever os danos causados em indivíduos de *A. graveolens* de região tropical pode ser considerada aceitável, visto que obteve-se boas correlações com os índices de injúria com a vantagem de constituir uma abordagem mais simples se comparada à do DFO0.

5. CONCLUSÃO

Diferenças na $g_{s_{max}}$, devido a alta variabilidade genética de *A. graveolens*, podem ter enfraquecido a precisão da modelagem. Por tanto, estabelecer padrões fisiológicos, através de estudos em diferentes locais e com indivíduos de diferentes procedências poderia aumentar a capacidade preditiva do modelo.

A função fenologia deve ser reformulada, pois foi estabelecida para espécies de regiões temperadas e parece não ser adequada para descrever as variações sazonais de *A. graveolens*, que apresenta crescimento ao longo de todo o ano.

A inclusão da $f_{ozônio}$ pode melhorar a força do modelo, pois no presente estudo foi observado a senescência foliar acelerada ocasionada pela ação do poluente. Além disso, em estudo anterior foi verificado que a espécie *A. graveolens* reduz sua atividade fotossintética quando exposta a concentrações elevadas de ozônio.

A baixa correlação entre a g_s modelada e a medida é aceitável considerando que se trata de uma primeira abordagem com espécie florestal tropical. No entanto, reconhece-se a necessidade de novos estudos que visem a reparametrização do modelo para *A. graveolens*, pois a condutância estomática pode ter sido influenciada por fatores não considerados, como a ação das variações de fitohormônios e do ozônio.

A SOMA00 e o DFO0 explicaram de maneira similar as variações dos sintomas foliares induzidos pelo O_3 . Assim, prever danos utilizando a métrica mais simples da SOMA00 pode ser considerado aceitável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth, E.A., Yendrek, C.R., Sitch, S., Collins, W.J. & Emberson, L.D.** 2012. The effects of tropospheric 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., Bermejo, V., Gimeno, B.S.** 2007. Sensitivity analysis of a parameterization of the stomatal component of the DO₃SE model for *Quercus ilex* to estimate ozone flux. *Environmental Pollution* 155: 473-480.
- Andersen, C.P.** 2003. Source-sink balance and carbon allocation below ground in plants exposed to ozone. *New Phytologist* 157: 213-228.
- Angelocci, L.R.** 2002. Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: Introdução ao tratamento biofísico. ESALQ/USP, Piracicaba.
- Arndt, U. & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *In*: H. Ellemberg, U. Arndt, B. Brettheuer, B. Ruthsatz, L. Steubing (eds.). *Biological monitoring: Signals from the environment*. Vieweg & Sons, Eschborn, p. 199-298.
- Ashmore, M., Toet, S. & Emberson, L.** 2006. Ozone – a significant threat to future world food production? *New Phytologist* 170: 199–201.
- Ashmore, M.R.** 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment* 28: 949-964.
- Assis, P.I.L.S., Alonso, R., Meirelles, S.T. & Moraes R.M.** 2015. DO₃SE model applicability and O₃-flux performance compared to AOT40 for an O₃ sensitive tropical tree species (*Psidium guajava* L. ‘Paluma’). *Environmental Science and Pollution Research*. *In press*.
- 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.
- Barbosa, M.M., Vilegas, W., Lira, M.S., Silva, V.C., Rodrigues, C.M.** 2011. Avaliação da atividade antioxidante das folhas de *Astronium graveolens*. *In*: XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Araraquara.
- Barkley, F.A.** 1968. Anacardiaceae: Rhoideae: *Astronium*. *Phytologia* 16:107-152.
- Bermejo, V., Alonso, R., Elvira, S., Rábago, I. & García, M.** 2010. El ozono troposférico y sus efectos em la vegetación. Ministerio del Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid.

- 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.
- Blum, O., Bitynierowicz, A., Manning, W., Popovicheva, L.** 1997. Ambient tropospheric ozone in the Ukrainian Carpathian Mountains and Kiev region: Detection with passive samplers and bioindicator plant. *Environmental Pollution* 98: 299-304.
- Bortier K., De Temmerman L. & Ceulemans, R.** 2000. Effects of ozone exposure in open-top chambers on poplar (*Populus nigra*) and beech (*Fagus sylvatica*): a comparison. *Environmental Pollution* 109: 509-516.
- Buker, P., Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Cambridge, H.M., Jacobs, C.M.J., Massman, W.J., Muller, J., Nikolov, N., Novak, K., Oksanen, E., Schaub, M. & de la Torre D.** 2007. Comparison of different stomatal conductance algorithms for ozone flux modelling. *Environmental Pollution* 146: 726-735.
- Calfapietra, C., Fares, S., Manes, F., Morani, A., Sgrigna, G. & Loreto, F.** 2013. Role of Biogenic Volatile Organic Compounds (BVOC) emitted by urban trees on ozone concentration in cities: A review. *Environmental Pollution* 183:71-80.
- Cassimiro, J.C.** 2012. Avaliação de *Astronium graveolens* Jacq. como espécie bioindicadora de ozônio. Relatório final de bolsa de Iniciação Científica - FAPESP. Proc. 2011/12433-3.
- Castagna, A. & Ranieri, A.** 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution* 157: 1461–1469.
- Castanho, A.D.A.** 1999. Determinação quantitativa de fontes de material particulado na atmosfera da cidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Castell-Balaguer, N., Téllez, L. & Mantilla, E.** 2012. Daily, seasonal and monthly variations in ozone levels recorded at the Turia river basin in Valencia (Eastern Spain). *Environmental Science and Pollution Research* 19: 3461-3480.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2010. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2009. Governo de Estado de São Paulo, SP. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.asp>.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2012. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo. 2011. Série Relatórios. Governo de Estado de São Paulo, SP. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.asp>.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2013. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2012. Governo de Estado de São Paulo, SP. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.asp>. (acesso em: 10.outubro.2013).

- 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.
- Costa, G.F. & Marengo, R.A.** 2007. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). *Acta Amazonica* 37: 229-234.
- 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.
- DETRAN-SP, Departamento Estadual de Trânsito de São Paulo.** 2014. Disponível em: <http://www.detran.sp.gov.br>.
- 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 subtropical area? *Environmental Pollution* 159: 458-465.
- Dumont, J., Spicher, F., Montpied, P., Dizengremel, P., Jolivet, Y. & Le Thiec, D.** 2013. Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO₂ and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoids* x *Populus nigra* genotypes. *Environmental Pollution* 173: 85-96.
- El-Khatib, A.A.** 2003. The response of some common Egyptian plants to ozone and their use as biomonitors. *Environmental Pollution* 124: 419-428.
- Elvira, S., Bermejo, V., Manrique, E. & Gimeno, B.S.** 2004. On the response of two populations of *Quercus coccifera* to ozone and its relationship with ozone uptake. *Atmospheric Environment* 38: 2305–2311.
- Elvira, S., Rocio, A. & Gimeno, B.S.** 2007. Simulation of stomatal conductance for Aleppo pine to estimate its ozone uptake. *Environmental Pollution* 146: 617- 623.
- Emberson, L.** 2003. Air pollution on crops and forests: an introduction. In: L. Emberson, M. Ashmore F. & Murray (eds.). *Air pollution impacts on crops and forests. A global assessment*. Imperial College Press, Singapore, pp. 3-34.

- 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., Kitwiroon, N., Beevers, 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.
- 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.
- 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.
- Fares, S., Matteucci, G., Mugnozza, G.S., Morani, A., Calfapietra, C., Salvatori, E., Fusaro, L., Manes, F. & Loreto, F.** 2013. Testing of models of stomatal ozone fluxes with field measurements in a mixed Mediterranean forest. *Atmospheric Environment* 67: 242-251.
- Feng, Z., Zhuc, J., Tang, H., Oue, H., Uddlinga, J., Pleijel, H., Kobayashi, K. & Guoe, W.** 2012. A stomatal ozone flux-response relationship to assess ozone-induced yield loss of winter wheat in subtropical China. *Environmental Pollution* 164: 16-23.
- Fernandes, F.F.** 2015. Marcadores microscopicos para a validação de sintomas em espécie nativa a ser empregada no biomonitoramento do ozônio. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo.
- 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 & Environment* 28: 1056.
- Franco, A.C. & Luttge, U.** 2002. Midday depression in savanna trees: coordinated adjustments in photochemical efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water-use efficiency. *Oecologia* 131: 356-365.
- 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.
- Fusco, A.C. & Logan, J.A.** 2003. Analysis of 1970–1995 trends in tropospheric ozone at Northern Hemisphere mid-latitudes with the GEOS-CHEM model, *Journal of Geophysical Research* 108: 4449, doi:10.1029/2002JD002742.

- 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.
- 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 dose and response 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.
- 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 del ozono y sus efectos sobre la vegetación: relaciones-respuesta. Tesis de doctorado. 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 annual pasture dynamics: applications 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.
- Gonzalez-Fernandez, I., Kaminska, A., Dodmani, M., Goumenaki, E., Quarrie, S. & Barnes, J.D.** 2010. Establishing ozone flux response relationships for winter wheat: Analysis of uncertainties based on data for UK and Polish genotypes. *Atmospheric Environment* 44: 621-630.

- Gutiérrez-Soto, M, Pacheco, A.N. & Holbrook, M.** 2008. Leaf age and the timing of leaf abscission in two tropical dry forest trees. *Trees* 22: 393–401.
- Halliwell, B. & Gutteridge, C.** 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- 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.
- Hernández, V., Mora, F., Araque, M., De Montijo, S., Rojas, L., Meléndez, P., De Tommasi, N.** 2013. Chemical composition and antibacterial activity of *Astronium graveolens* Jacq essential oil. *Revista Latinoamericana de Química* 41: 89-94.
- Hiram-Jr, H.F.B.** 2010 Espécies com vocação para facilitar processos de restauração espontânea de ecossistemas perturbados na vertente atlântica da Serra do Mar, Pirai – RJ. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Hoshika, Y., Paoletti, H. & Omasa, K.** 2012. Parameterization of *Zelkova serrata* stomatal conductance model to estimate stomatal ozone uptake in Japan. *Atmospheric Environment* 55: 271-278.
- Hoshika, Y., Watanabe, M., Kitao, M., Haberle, K., Grams T.E.E., Koike, T. & Matyssek, R.** 2015. Ozone induces stomatal narrowing in European and Siebold's beeches: A comparison between two experiments of free-air ozone exposure. *Environmental Pollution* 196: 527-533.
- 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.
- 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.
- 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 young trees 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, New York.
- Kinose, Y., Azuchi, F., Uehara, Y., Kanomata, T., Kobayashi, A., Yamaguchi, M. & Izuta, T.** 2014. Modeling of stomatal conductance to estimate stomatal ozone uptake by *Fagus crenata*, *Quercus serrata*, *Quercus mongolica* var. *crispula* and *Betula platyphylla*. *Environmental Pollution* 194: 235-245.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G. & Fomin, A.** 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (Eurobionet). *Revista Brasileira Botânica* 24: 511 – 518.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Rø-Poulsen, H., Ribas, A., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P. & Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* 40: 7437-7448.
- Kolb, T.E. & Matyssek, R.** 2001. Limitations and perspectives about scaling ozone impacts in trees. *Environmental Pollution* 115: 373–393.
- Krupa, S., Mcgrath, M.T., Andersen, C.P., Booker, F.L., Burkey, K.O., Chappelka, A.H., Chevone, B.I., Pell, E.J. & Zilinskas, B.A.** 2001. Ambient ozone and plant health. *Plant Disease* 85: 4-12.
- Lorenzi, H.** 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.
- Krupa, S.V.** 1997. Pollution, People and Plants. APS, New York.
- Martin, M.J., Host, G.E., Lenz, K.E. & Isebrands, J.G.** 2001. Simulating the growth response of aspen to elevated ozone: a mechanistic approach to scaling a leaf-level model of ozone effects on photosynthesis to a complex canopy architecture. *Environmental Pollution* 115: 425–436.
- Massman, W.J.** 1998. A review of the molecular diffusivities of H₂O, CO₂, CH₄, CO, O₃, SO₂, NH₃, N₂O, NO, and NO₂ in air. *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.
- Mills, G., Buse, A., Gimeno, B., Bermejo, V., Holland, M., Emberson, L. & Pleijel, H.** 2007. A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. *Atmospheric Environment* 41: 2630-2643.

- Mills, G., Hayes, F., Wilkinson, S. & Davies, W.J.** 2009. Chronic exposure to increasing background ozone impairs stomatal functioning in grassland species. *Global Change Biology* 15: 1522-1533.
- 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, 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.
- Moura, B.B.** 2013. Análise estruturais e ultraestruturais em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Moura, B.B., Alves, E.S., Souza, S.R. Domingos, M. & Vollenweider, P.** 2014. Ozone phytotoxic potential with regard to fragments of the Atlantic Semi-deciduous Forest downwind of Sao Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* 192: 65-73.
- Moura, B.B., Souza, S.R., Alves, E.S.** 2014. Response of Brazilian native trees to acute ozone dose. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 4220-4227
- Musselman, R.C. & Minnick, T.J.** 2000. Nocturnal stomatal conductance and ambient air quality standards for ozone. *Atmospheric Environment* 34: 719-733.
- 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.
- Pacheco, A.** 2001. Efecto de la edad de la hoja sobre el inicio de la caída del follaje en dos especies del bosque tropical seco com fenología contrastante, *Bombacopsis quinata* (Bombacaceae) y *Astronium graveolens* (Anacardiaceae). Tesis. Universidade de Costa Rica.
- Panek, J.A., Kurpius, M. & Goldstein, A.H.** 2002. An evaluation of ozone exposure metrics for a seasonally drought stressed ponderosa pine ecosystem. *Environmental Pollution* 117: 93-100.
- Paoletti, E. & Grulke, N.E.** 2010. Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. *Environmental Pollution* 158: 2664-2671.
- Paoletti, E.** 2009. Ozone and urban forests in Italy. *Environmental Pollution* 157, 1506-1512.
- Paoletti, E., Contran, N., Bernascone, P., Gunthardt- Goerg, M. & Vollenweider, P.** 2009. Structural and physiological responses to ozone in Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) leaves of

- seedlings and mature trees under controlled and ambient conditions. *Science of the Total Environment* 407: 1631-1643.
- 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.
- 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, São Paulo.
- 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., 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.
- 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.
- Ranford, J. & Reiling, K.** 2007. Ozone induced leaf loss and decreased leaf production of European Holly (*Ilex aquifolium* L.) over multiple seasons. *Environmental Pollution* 145: 355-364.
- Rezende, F.M. & Furlan, C.M.** 2009. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. *Chemosphere* 76: 1445-1450.
- Ribas, A., Peñuelas, J., Elvira, S. & Gimeno, B. S.** 2005. Ozone exposure induces the activation of leaf senescence-related process and morphological and growth changes in seedling of Mediterranean tree species. *Environmental Pollution* 134: 291-300.
- Ribeiro, R.V., Souza, G.M., Oliveira, R.F. & Machado, E.C.** 2005. Photosynthetic responses of tropical tree species from different successional groups under contrasting irradiance conditions. *Revista Brasileira de Botânica* 28:149-161.
- Rodriguez-Burbano, D., Quijano-Celis, C. & Pino, J.** 2010. Composition of the essential oil from leaves of *Astronium graveolens* Jacq grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research* 22: 488-489.

- Salomão A.N. & Leite A.M.C.** 1992. Comportamento de regenerantes de *Astronium urundeuva* (Fr. All) Engler em área sob ação antrópica. *Acta Botanica Brasilica* 6: 2-8.
- 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.
- Santin, D.A.** 1989. Revisão taxonômica do gênero *Astronium* Jacq. e revalidação do gênero *Myracrodruon* Fr. Allemão. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Sanz, M.J., Sanchez, G., Calatayud, V., Gallego, M.T. & Cervero, J.** 2002. La contaminación atmosférica de los bosques: Guía para la identificación de los daños visibles causados por ozono. 1 ed. Ministerio del Medio Ambiente, Madrid.
- 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.
- Silva-Jr, R.S. & Andrade, M.F.** 2013. Validação de poluentes fotoquímicos e inclusão do inventário de emissões no modelo de qualidade do ar WRF/CHEM, para a região metropolitana de São Paulo. *Revista Brasileira de Meteorologia* 28: 105-121.
- 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.
- Strauss-Debenedetti, S. & Bazzaz, F.A.** 1996. Photosynthetic characteristics of tropical trees along successional gradients. In: S.S. Mulkey, R.L. Chazdon & A.P. Smith (eds.). *Tropical forest plant ecophysiology*. Chapman & Hall, New York, p.162-186.
- 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.
- UNECE - United Nations Economic Commission for Europe Convention on Long-range Transboundary Air Pollution.** 2007. Manual on methodologies and criteria for modeling and mapping critical loads e levels and air pollution effects, risks and trends. Disponível em: <http://icpmapping.org>. (acesso em 19 novembro.2014).
- UNECE - United Nations Economic Commission for Europe Convention on Long-range Transboundary Air Pollution.** 2010. Manual on methodologies and criteria for modeling and mapping critical loads e levels and air pollution effects, risks and trends. Disponível em: <http://icpmapping.org>. (acesso em 19 novembro.2014).

- UNECE - United Nations Economic Commission for Europe.** 1988. Critical levels for forest, crops and material Workshop in Bad Harzburg, Germany (final report). Disponível em: <http://www.unece.org/env/lrtap/workinggroups/wge/documents.htm>. (acesso em 19 novembro 2014).
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure.** 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1, Beuth, Berlin.
- Vingarzan R.** 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment* 38: 3431–3442.
- Vollenweider, P., Ottiger, M. & Günthardt-Goerg, M.S.** 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environmental Pollution* 124: 101-118.
- Wagg, S., Mills, G., Hayes, F., Wilkinson, S., Copper, D. & Davies, W.J.** 2012. Reduced soil water availability did not protect two commonly competing grassland species from the negative effects of increasing background ozone. *Environmental Pollution* 165: 91-99.
- 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.
- Wilkinson, S. & Davies, W.J.** 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment* 33: 510-525.
- 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.