

JOSIANE VALERIA SOARES BISON

Ação de indutores químicos (ozônio, salicilato de metila e óxido nítrico) na composição de voláteis de
Croton floribundus Spreng.

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

SÃO PAULO
2016

JOSIANE VALERIA SOARES BISON

Ação de indutores químicos (ozônio, salicilato de metila e óxido nítrico) na composição de voláteis de
Croton floribundus Spreng.

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. SILVIA RIBEIRO DE SOUZA

Ficha Catalográfica elaborada pelo NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA

Bison, Josiane Valéria Soares

Ação de indutores químicos (ozônio, salicilato de metila e óxido nítrico) na composição de voláteis de *Croton floribundus* Spreng. / Josiane Valéria Soares Bison – São Paulo, 2016.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016

*Dedico este trabalho à vida
como um todo.*

“A diversidade é a característica mais marcante do mundo vivo, e isso também vale para os processos do desenvolvimento.”

(Ernst Mayr Isto é biologia (2008), pág. 209)

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço à professora e pesquisadora Dra. Silvia Ribeiro de Souza pela oportunidade, pelo tempo dedicado como orientadora, pelos ensinamentos e pelos momentos de paciência e compreensão.

À Dra. Poliana Ramos Cardoso-Gustavson pelo exemplo profissional, por sua dedicação, como profissional e amizade, e pela maestria em como vê a vida transmitindo todo o seu conhecimento ultrapassando as nossas expectativas. Agradeço também pela colaboração na execução deste trabalho e, por certa maneira, acreditar em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo Instituto de Botânica pela oportunidade e infraestrutura.

Ao Núcleo de Pesquisa em Ecologia, ao Laboratório de Interação Atmosfera Planta (LABIAP) e aos funcionários e colegas ali presentes que, de alguma forma, contribuíram para a execução experimental deste trabalho e pela infraestrutura disponível.

À Universidade Federal do ABC pela infraestrutura disponibilizada.

Aos meus familiares que, sempre que possível, estiveram presentes concedendo apoio e coragem para seguir.

Aos meus amigos, próximos e distantes, e em agradecimento especial ao Renato, Renata, Inácio, Fabricia, Fritz, Rosana e D. Valéria pela presença fiel nos momentos de fraqueza e alegria e por acreditarem em mim.

Às amigas do grupo de pesquisa, Lúcia Baia, Débora Pinheiro, Giselle Pedrosa, Vanessa Bolsoni e Marcela Engela que foram pessoas presentes e fundamentais sempre contribuindo em alguma etapa de realização deste trabalho e pela amizade conquistada ao longo destes anos.

À todos aqueles que tiveram a sua parcela de colaboração para realização e conclusão deste trabalho.

E, por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

RESUMO

As plantas, sendo organismos sésseis, vêm desenvolvendo estratégias adaptativas ao longo de seu processo evolutivo como mecanismo de defesa para lidarem com os efeitos causados por fatores bióticos e abióticos. Dentre estes mecanismos de defesa, a emissão de uma mistura complexa de voláteis atua como respostas de defesa, além de contribuírem nas interações ecológicas. Neste sentido, o presente trabalho buscou caracterizar os voláteis de plantas emitidos, por indução, em lâminas foliares jovens e adultas de *Croton floribundus* Spreng., espécie nativa brasileira, após exposição ao ozônio (O₃) e óxido nítrico (NO), compostos tipicamente presentes em atmosfera poluída, e salicilato de metila (MeSA), um semioquímico. Ainda, avaliou-se o potencial indutor na formação de óxido nítrico e terpenos totais *in situ* e verificou-se a relação entre os voláteis induzidos, após exposições, e aqueles que são reconhecidamente atuantes nas interações ecológicas. Para tanto, o estudo foi conduzido em plântulas de *Croton floribundus*, nas quais foram realizadas exposições aos diferentes tratamentos (O₃, NO e MeSA) ao longo de sete dias. Após as exposições, coletas de compostos orgânicos voláteis foram realizadas seguidas de teste histoquímico para detecção de terpenos e óxido nítrico. Os valores médios dos níveis de emissão dos voláteis emitidos após 2, 4 e 7 dias de exposição não apresentaram diferenças estatísticas. O ozônio foi capaz de monoterpenos tais como, α -pineno, β -pineno, β -ocimeno, sesquiterpenos tais como, cariofileno, α -cadineno alomadendreno, trans-farnesol, oxigenados, por exemplo, nonanal, α -cumil álcool e produtos da via lipoxigenase, salicilato de metila, sendo essa indução diferenciada com relação a idade da folha. O óxido nítrico induziu o monoterpeno β -ocimeno nas lâminas foliares jovens e os sesquiterpenos β -boubureno, β -cubebeno e alomadendreno em lâminas foliares adultas, embora a porcentagem dessa última tenha sido reduzida. Os resultados evidenciaram a dependência da produção do d-limoneno com a presença de óxido nítrico. Já o MeSA foi capaz de induzir o 3-hexen-1-ol, composto que participa das defesas indiretas das plantas, bem como mono e sesquiterpenos em folhas jovens e adultas, embora uma variação na emissão total de cada classe não tenha sido notória. Portanto, o presente trabalho permitiu concluir e comprovar a hipótese levantada: os indutores químicos O₃, NO e MeSA foram capazes de induzirem a emissão de uma mistura complexa de COV que, de acordo com a literatura, são mediadores de interações ecológicas. **Palavras-chave:** ozônio, óxido nítrico, salicilato de metila, *C. floribundus*, compostos orgânicos voláteis.

ABSTRACT

*The plants, being sessile organisms, have developed adaptive strategies along its evolutionary process as a defense mechanism to deal with the effects caused by biotic and abiotic factors. Among these defense mechanisms, the emission of volatile mixture acts as defense responses and contributes to the ecological interactions. In this sense, this study aimed to characterize the plant volatiles by induction in young and adult leaf of *Croton floribundus* after exposure to ozone (O₃) and nitric oxide (NO), compounds found in polluted atmosphere, and methyl salicylate (MeSA), which signals the chemical defense. We evaluate the potential for inducing nitric oxide and total terpenes in situ and verify if the induced volatiles are related to those who are known to be active in ecological interactions. Therefore, the study was conducted in seedlings of *Croton floribundus* Spreng., a Brazilian native species, and exposure to different treatments (O₃, NO and MeSA) for seven days. After sampling of volatile organic compounds collections, histochemical tests for nitric oxide and terpenes detection were performed followed. The mean values of the emission levels of volatile after 2, 4 and 7 days of exposure did not show statistical differences. Ozone was able to induce the volatile monoterpene compounds (eg. α -pinene, β -pinene, β -ocimene), sesquiterpenes (eg., Caryophyllene, cadinene α -alomadendrene, trans-farnesol), oxygenated (eg. Nonanal, α -cumyl), LOX products, MeSA and NO. The age of the leaves was able to interfere in volatile emission. Nitric oxide induced β -ocimene monoterpene in young leaves and sesquiterpenes β -boubureno β -cubebeno and alomadendreno in adult leaves, although the percentage of the latter has been reduced. The results show that d-limonene was NO-dependent. The MeSA was able to induce the 3-Hexen-1-ol, a compound that participates in the indirect defenses of plants, as well as mono and sesquiterpenes in young and adult leaves, although a variation in the total emission of each class was not notorious. We concluded and prove the hypothesis raised that the chemical inducers: ozone, nitric oxide and methyl salicylate, were able to induce the emission of a complex mixture of volatile organic compounds that mediates the ecological interactions.*

*Keys-word: ozone, nitric oxide, methyl salicylate, *C. floribundus*, volatile organic compound.*

ABREVIATURAS

AF	–Ar Filtrado
APC	–Análise de Componentes Principais
CN	–Íon Cianeto
COV	–Compostos Orgânicos Voláteis
cPTIO	–2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido
DAF	–Fluoróforo Diaminofluoresceína Acetato (indicador de NO)
DMAPP	–(E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno
E,E-TMNT	–(E,E) 4-8-12 trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno
E-DMNT	–(E)-4,8 dimethyl-1,3,7 nonatrieno
ERN	–Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	–Espécies Reativas de Oxigênio
FA/LFA	–Lâmina Foliar Adulta
FJ/LFJ	–Lâmina Foliar Jovem
FPP	–Farnesil Pirofosfato
GGPP	–Geranilgeranil Pirofosfato
H ₂ O	–Água
HO ₂	–Hidroperoxi
IPP	–Isopentil Difosfato
JA	–Ácido Jasmônico
K ₃ Fe(CN) ₆	–Ferrocianeto de Potássio
LABIAP	–Laboratório de Interação Atmosfera Planta
LOX	–Via Lipoxigenase
MEP	–Via Metileritritol Fosfato
MeSA	–Salicilato de Metila
MVA	–Via do Mevalonato
N ₂ O ₄	–Tetróxido de Dinitrogênio
NO	–Óxido Nítrico
NO ₂	–Dióxido de Nitrogênio
NPS	–Nitroprussiato de Sódio
ng.MS ⁻¹	–Nanograma por Massa Seca
O ₃	–Ozônio
SA	–Ácido Salicílico
SAR	–Resposta Sistêmica Adquirida
-SH	–Grupos Sufidrilas
RO ₂	–Radicais Peroxi
VFV	–Voláteis de Folhas Verdes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Espécie vegetal em estudo: *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). A: *C. floribundus* em porte arbóreo encontrado em seu ambiente natural. B: Indivíduo jovem utilizado nos experimentos..... 7
- Figura 2 - Visão microscópica das superfícies da lâmina foliar de *Croton floribundus* Spreng. A: superfície adaxial: células epidérmicas com paredes anticlinais retas ou sinuosas e tricomas unisseriado espalhados; B: superfície abaxial: densa camada de tricomas não-secretores estrelares e C: secção transversal. (Extraído de Domingos *et al.* 2015) 7
- Figura 3 - Interações ecofisiológicas: interações entre planta-animais, planta-planta, planta-patógeno como agentes indutores na emissão de compostos orgânicos voláteis (modificado de Dudareva *et al* 2006). 8
- Figura 4 - Árvore biossintética de voláteis de plantas. (Adaptado de Maffei *et al.* 2011). 12
- Figura 5 - Mecanismo simplificado de indução das defesas indiretas das plantas após estresse biótico (Adaptado de Pinto-Zevallos *et al.* 2013)..... 15
- Figura 6 - Modelo simplificado da participação dos voláteis nas defesas químicas das plantas sob estresse abiótico (Adaptado de Vickers *et al.* 2009). ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio; ERO: Espécies reativas de oxigênio; SA: Ácido salicílico; JA: Ácido jasmônico; ET: Etileno; PCD: Morte Celular Programada; HR: Resposta de Hipersensibilidade; VIP; Voláteis Induzidos; OX: Oxidantes e RES: Respostas de Defesa. 16
- Figura 7 - Cultivo de *C. floribundus*. A: Casa de vegetação localizada no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo; B e C: mudas de *C. floribundus* acomodadas sobre caixas de polietileno utilizadas como reservatórios de água, cobertas com grades de metal para suporte dos vasos apoiadas sobre a tela e reservatório de água. 18
- Figura 8 - A: Representação esquemática: três câmaras em estrutura de inox e revestidas de Teflon de 1m³ e com circulação de ar constante utilizada durante as exposições aos diferentes tratamentos. B: Uma das câmaras de exposição utilizada ao longo das exposições em imagem real situada no laboratório. 19

- Figura 9 - Sistema de coleta de voláteis. A: Coleta de voláteis de lâminas foliares jovens completamente expandidas (1). B: Coleta de voláteis de lâminas foliares adultas completamente expandidas (2)..... 22
- Figura 10 – Representação dos perfis cromatográficos dos três diferentes tratamentos realizados ao longo do estudo. A: tratamento ozônio; B: tratamento salicilato de metila e C: tratamento óxido nítrico..... 24
- Figura 11 - Concentrações médias dos voláteis emitidos em folhas jovens de *C. floribundus* entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias para o tratamento O₃ e seu controle (AF) 30
- Figura 12 - Concentrações médias dos voláteis emitidos em folhas adultas de *C. floribundus* entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias para o tratamento O₃ e seu controle (AF)..... 31
- Figura 13 - Distribuição em porcentagem de emissão de compostos orgânicos voláteis após exposição ao ozônio em um período de 7 dias. A e B: exposição em lâminas foliares jovens. C e D: exposição em lâminas foliares adultas. *FJ*: lâmina foliar jovem, *FA*: lâmina foliar adulta; *OX*: oxigenados, *MONO*: monoterpenos; *SESQ*: sesquiterpenos; *VFV*: voláteis de folhas verdes; *ARO*: aromáticos. 32
- Figura 14 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *C. floribundus* sob ação do ozônio. 1: Lâminas foliares jovens controle; 2: lâminas foliares jovens expostas ao ozônio; 3: Lâminas foliares adulta controle; 4: Lâminas foliares adultas exposta ao ozônio. *APINE*: α -pineno; *BPINE*: β -pineno; *BMIR*: β -mirceno; *BOCI*: β -ocimeno; *DLIMO*: D-limoneno; *LINA*: Linalol; *CADI*: α -cadinene; *BOURB*: β -bourboneno; *COPA*: β -copaeno; *CUBE*: β -cubebeno; *ALOMA*: Alomadendreno; *CARI*: Cariofileno; *BFAR*: Cis- β -farneseno; *HEX3OL*: 3-hexen-1ol; *BENZ*: Benzaldeído; *MeSA*: Salicilato de metila; *CUMIL*: α -Cumyl-alcool; *DECA*: decanal; *FARN*: Trans-farnesol; *GERA*: Geranil acetona; *NONA*: nonanal; *NERO*: nerolidol. 33
- Figura 15 - Plântulas de *Croton floribundus* expostos ao ozônio ao longo de 7 dias. Após este período, lâminas foliares jovens e adultas foram submetidas ao reagente DAF-FM (indutor de NO). A e C: tratamento ozônio; B e D: controle (AF). Fluorescência (pontos verdes) indica presença de NO..... 34
- Figura 16 - Plântulas de *Croton floribundus* expostas ao ozônio ao longo de 7 dias. Após este período, lâminas foliares jovens e adultas foram submetidas ao teste

histoquímico Nadi (David & Carde, 1964). A e B: câmara 1 (O₃); C e D: câmara 2 (O₃); E e F: câmara 3 (Controle – AF); G: Branco (Controle – AF). Barras: A: 25 μ m B: 50 μ m C: 75 μ m D-F: 50 μ m G: 250 μ m. EAD: epiderme adaxial. Setas indicam presença de terpenos em algumas células. 35

Figura 17 - Exposição ao ozônio ao longo de sete dias. Comparações entre lâminas foliares jovens expostas ao NPS e seu controle (H₂O deionizada) considerando os períodos de coleta de voláteis. Concentrações médias dos voláteis emitidos entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias. 38

Figura 18 - Distribuição em porcentagem de emissão de compostos orgânicos voláteis em lâminas foliares jovens após exposição ao NPS (nitroprussiato de sódio), cPTIO ((2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido) e K₃Fe(CN)₆ em um período de 7 dias. Exposição em lâminas foliares jovens. OX: *oxigenados*, MONO: *monoterpenos*, SESQ: *sesquiterpenos*, VFV: *voláteis de folhas verdes e* ARO: *aromáticos*..... 39

Figura 19 - Exposição ao ozônio ao longo de sete dias. Comparações entre lâminas foliares adultas expostas ao NPS e seu controle (H₂O deionizada) considerando os períodos de coleta de voláteis. Concentrações médias dos voláteis emitidos entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias. 42

Figura 20 - Distribuição em porcentagem de emissão de compostos orgânicos voláteis após exposição ao NPS (nitroprussiato de sódio), cPTIO ((2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido) e K₃Fe(CN)₆ em um período de 7 dias. Exposição em lâminas foliares adultas. OX: *oxigenados*, MONO: *monoterpenos*, SESQ: *sesquiterpenos*, VFV: *voláteis de folhas verdes e* ARO: *aromáticos*..... 43

Figura 21 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *C. floribundus* sob ação do indutor de NO (NPS): 1 - Folhas jovens controle (H₂O); 2- folhas jovem expostas ao NPS, 3: folhas adulta controle (H₂O), 4 folhas adultas expostas ao NPS APINE: α -pineno; BPINE: β -pineno; BMIR: β -mirceno; BOCI: β -ocimeno; DLIMO: D-limoneno; LINA: Linalol; CADI: α -cadinene; BOURB: β -bourboneno; COPA: β -copaeno; CUBE: β -cubebeno; ALOMA: Alomadendreno; CARI: Cariofileno; BFAR: Cis- β -farneseno; HEX3OL: 3-hexen-1ol; BENZ: Benzaldeído; MeSA: Salicilato de metila; CUMIL: α -Cumyl-alcool; DECA: decanal; FARN: Trans-farnesol; GERA: Geranil acetona; NONA: nonanal; NERO: nerolidol. 44

Figura 22 - Lâminas foliares de *Croton floribundus*. A e B: NPS; C e D: $K_3Fe(CN)_6$; E e F: cPTIO; G e H: Controle (água). Setas brancas indicam regiões com presença de óxido nítrico (fluorescência intensa). 46

Figura 23 - Plantas de *Croton floribundus* expostas ao tratamento doador de NO (NPS). A e B: controle (H_2O deionizada); C e D: lâminas foliares jovens e adultas pulverizadas com doador de NO (NPS) ao longo de sete dias, posteriormente, submetidos ao teste histoquímico Nadi. TG: tricoma glandular. Setas brancas indicam regiões com presença terpenos. Barras: A, B e D: $50\mu m$; C: $75\mu m$ 47

Figura 24 - Exposição ao MeSA ao longo de sete dias. A: lâminas foliares jovens expostas ao MeSA e seu controle (AF); B: lâminas foliares adultas expostas ao MeSA e seu controle (AF). Comparações entre as concentrações médias dos voláteis emitidos entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias. 51

Figura 25 - Exposição ao ozônio ao longo de sete dias. Comparações entre lâminas foliares jovens expostas ao MeSA e seu controle (H_2O deionizada) considerando os períodos de coleta de voláteis. Concentrações médias dos voláteis emitidos entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias 52

Figura 26 - Distribuição em porcentagem de emissão de compostos orgânicos voláteis após exposição à salicilato de metila em um período de 7 dias. A e B: exposição em lâminas foliares jovens. C e D: exposição em lâminas foliares adultas. OX: oxigenados, MONO: monoterpenos, SESQ: sesquiterpenos, VFV: voláteis de folhas verdes e ARO: aromáticos. 53

Figura 27 - Plantas de *Croton floribundus* expostas ao tratamento MeSA ao longo de sete dias. A e B: C e D: lâminas foliares jovens e adultas, respectivamente, submetidas à H_2O deionizada (controle); E e F: lâminas foliares jovens e adultas, respectivamente, submetidas ao teste para detecção de terpenos (Nadi). Setas pretas indicam presença de terpenos. TG: tricoma glandular. Barras: C: $75\mu m$; D,E e F: $50\mu m$ 54

Figura 28 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *C. floribundus* sob ação de MeSA. 1: Lâminas foliares jovens controle; 2: Lâminas foliares jovens expostas ao MeSA; 3: Lâminas foliares adulta controle; 4: Lâminas foliares adultas expostas ao MeSA APINE: α -pineno; BPINE: β -pineno; BMIR: β -mirceno; BOCI: β -ocimeno; DLIMO: D-limoneno; LINA: Linalol; CADI: α -cadinene; BOURB: β -bourboneno; COPA: β -copaeno; CUBE: β -cubebeno; ALOMA: Alomadendreno; CARI: Cariofileno; BFAR: Cis- β -

farneseno; HEX3OL: 3-hexen-1ol; BENZ: Benzaldeído; MeSA: Salicilato de metila; CUMIL: α-Cumyl-alcool; DECA: decanal; FARN: Trans-farnesol; GERA: Geranil acetona; NONA: nonanal; NERO: nerolidol 55

Figura 29 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por lâminas foliares jovens de *C. floribundus* sob ação dos tratamentos O₃, NO e MeSA e seus respectivos controles. O₃: ozônio, O_{3CT}: controle; NO: indutor de óxido nítrico (NPS), NO_{CT}: controle; MeSA: salicilato de metila, MeSA_{CT}: controle. *APINE: α-pineno; BPINE: β-pineno; BMIR: β-mirceno; BOCI: β-ocimeno; DLIMO: D-limoneno; LINA: Linalol; CADI: α-cadinene; BOURB: β-bourboneno; COPA: β-copaeno; CUBE: β-cubebeno; ALOMA: Alomadendreno; CARI: Cariofileno; BFAR: Cis-β-farneseno; HEX3OL: 3-hexen-1ol; BENZ: Benzaldeído; MeSA: Salicilato de metila; CUMIL: α-Cumyl-alcool; DECA: decanal; FARN: Trans-farnesol; GERA: Geranil acetona; NONA: nonanal; NERO: nerolidol. 57*

Figura 30 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por lâminas foliares adultas de *C. floribundus* sob ação dos tratamentos O₃, NO e MeSA e seus respectivos controles. O₃: ozônio, O_{3CT}: controle; NO: indutor de óxido nítrico (NPS), NO_{CT}: controle; MeSA: salicilato de metila, MeSA_{CT}: controle. *APINE: α-pineno; BPINE: β-pineno; BMIR: β-mirceno; BOCI: β-ocimeno; DLIMO: D-limoneno; LINA: Linalol; CADI: α-cadinene; BOURB: β-bourboneno; COPA: β-copaeno; CUBE: β-cubebeno; ALOMA: Alomadendreno; CARI: Cariofileno; BFAR: Cis-β-farneseno; HEX3OL: 3-hexen-1ol; BENZ: Benzaldeído; MeSA: Salicilato de metila; CUMIL: α-Cumyl-alcool; DECA: decanal; FARN: Trans-farnesol; GERA: Geranil acetona; NONA: nonanal; NERO: nerolidol. 58*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais indutores e seus voláteis induzidos em diferentes espécies vegetais.....	5
Tabela 2 - Períodos em que as repetições dos experimentos foram realizadas.	20
Tabela 3 - Concentração média de voláteis (ng.MS ⁻¹) e erro padrão: tratamento ozônio comparado ao controle (AF). Negrito indica diferença significativa (p<0,05).	28
Tabela 4 - Concentração média de voláteis (ng.MS ⁻¹) e erro padrão: tratamento óxido nítrico (lâminas foliares jovens) comparado ao controle. Negrito indica diferença significativa (p<0,05).	37
Tabela 5 - Concentração média de voláteis (ng.MS ⁻¹) e erro padrão: tratamento óxido nítrico (lâminas foliares adultas) comparado ao controle. Negrito indica diferença significativa (p<0,05).	41
Tabela 6 - Concentração média de voláteis (ng.MS ⁻¹) e erro padrão: tratamento salicilato de metila comparado ao controle. Negrito indica diferença significativa (p<0,05).	50

SUMÁRIO

abreviaturas	VIII
lista de figuras.....	IX
lista de tabelas.....	XIV
sumário.....	XV
1. Introdução Geral.....	1
2.3 Principais Grupos Químicos Que Atuam Como Voláteis De Plantas E Suas Rotas Metabólicas	11
2.4 Indutores De Voláteis De Planta E Seus Mecanismos.....	13
3. Objetivos	17
4. Material E Métodos	18
4.1 Material Vegetal.....	18
4.2 Exposição	19
4.3 Tratamentos Com Indutores Químicos.....	19
4.3.1 Ozônio.....	20
4.3.2 Óxido Nítrico.....	20
4.3.3 Salicilato De Metila	21
4.4 Coleta E Análise Dos Compostos Orgânicos Voláteis.....	22
4.5 Localização <i>In Situ</i> De No E Terpenos	25
4.6 Tratamento Dos Dados	26
5. Resultados.....	27
5.1. Caracterização Dos Compostos Orgânicos Voláteis Induzíveis	27
5.1.2 Voláteis Induzidos Por Ozônio	27
5.1.3 Voláteis Induzidos Por Óxido Nítrico	36
5.1.4 Voláteis Induzidos Por Salicilato De Metila.....	48
5.2 Relação Entre Os Voláteis Induzidos E Os Indutores Ozônio (O ₃) Óxido Nítrico (No) E Metil Salicilato (Mesa).	56
6. Discussão	59
7. Considerações Finais.....	65
8. Referências	68

1. Introdução geral

Ao longo de sua evolução, as plantas vêm desenvolvendo diferentes estratégias para adaptarem seu ciclo de vida aos desafios impostos pelo ambiente no qual vivem (Baluska, 2010). Para lidar com os efeitos dos fatores ambientais, sejam eles bióticos ou abióticos, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesas (Hassan, 2015; Maffei *et al.*, 2011) dentre eles, a emissão de grande quantidade de compostos orgânicos voláteis (COV), em concentração e composição, que podem fornecer informações específicas sobre as condições fisiológicas da planta, tornando possível a adaptação às condições ao seu redor (Baluska, 2010; Blande *et al.*, 2014). Compostos orgânicos voláteis podem ser lançados para a atmosfera por via de flores, folhas e frutos, enquanto suas raízes os lançam ao solo (Dudareva *et al.*, 2006).

Esses compostos voláteis eram considerados como produtos do metabolismo secundário que não tinham nenhuma função ecológica aparente (Bennett & Wallsgrove, 1994; Cornell & Hawkins, 2003; Dudareva *et al.*, 2004). Cerca de 1% destes compostos voláteis fazem parte da constituição dos metabólitos secundários das plantas dos quais são representados por terpenóides, fenilpropanóides/benzenóides, derivados de ácidos graxos e derivados de aminoácidos (Dudareva *et al.*, 2006; Del-Claro & Torezan-Silingardi, 2012). Dentre os considerados atuantes nas interações ecológicas, destacam-se isopreno, linalol, alomadendreno, β -cariofileno, β -farneseno, (E)-4,8 dimethyl-1,3,7 nonatrieno (E-DMNT) e (E,E) 4-8-12 trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (E,E-TMNT), salicilato de metila, 3-hexen-1-ol, d-limoneno, β -mirceno entre outros (Dudareva *et al.*, 2006). Entretanto, as novas descobertas sobre as múltiplas funções dos COV destacam-se a importância química e biológica desses compostos no meio ambiente (Dudareva *et al.*, 2006; Dicke *et al.*, 2009; Holopainen & Gershenzon, 2010). Eles oferecem à planta defesa contra o agente estressor e permitem a comunicação entre a planta e o meio ambiente. (Blande *et al.*, 2007; Arimura *et al.*, 2009; Holopainen & Gershenzon, 2010).

Os voláteis se locomovem dentro da planta promovendo conjunto de defesas que podem gerar resposta sistêmica, sinalizando às partes sadias das plantas à presença do agente agressor (Blande *et al.*, 2010; Van Loon & Van Strien, 1999; Durrant & Dong, 2004). De acordo com Baluska *et al.* (2010), provavelmente, as plantas utilizam COV como sinalizadores por via aérea, e não por via de feixes vasculares, devido à velocidade no qual a informação chegaria às outras partes sadias da planta.

Esses compostos podem estar presentes nas plantas de forma constitutiva ou induzidas, como resposta ao estresse biótico ou abiótico (Del-Claro & Torezan-Silingardi, 2012). A indução ocorre a partir de elicitores naturais, como a volicitina e β -glucosidase, que são provenientes da secreção oral de herbívoros, ou elicitores exógenos, como os hormônios jasmonato (JA) e salicilato de metila (MeSA) que são comumente utilizados para aumentar as defesas de cultivares agrícolas (Pinto-Zevallos *et al.*, 2013). Uma vez induzido, os COV são dispersos na atmosfera local atuando nas interações tróficas, atraindo e/ou repelindo inimigos naturais ou emitindo sinais para plantas saudáveis a fim de engatilhar a ativação de mecanismos de defesas químicas (Dudareva *et al.*, 2006).

Quando emitidos em grandes quantidades pelas plantas, apresentam implicações importantes para a química da atmosfera (Calfapietra *et al.*, 2009). Segundo Guenther *et al.* (1995), os COV oriundos da vegetação, na presença de óxidos de nitrogênio (NO, NO₂, N₂O₄) e luz solar, dão início a inúmeras reações em cadeia produzindo ozônio (O₃) em concentrações expressivas. Altas concentrações de O₃ em regiões urbanas fossem provenientes dos processos fotoquímicos regidos pelos óxidos de nitrogênio (NO, NO₂) e compostos orgânicos oriundos de fontes antrópicas. Segundo Calfapietra *et al.* (2009), florestas urbanas e suburbanas emitem altas concentrações de voláteis que atuam ativamente nos processos fotoquímicos atmosféricos contribuindo para o acúmulo ainda maior de O₃ troposférico. Este composto é um dos poluentes mais agressivos à vegetação, pois induz o estresse oxidativo, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no meio celular, os quais descaracterizam moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando, entre outras consequências, à peroxidação lipídica, oxidação dos grupos sulfidril (-SH) e a outros processos de destruição celular (Halliwell & Gutteridge 1989; Vaultier & Jolivet, 2015) podendo desencadear sintomas foliares, como injúrias visíveis, como ocorrem em espécies nativas brasileiras (*Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr., *Croton floribundus* Spreng., *Astronium graveolens* Jacq.) (Moura, 2013). No entanto, antes que ocorram sintomas visíveis, o O₃ pode induzir a produção de voláteis de plantas (Pinto *et al.*, 2010). Alguns autores tem relatado que altos níveis de terpenos são produzidos em espécies vegetais de regiões temperadas e de florestas de coníferas quando expostas a este poluente (Holopainen, 2004; Pinto *et al.*, 2007a).

Outros contaminantes atmosféricos podem também atuar como elicitores de voláteis de planta. O óxido nítrico (NO), por exemplo, encontrado comumente na

atmosfera (Hayat *et al.*, 2010) e se destaca por ser uma molécula sinalizadora de inúmeras respostas ao estresse biótico e abiótico em plantas (Roszer, 2011). Por apresentar natureza lipofílica, o NO se difunde facilmente através da membrana celular, sendo reconhecido como mensageiro biológico de plantas, regulando diversos processos fisiológicos e bioquímicos (Hayat *et al.*, 2010). Além disso é um radical livre altamente reativo interagindo com moléculas presentes tanto intra quanto extracelulares (Neill *et al.*, 2008; Hayat *et al.*, 2010). O NO apresenta ampla atividade biológica, sendo produzido pelas células vegetais (Neill *et al.*, 2008). Ainda, dependendo da concentração de NO no meio celular, ele pode agir como espécie antioxidante por ser capaz de sequestrar as espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são responsáveis pela degradação celular com aparente função citoprotetora devido à sua habilidade na regulação dos níveis e toxicidade de ERO (Hayat *et al.*, 2010).

Compostos orgânicos voláteis aromáticos como salicilato de metila (MeSA), um éster benzenóide (Dudareva *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010), pode ser produzido a partir da metilação de ácido salicílico (Maffei *et al.*, 2011) sendo encontrado em abundância na atmosfera, oriundo da própria vegetação, que por apresentar baixa reatividade persiste por vários dias na atmosfera, podendo atuar como elicitador de voláteis de planta. MeSA é uma molécula sinalizadora importante, em relação ao mecanismo de defesa em plantas, capaz de induzir resistência às doenças locais ou sistêmicas (Hayat *et al.*, 2010).

Há inúmeros estudos que avaliam a ação dos elicitores de voláteis em plantas e, na sua grande maioria, investigam o seu potencial na indução de voláteis que são atuantes nas interações ecológicas, especialmente aqueles que podem agir diretamente na atração de inimigos naturais (Tabela 1). Nesse contexto, os indutores de voláteis são considerados como estratégias ecológicas sustentáveis para o programa de manejo integrado de pragas e, os estudos, são dedicados a cultivares agrícolas de alta importância econômica. Entretanto, há uma real necessidade de estudos sobre sistemas naturais, já que estes sistemas podem ser muito afetados pela contaminação ambiental. Com a fragmentação de ecossistemas naturais, muitas espécies nativas estarão cada vez mais expostas às atmosferas contaminadas e uma compreensão do efeito destes contaminantes nas interações, destes COV e o ambiente, é fundamental. Ressalta-se que os estudos de voláteis induzidos em espécies nativas brasileiras são escassos, e não se tem relatos de estudos que buscam investigar o efeito de compostos, como ozônio, óxido nítrico e salicilato de metila, na indução de voláteis de plantas nativas. Neste contexto, estudos como o realizado neste trabalho são importantes para revelar aspectos

ainda não conhecidos das interações ecológicas em atmosfera contaminada, cenário no qual se insere as atuais previsões das mudanças climáticas globais.

Tabela 1 – Principais indutores e seus voláteis induzidos em diferentes espécies vegetais.

Composto induzido	Espécie Vegetal	Indutor	Referência
α-pineno	<i>Diospyros kaki</i> L. (caqui); (<i>P. tremula</i> L. <i>P. tremuloides</i> Michx.) clone 110; <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desiree	<i>Ceroplastes japonicus</i> e MeJA; O ₃ ; <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	Blande <i>et al.</i> , 2007; Gosset <i>et al.</i> , 2009
β-pineno	<i>Pinus pinaster</i> ; (<i>P. tremula</i> L. <i>P. tremuloides</i> Michx.) clones 55 e 110	MeJA; O ₃	Sampedro <i>et al.</i> , 2010; Blande <i>et al.</i> , 2007
d-limoneno	<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desiree	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	Gosset <i>et al.</i> , 2009
β-ocimeno	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv SR1; Independente da espécie;	<i>Macrosiphum euphorbiae</i> ; Independente do estressor (biótico/abiótico)	Cascone <i>et al.</i> , 2015; Baluska e Ninkovic, 2010
Linalol	Independente da espécie;	Independente do estressor (biótico/abiótico)	Baluska e Ninkovic, 2010
Cariofileno	<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desiree	<i>Myzus persicae</i> Sulzer, O ₃ , NO	Gosset <i>et al.</i> , 2009; Souza <i>et al.</i> , 2013
Alomadendreno	<i>Phaseolous lunatu</i> ;	ozônio	Pinto <i>et al.</i> , 2010
3-hexen-1-ol	<i>Arabidopsis</i> ; milho <i>Phaseolus lunatus</i>	<i>Cotesia glomerata</i> ; indol Ozônio, NO	Ozawa <i>et al.</i> , 2013; Erb <i>et al.</i> , 2015
MeSA	Independente da espécie;	Independente do estressor (biótico/abiótico)	Baluska e Ninkovic, 2010
Nonanal	<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desiree	<i>Myzus persicae</i> Sulzer e <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	Gosset <i>et al.</i> , 2009
β-farnesene	Independente da espécie; <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desiree	Independente do estressor (biótico/abiótico); <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say, O ₃ , NO	Baluska e Ninkovic, 2010; Gosset <i>et al.</i> , 2009, Souza <i>et al.</i> , 2013

2. Revisão Bibliográfica

Será apresentada nesta seção uma breve descrição dos estudos reportados pela literatura sobre os diversos tópicos que consideramos importantes para melhor compreensão dos estudos realizados neste trabalho.

2.1 Espécie vegetal: *Croton floribundus* Spreng.

A família Euphorbiaceae ocorre em fragmentos florestais, sendo estes fragmentos impactados por altos níveis de ozônio (Moura, 2013), sendo uma das mais comuns nas formações naturais brasileiras, e o gênero *Croton* presente em quase todos os ecossistemas (Lorenzi 1992). *Croton floribundus* Spreng. é classificado como uma espécie pioneira na sucessão ecológica ocorrendo, principalmente, na Floresta Estacional Semidecídua, uma planta nativa crescendo na fase jovem da mata (Figura 1) (Lorenzi, 1992).

Devido às interferências antrópicas, por exemplo, pela extração de madeira, grandes clareiras são formadas ocorrendo, conseqüentemente, o surgimento de vegetação secundária provocando modificação da composição florística (Rondon-Neto *et al.*, 2000). De acordo com estudos realizados por Rondon-Neto *et al.* (2000), Euphorbiaceae apresenta um maior número de espécies arbustivo-arbóreas regenerando em clareiras e, dentre as espécies, *C. floribundus* Spreng. se destaca por apresentar maior valor de importância, regeneração natural total e posição sociológica relativa.

Além disso, é atribuído ao *C. floribundus* a capacidade em tolerar estresse oxidativo imposto pelo ambiente, acumulando elementos tóxicos presentes no ambiente em que vivem, tais como cobre, cádmio, manganês, níquel, enxofre e zinco (Domingos *et al.*, 2015). Ainda de acordo com Domingos *et al.* (2015), *C. floribundus* apresenta em sua superfície adaxial cutícula lisa, células epidérmicas, aparentemente, com paredes anticlinais retas ou sinuosas e tricomas unisseriados espalhados, enquanto na superfície abaxial, há a presença de uma densa camada de tricomas não-secretores estrelares (Figura 2), conferindo-lhe uma alta resistência a ataques por herbívoros.

Estudo realizados por Moura (2013), revelaram que *C. floribundus* tem se mostrado bastante tolerante ao efeito do ozônio, especialmente por apresentar sistema antioxidante eficiente, o que levanta a hipótese de que essa espécie seria capaz de liberar voláteis atuantes nas defesas químicas, sendo possível tolerar ainda mais ao estresse oxidativo.

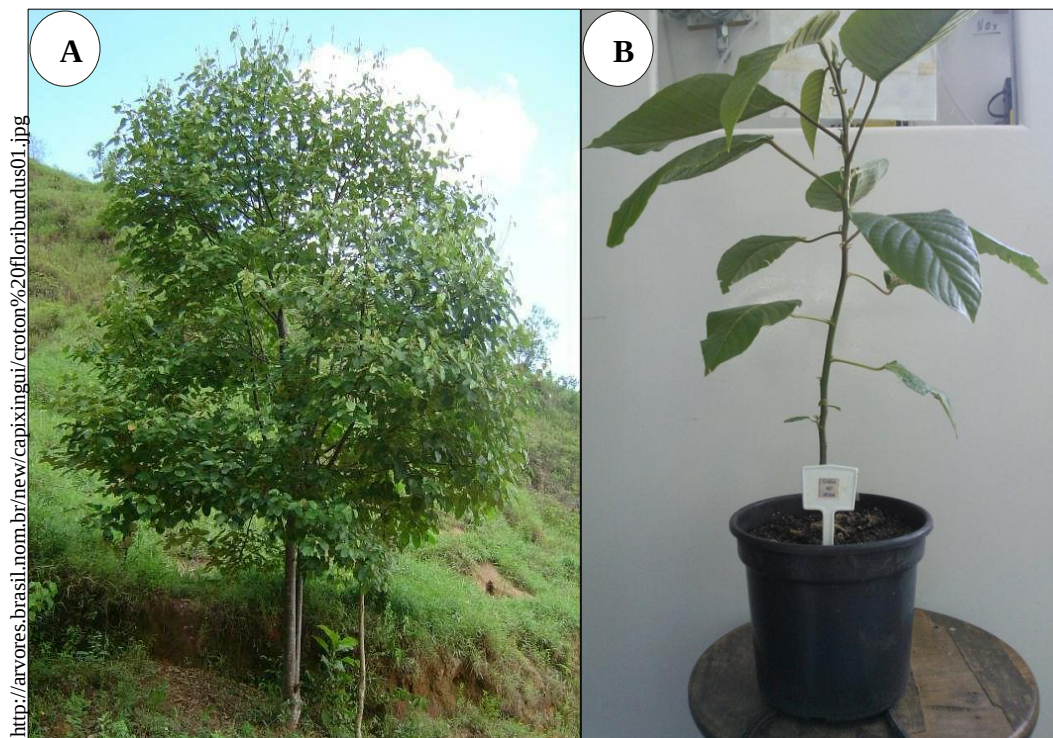


Figura 1 - Espécie vegetal em estudo: *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). A. *C. floribundus* em porte arbóreo encontrado em seu ambiente natural. B: Indivíduo jovem utilizado nos experimentos.

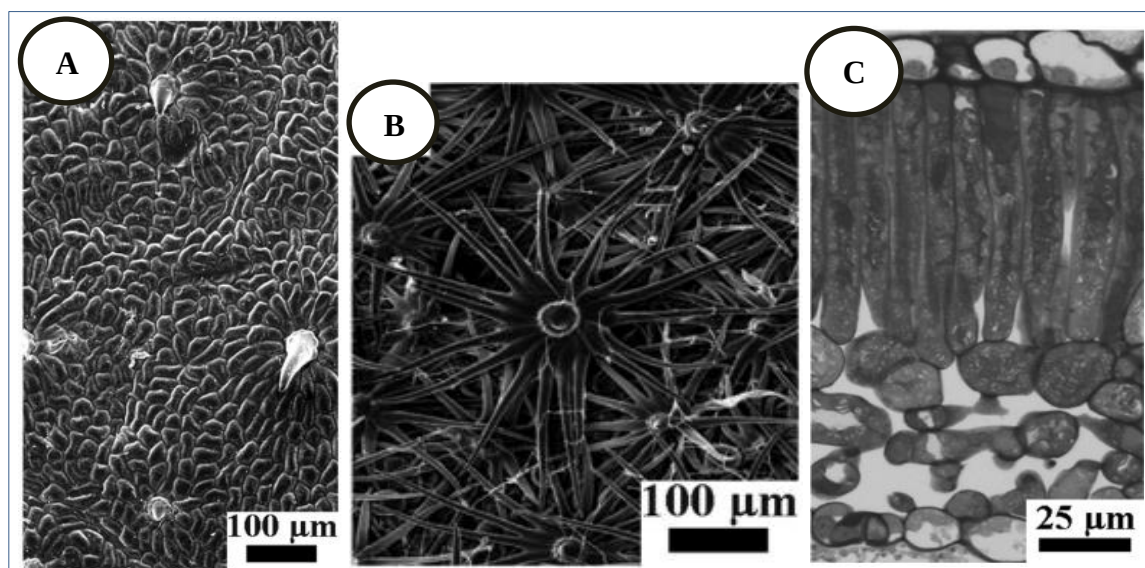


Figura 2 - Visão microscópica das superfícies da lâmina foliar de *Croton floribundus* Spreng. A: superfície adaxial: células epidérmicas com paredes anticlinais retas ou sinuosas e tricomas unisseriado espalhados; B: superfície abaxial: densa camada de tricomas não-secretores estrelares e C: secção transversal. (Extraído de Domingos *et al.* 2015)

A sinalização de plantas vizinhas por meio da emissão de voláteis pode desempenhar papel importante na preservação da vegetação, estimulando as defesas induzidas que podem tornar as plantas mais resistentes aos ataques futuros (Baluska & Ninkovic, 2010; Blande *et al.*, 2014).

A vegetação pode produzir mais de 100.000 compostos químicos durante seu crescimento e desenvolvimento, dos quais, pelo menos, 1.700 se enquadram na classe dos voláteis (Dicke *et al.*, 2009). Estes compostos voláteis podem ser liberados por diversos órgãos das plantas, tais como flores, frutas, raízes e folhas (Dudareva *et al.*, 2006, Laothawornkitkul *et al.*, 2009). Em situações de estresse, biótico ou abiótico, as plantas podem produzir uma variedade de voláteis, denominados induzidos, bem distintos dos produzidos por indivíduos sadios (Brayet *et al.*, 2000; Gouinguene *et al.*, 2002; Niinemets *et al.*, 2004; Vickers *et al.*, 2009; Kegge *et al.*, 2009). O papel dos voláteis de plantas induzidos nas interações tróficas tem sido evidenciado através de estudos que avaliam respostas eletrofisiológica e comportamental do inimigo natural (Shiojiri *et al.*, 2000; Smid *et al.*, 2002) e estas tem sido demonstradas em muitos sistemas que incluem plantas mono- e dicotiledôneas (arbustivas e arbóreas), artrópodes (mastigadores e sugadores), e artrópodes (predadores e parasitoides) de muitas ordens taxonômicas (Pinto-Zevallos *et al.*, 2013).

Os voláteis induzidos apresentam grande variabilidade e dependem da espécie vegetal e do fator de estresse. Também variam com o genótipo e, neste caso, entre partes da planta e de acordo com o tempo de estresse (Pinto-Zevallos *et al.*, 2013). Por exemplo, *Nicotiana tabacum*, sob estresse biótico, emitem mais voláteis de folhas verdes no período diurno em relação ao noturno, em contrapartida, os monoterpenos são mais emitidos à noite (Rayn, 2001). Neste caso, a composição diurna dos voláteis atua diretamente na atração do inimigo natural enquanto que a composição do *bouquet* noturno repele a ovoposição (Rayn, 2001, Moraes *et al.*, 2001).

A taxa de liberação de voláteis de plantas pode ser afetada por diversos fatores ambientais, tais como: temperatura, luz e concentração de CO₂ atmosférico (Niinemets *et al.*, 2013; Niinemet & Monson, 2013). Além disso, também afetam a liberação destes voláteis certas condições das plantas, como os compostos endógenos, os ritmos circadianos, a idade da folha (Niinemets *et al.*, 2004) e a idade da planta como um todo (Shiojiri & Karban, 2006).

Recentemente, tem-se demonstrado que os COV induzidos sinalizam as plantas sadias à presença de agentes agressores à sua vizinhança - fenômeno conhecido como

comunicação entre plantas (Heil & Bueno, 2007) - elicitando um maior aporte de suas defesas químicas, a fim de prepará-las para um futuro evento de estresse (Frost *et al.*, 2008). Por exemplo, as defesas químicas de plantas saudáveis de *Populus deltoides*, sinalizadas pelo conteúdo total de fenólicos, é aumentada pela ação dos voláteis metil jasmonato e salicilato de metila liberados por plantas danificadas (You *et al.*, 2006). Esses voláteis podem alcançar as plantas a longas distâncias da fonte emissora e agir nas respostas sistêmicas adquiridas dessas plantas de forma a ativar as rotas de defesas químicas (Heil & Ton, 2008).

De maneira mais abrangente, os compostos voláteis estão fortemente envolvidos em diversos processos químicos atmosféricos, por meio da captura de radicais hidroxilas e O_3 troposférico, bem como participando na formação de aerossol secundário (Holopainen *et al.*, 2004; Joutsensaari *et al.*, 2005; Laothawornkitkul *et al.*, 2009). Há de se considerar que os COV são altamente reativos ao O_3 e, na atmosfera, essa combinação pode levar a degradação de alguns compostos com funções ecológicas bem definidas (Frederick *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2007a; Blande *et al.*, 2010). A oxidação dos voláteis pelo O_3 troposférico resulta, muitas vezes, em compostos orgânicos inativos às defesas químicas e a comunicação entre plantas (Pinto *et al.*, 2007b; Blande *et al.*, 2010) mas, por outro lado, ativos aos processos químicos atmosféricos (Grosjean *et al.*, 1993; Laothawornkitkul *et al.*, 2009; Lelieveld *et al.*, 2008).

É bem conhecido o papel dos COV como precursores de processos fotoquímicos ocorridos na atmosfera, sendo eles um dos principais precursores na formação de O_3 troposférico (Brausser *et al.*, 1999; Carter *et al.*, 2005). Os COV participam de reações na atmosfera, sequestrando radicais hidroxilas e dando origem aos radicais peroxi (RO_2). Em atmosfera poluída, onde há presença suficiente de NO_x , os RO_2 oxidam NO a NO_2 , o qual podem ser fotodissociados, levando ao acúmulo de O_3 (Wennberg & Dabdub, 2008). Por outro lado, em atmosfera limpa, onde é esperada baixa concentração de NO_x , os RO_2 podem recombinar ou reagir com hidroperoxi (HO_2) para formar peróxidos menos ativos na produção de O_3 (Lelieveld *et al.*, 2008). Outra importante ação dos COV na atmosfera é a sua capacidade de reagir com o O_3 , formando ozonidas, que sofrem rápida decomposição, gerando radicais orgânicos que medeiam a produção de outras espécies reativas na atmosfera, incluindo nitrato de peroxiacetila, aldeídos e ácidos orgânicos (Atkinson & Arey, 2003; Carter *et al.*, 2005).

Além disso, os COV de plantas não apenas influenciam a química da fase gasosa, mas também podem conduzir a formação de aerossol na atmosfera (Claeys *et al.*, 2004; Virtanen *et al.*, 2011). O mecanismo em que os COV levam a formação de partículas ainda não está claro, mas é nítido que a oxidação desses compostos gera produtos com baixa pressão de vapor e são facilmente condensados em sub-partículas (Leaith *et al.*, 1999; Joutsensaari *et al.*, 2005; Virtanen *et al.*, 2011). Observações de campo e de laboratório têm mostrado que os terpenos e sesquiterpenos emitidos pelas florestas coníferas são fontes significativas de aerossol secundário, podendo alcançar mais que 80% do aerossol detectado nessa região (Hoffmann *et al.*, 1997). Neste cenário, a alta reatividade dos COV implica em mudanças na composição da atmosfera que pode levar a distúrbios nas interações químicas e biológicas mediadas pelos voláteis de planta (Holopainen, 2004; Yuan *et al.*, 2009).

2.3 Principais grupos químicos que atuam como voláteis de plantas e suas rotas metabólicas

Os voláteis de plantas são o resultado de muitas vias bioquímicas, levando à produção de uma grande variedade de compostos. A biossíntese e emissão de voláteis inclui produtos da via lipoxigenase (LOX), como voláteis de folhas verdes (VFV), bem como terpenóides, incluindo isopreno, alguns derivados de carotenóides, indóis e fenóis, incluindo salicilato de metila (MeSA) e aromáticos. A via metileritritol fosfato (MEP) origina os monoterpenos e diterpenos. Diterpenos são precursores do homoterpeno (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) e derivados de carotenoides, como o β -ionona. Isoprenos são formados a partir de (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMAPP). Já os sesquiterpenos são produzidos pelo farnesil pirofosfato (FPP), a partir da via do mevalonato citossólico (MVA). O sesquiterpeno nerolidol gera o homoterpeno dimetilalil difosfato (DMTT). Ácidos graxos dão origens às oxilipinas que, então, originam os VFV e derivados de jasmonatos. Antranilatos formam os voláteis indoles e voláteis aromáticos, tais como eugenol, derivados de fenilpraponoides. MeSA deriva do ácido salicílico (SA), que é originado pelo ácido benzoico (Figura 4).

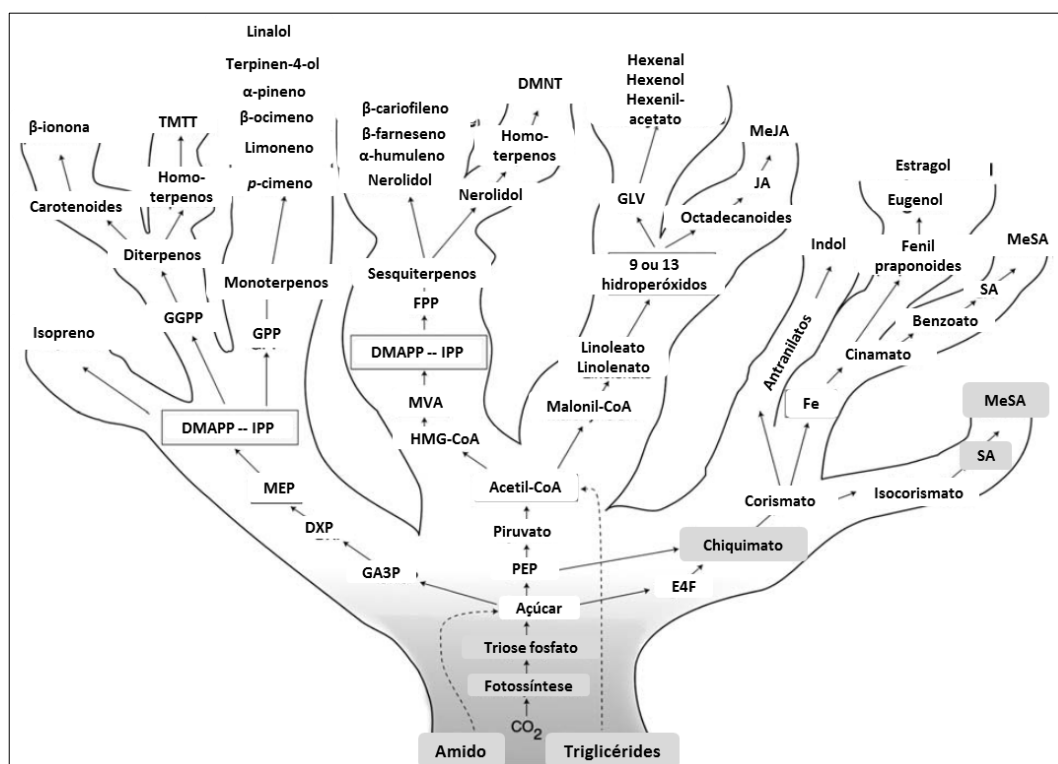


Figura 4 - Árvore biossintética de voláteis de plantas. (Adaptado de Maffei *et al.* 2011).

Os VFV têm sido descritos como compostos atuantes na defesa das plantas, participando das interações entre planta-planta e plantas e outros organismos, permitindo reconhecimento ou competição entre eles (Matsui, 2006; Baluska, 2010; Hassan *et al.*, 2015). Em geral, os VFV são induzidos por herbivoria e danos mecânicos, mas há relatos desses compostos serem induzidos por O_3 e NO (Souza *et al.*, 2013) bem como por hormônios indutores de defesa (Chen *et al.*, 2009) e em resposta a danos provocados por patógenos e insetos (Pinto-Zevallos *et al.*, 2013). Essa classe de voláteis é formada principalmente por aldeídos e por álcoois C_6 e seus ésteres, produzidos através da rota da enzima lipoxigenase (LOX) (Gigot *et al.*, 2010). Após o rompimento do tecido foliar, por fatores bióticos ou abióticos, os VFV são rapidamente lançados como resposta ao estresse (Hassan *et al.*, 2015) e o composto (Z)-3-hexanal é o primeiro produto formado pela via LOX (Matsui *et al.*, 2006).

Voláteis isoprenóides são representados por membros das classes de 5 carbonos (C_5 -hemiterpenos); 10 carbonos (C_{10} -monoterpenos) e 15 carbonos (C_{15} -sesquiterpenos) (Figura 4). Em geral, esses compostos também pertencem à composição de óleos essenciais. O grau de volatilidade dos terpenóides depende muito

das suas características químicas, como oxigenação, número de duplas ligações, número de carbonos em sua estrutura entre outros.

A biossíntese dos isoprenóides tem sido exaustivamente estudada (Dudareva *et al.*, 2006). Isoprenóides são produzidos a partir do isopentil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), que são sintetizados pela via do 2- C- metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP), no cloroplastos, e pela rota do mevalonato (MVA) no citoplasma, no geral. A enzima farnesil pirofosfato sintase catalisa a formação de duas moléculas de IPP e uma de DMAPP para formar farnesil pirofosfato (FPP), o precursor de sesquiterpenos. Nos plastídios, o IPP origina isopreno pela via do 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP). Os monoterpenos são produzidos pela condensação de uma molécula de IPP e uma de DMAPP catalisada pela enzima geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) sintase. Da mesma forma, a enzima geranyl pirofosfato sintase catalisa a condensação de 3 moléculas IPP e uma de DMAPP para formar o geranylgeranyl pirofosfato sintase (GGPP), precursor de diterpeno (Pinto-Zevallos *et al.*, 2013).

O isopreno é o mais simples isoprenóide emitido por plantas (C₅) e é sintetizado via MEP pela ação da isopreno sintase. Plantas que emitem isopreno são mais tolerantes ao estresse à altas e baixas temperaturas e ação do O₃ (Loreto *et. al* 2001). Segundo Loreto *et al.* (2001), a emissão de isopreno ocorre apenas quando a planta já satisfaz sua necessidade de terpenos superiores (hormônios, poliesterois e pigmentos fotossintéticos). Monoterpenos são tipicamente produtos de folhas e os sesquiterpenos de flores, embora seja muito comum encontrar β-ocimeno, mirceno, linalol, α-pineno β-pineno no *bouquet* floral. Ainda, quantidade considerável de monoterpenos e sesquiterpenos são também produzidos em tricomas glandulares, constitutivamente.

2.4 Indutores de voláteis de planta e seus mecanismos

Em condições naturais, a vegetação encontra-se constantemente exposta aos fatores bióticos e abióticos que podem ocasionar indução de voláteis de planta. A herbivoria e patogenia podem provocar injúrias foliares com potencial em desencadear mecanismos de defesa a partir da emissão de produtos da via lipoxigenase, sendo eles aldeídos, álcoois e seus ésteres. Elicitores isolados das secreções orais dos herbívoros entram em contato com áreas danificadas da planta engatilhando respostas de defesas químicas. Há uma gama de elicitores reportados na literatura, entre eles podemos citar

as enzimas (β -glucosidase), aminoácidos, graxos conjugados (volicintina), suforácidos graxos (caeliferinas), fragmentos da parede celular (pectinas e oligogalacturonidas) peptídeos liberados das proteínas durante a digestão da herbivoria (inceptinas) (Pinto-Zevallos *et al.*, 2013). A volicitina (N-17-hidroxinolenoil-L-glutamina) é um dos principais componentes responsáveis na indução de respostas após ataques de herbivoria. Há receptores específicos para os elicitores, os quais ativam rapidamente uma série de respostas, incluindo a despolarização do potencial da membrana e influxo de cálcio, ativação da proteína quinase, geração de espécies reativas de oxigênio e produção de óxido nítrico culminando na produção de ácido jasmônico que sinaliza a produção de voláteis (Maffei *et al.*, 2007).

De modo geral, a indução da defesa começa com respostas locais ao dano que podem induzir diversos processos metabólicos na planta, levando a liberação de compostos orgânicos voláteis induzidos (Baldwin *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 2007). Por exemplo, há emissão de ácidos linoleico e linolênico das membranas celulares ativando, assim, a rota octadecanóide que resulta na biossíntese de ácido jasmônico (Dudareva *et al.*, 2006). Outra rota de ativação de processos de defesa está relacionada ao ácido salicílico e à resposta sistêmica adquirida (Van Loon & Van Strien, 1999; Durrant & Dong, 2004). Em conjunto com as respostas sistêmicas adquiridas (SAR) há a produção de antioxidantes, derivado do ciclo ascorbato-glutationa, capazes de sequestrar o excesso de espécies ativas de oxigênio causadoras de estresse oxidativo (Conklin, 2001; Kocsy *et al.*, 2001; Bolwell & Dauli, 2009). Embora o jasmonato e salicilato sejam moléculas-chave na ativação de respostas bióticas, outros compostos como o peróxido de hidrogênio, etileno e óxido nítrico podem atuar como moléculas sinalizadoras (Klessing *et al.*, 2000; Neilli *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2002; Verhage *et al.*, 2010)

sobrepondo-se ao estresse biótico, e também a via do etileno (Vickers *et al.*, 2009). Esses hormônios e compostos sinalizadores de defesas desencadeiam de forma direta ou indireta a biossíntese de voláteis, sendo eles VFV ou isoprenoides (Gouinguene & Turlings, 2002). Segundo Souza *et al.* (2013), baixas doses de óxido nítrico atmosférico podem agir como sinalizadores de defesas químicas das plantas, culminando em alterações dos perfis de voláteis induzidos.

Isoprenoides voláteis desempenham um papel importante, no entanto, pouco reconhecido, nas respostas de estresse causado por agentes abióticos (Vickers *et al.*, 2009). Devido a suas características lipofílicas, esses voláteis podem estabilizar as interações hidrofóbicas das membranas (Loreto *et al.*, 2010), minimizando a peroxidação lipídica e reduzindo o estresse oxidativo (Loreto *et al.*, 2001). Os voláteis podem ainda sequestrar as ERO e ERN gerando novos compostos como, por exemplo, metacroleína e metil venil cetona, que são reconhecidamente atuante na indução de defesas antioxidativas (Vickers *et al.*, 2009).

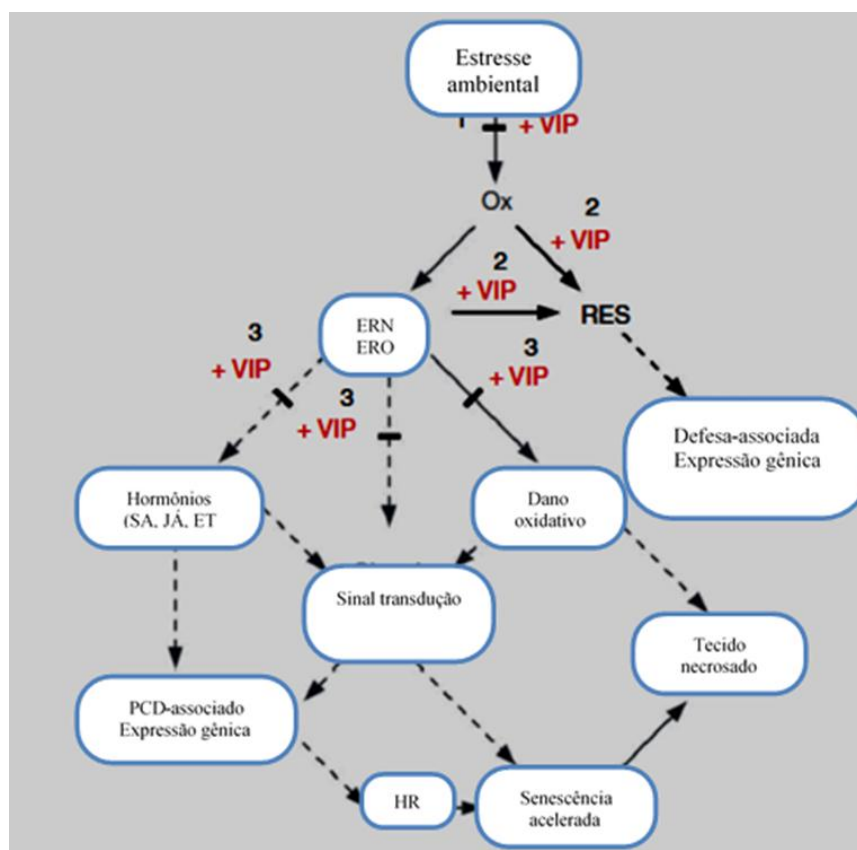


Figura 6 - Modelo simplificado da participação dos voláteis nas defesas químicas das plantas sob estresse abiótico (Adaptado de Vickers *et al.* 2009). ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio; ERO: Espécies reativas de oxigênio; SA: Ácido salicílico; JA: Ácido jasmônico; ET: Etileno; PCD: Morte Celular Programada; HR: Resposta de Hipersensibilidade; VIP; Voláteis Induzidos; OX: Oxidantes e RES: Respostas de Defesa.

3. Objetivos

Ozônio, óxido nítrico e salicilato de metila, relatados como indutores químicos, estão presentes na atmosfera e, especialmente o ozônio e óxido nítrico, são encontrados em ambientes poluídos e detectados em altas concentrações em regiões em que há elevada ocorrência de espécies de *C. floribundus* Spreng. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos: (i) caracterizar os voláteis produzidos em lâminas foliares jovens e adultas de plântulas de *C. floribundus* Spreng. decorrentes da exposição ao ozônio, óxido nítrico e salicilato de metila, em condições de laboratório; (ii) comparar a ação destes indutores químicos nos perfis de emissão de compostos voláteis em lâminas foliares jovens e adultas de plântulas de *C. floribundus*; (iii) avaliar o potencial dos indutores químicos na indução de óxido nítrico e terpenos totais *in situ*, e confirmar o papel dos indutores químicos na indução de óxido nítrico e isoprenóides; (iv) verificar o potencial desses indutores na emissão de voláteis reconhecidamente atuantes nas interações ecológicas tais como voláteis das folhas verdes, linalol, d-limoneno, cariofileno, farneseno entre outros, comparando com os resultados já reportados na literatura.

4. Material e métodos

4.1 Material Vegetal

Mudas de *Croton floribundus* Spreng. foram adquiridas em viveiro comercial (Bioflora, São Paulo, São Paulo). Após a aquisição, as mudas foram uniformizadas por altura da parte aérea e transplantadas em vasos de plástico, possuindo, em cada vaso, duas cordas de náilon para suprimento hídrico contínuo e contendo substrato tipo Eucatex Plantmax misturado com vermiculita na proporção de 3:1. Em seguida, estas mudas foram acomodadas sobre caixas de polietileno utilizadas como reservatórios de água, cobertas com grades de metal para suporte dos vasos, ao longo de dois meses em casa de vegetação com ar filtrado e temperatura média de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ controlada por meio de ar condicionado, situada no Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo-SP (Figura 7). Quinzenalmente, 100 ml de solução nutritiva do tipo Hoagland foram aplicados em cada muda. Após oito semanas de crescimento e desenvolvimento em casa de vegetação, as plantas foram expostas aos diferentes tratamentos. Antes da realização das exposições aos diferentes tratamentos, as plantas foram aclimatadas ao longo de dois dias no ambiente de exposição.

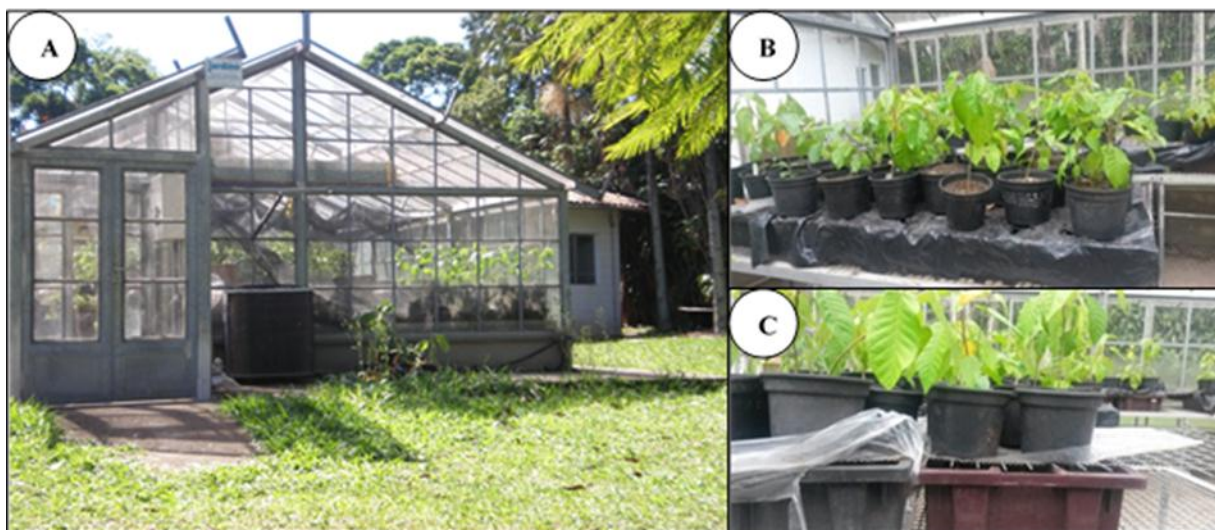


Figura 7 - Cultivo de *C. floribundus*. A: Casa de vegetação localizada no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo; B e C: mudas de *C. floribundus* acomodadas sobre caixas de polietileno utilizadas como reservatórios de água, cobertas com grades de metal para suporte dos vasos apoiadas sobre a tela e reservatório de água.

4.2 Exposição

As exposições aos diferentes tratamentos foram realizadas no sistema de fumigação (Souza & Pagliuso, 2009) do Laboratório de Interação Atmosfera Planta (LABIAP) do Núcleo de Pesquisa em Ecologia. As exposições ocorreram sempre em três câmaras revestidas de Teflon de 1m³ e com circulação de ar constante (Figura – 8). O fotoperíodo ocorreu no intervalo das 8h às 16h sob um sistema automático de iluminação (Timer). A umidade relativa foi constantemente monitorada e apresentou média de $67,3 \pm 5,2$. As plantas foram expostas aos diferentes tratamentos por um período de 7 dias.

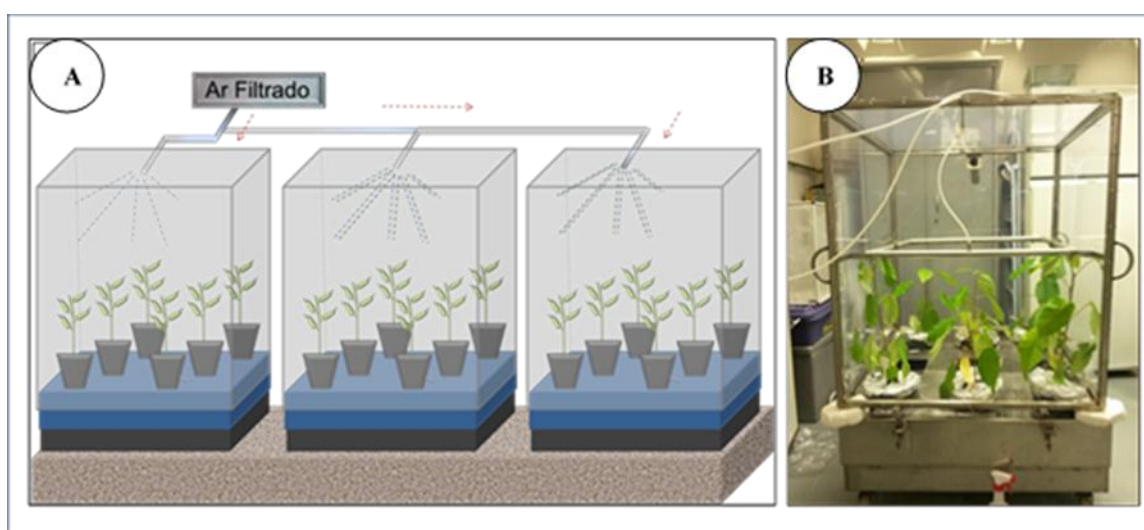


Figura 8 - A: Representação esquemática: três câmaras em estrutura de inox e revestidas de Teflon de 1m³ e com circulação de ar constante utilizada durante as exposições aos diferentes tratamentos. **B:** Uma das câmaras de exposição utilizada ao longo das exposições em imagem real situada no laboratório.

4.3 Tratamentos com indutores químicos

Todos os tratamentos descritos a seguir foram realizados com plântulas de *C. floribundus*, contendo em média altura de 60 cm e oito lâminas foliares cada indivíduo. Para cada tratamento, coletas foram realizadas em lâminas foliares jovens e adultas. As quatro lâminas foliares mais próximas ao meristema apical foram agrupadas como lâminas foliares jovens, enquanto lâminas foliares adultas foram assim definidas entre o primeiro e terceiro nó (da base ao ápice), ou seja, completamente expandidas. Os tratamentos foram repetidos de 3 a 4 vezes, dependendo da necessidade de obtenção de maior número amostral. Indivíduos foram selecionados de forma casualística para eliminar o possível efeito da variabilidade genética. As exposições às diferentes

repetições e condições ambientais foram realizadas conforme Tabela 2. Os indivíduos de *C. floribundus* foram expostos ao longo de sete dias e a cada período de exposição (2, 4 e 7 dias), foram realizadas as análises histoquímicas e coleta de voláteis para cada um dos tratamentos. Após cada período de exposição, foram coletados os voláteis das lâminas foliares jovens e adultas e secções transversais à mão livre foram realizadas para localização *in situ* de terpenos e óxido nítrico.

Tabela 2 - Períodos em que as repetições dos experimentos foram realizadas.

Repetição	Tratamentos		
	Ozônio	MeSA	NO
1	Novembro 2013	Novembro 2014	Novembro 2014
2	Outubro 2014	Janeiro 2015	Janeiro 2015
3	Outubro 2015	Setembro 2015	Maio 2015

4.3.1 Ozônio

Após o período de aclimação, nove plantas foram acomodadas em cada uma das câmaras, totalizando vinte e sete plantas expostas ao tratamento ozônio em cada uma das repetições, sendo que das vinte e sete plantas, dezoito foram utilizadas para o tratamento em lâminas foliares jovens e lâminas foliares adultas e nove para o controle. As exposições ocorreram ao longo de 5 horas por dia durante 7 dias. Concentrações médias de 100 ppb de ozônio foram geradas a partir do ozonizador (Ozontecnic, modelo 169 Brazil) e impulsionadas para o interior de duas câmaras, recebendo simultaneamente ozônio + ar filtrado (AF). Na terceira câmara, controle, foi utilizado ar filtrado (AF) isento de ozônio. As câmaras de exposição ao ozônio foram constantemente monitoradas a partir de um monitor Contínuo (Ecosoft 6040, USA) e a concentração, quando necessária, foi ajustada por meio de válvulas e fluxômetros (Alborg, USA).

4.3.2 Óxido nítrico

Para detectar possível produção e emissão de compostos orgânicos voláteis a partir do óxido nítrico, foi necessário realizar experimento não apenas com indutor de NO, nitroprussiato de sódio (NPS) – fórmula molecular ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$), mas

também com o controle positivo, ferrocianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) e controle negativo, cPTIO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido - fórmula molecular ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{KN}_2\text{O}_4$)). Ressalta-se que a necessidade desses tratamentos é devido ao fato de o NPS não ser apenas capaz de doar NO, mas também de liberar o íon cianeto (CN^-) que tem potencial tóxico podendo também atuar na indução ou inibição de voláteis. Por outro lado, cPTIO atua sequestrando o NO, impedindo que resquícios de NO nas plantas controle (tratamento água deionizada) possam interferir nos resultados. Assim, neste experimento foram utilizadas água deionizada e NPS, cPTIO e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ na concentração de 5mM (Sigma-Aldrich) , um volume aproximado de 10 ml de cada solução foi pulverizado nas lâminas foliares das plantas utilizadas para cada tratamento. A pulverização foi realizada diariamente no período da manhã ao longo de 7 dias .Foram utilizadas 6 plantas para cada tratamento. Três plantas foram pulverizadas na superfície abaxial da lâmina foliar jovem e três pulverizadas na superfície abaxial da lâmina foliar adulta. No total, um lote de vinte e quatro plantas, considerando doze para lâminas foliares jovens e a outras doze para lâminas foliares adultas foram tratadas com cada substância química.

4.3.3 Salicilato de Metila

Para este experimento foi realizado quatro repetições, perfazendo um número amostral de vinte e quatro plantas expostas ao MeSA e outras vinte e quatro correspondente ao controle. Em cada repetição foram alocados seis plantas, três para lâminas foliares jovens e três para lâminas foliares adultas. Uma solução de 5mM de MeSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) foi pulverizada (aproximadamente 10 mL) diariamente, ao longo de 7 dias, no período da manhã, na superfície abaxial de lâminas foliares jovens e adultas previamente selecionadas. Após o período de 2, 4 e 7 dias de exposição, foi realizada análise histoquímica e coleta de compostos orgânicos voláteis.

4.4 Coleta e análise dos Compostos Orgânicos Voláteis

Lâminas foliares jovens e adultas completamente expandidas de cada uma das plantas expostas aos diferentes tratamentos foram introduzidas em saco de Teflon com duas aberturas laterais para entrada e saída de ar, assegurando a manutenção das trocas gasosas. Cartuchos contendo 100mg de Tenax TA mesh 60/80, foram fixados em uma das aberturas laterais do saco de Teflon e a outra abertura conectada em uma bomba de sucção, garantindo a passagem do ar pelo interior de cada cartucho para a coleta de voláteis (Figura 9). O fluxo de ar amostrado foi em torno de 0,8 ml/min e a do ar inserido no interior dos sacos de 1,5 ml/min. O período de amostragem dos voláteis foi ao longo de 1h 30min.

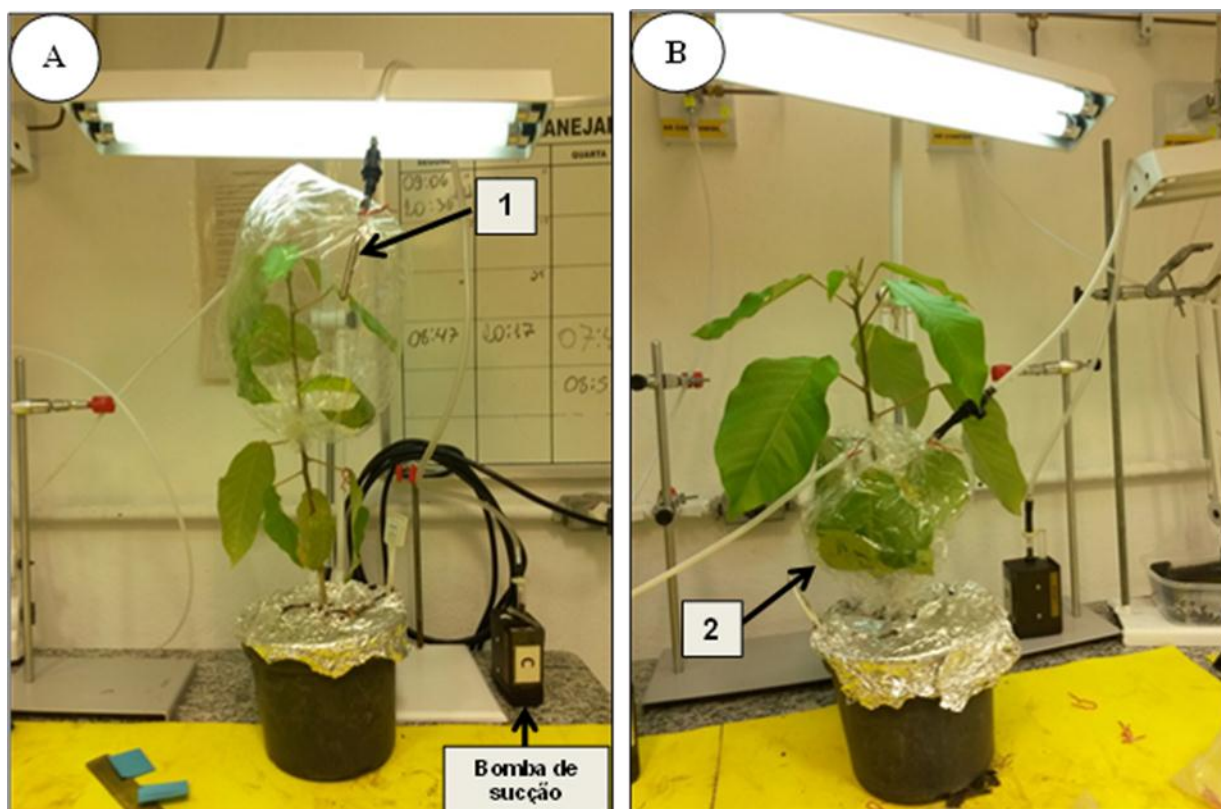


Figura 9 - Sistema de coleta de voláteis. A: Coleta de voláteis de lâminas foliares jovens completamente expandidas (1). B: Coleta de voláteis de lâminas foliares adultas completamente expandidas (2).

Os voláteis amostrados foram desorvidos em nitrogênio gasoso por sistema de dessorção térmica, Turbo matrix 650 ATD da Perkin-Helmer, e automaticamente analisados em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM, Agilent 5977). As análises foram desenvolvidas em uma coluna HP-6 (5% fenil metil

silicone), em rampa de temperatura de 46°C mantida por 5 minutos até 150°C , com gradiente de temperatura de 20°C por minuto a 250°C e mantida por 5 minutos. O quadrupolo foi operado em ionização eletrônica a 70eV, com fonte de temperatura de 200°C e interfase 220, com contínuo scan de 40 a 500m/z.

Um cromatograma de cada tratamento está apresentado na Figura 10 para exemplificar o perfil dos voláteis induzidos. A quantificação dos compostos foi realizada por meio de curvas analíticas utilizando padrões de voláteis (Sigma-Aldrich) com concentrações conhecidas, tais como linalol, β -pineno, α -pineno, aromadendreno, 1-octen-3-ol, trans- β -farneseno, cis-3-hexen-1-ol, limoneno, ocimeno, cis-3-hexenil acetato, β -cariofileno, cis-2-hexen-1-ol, geraniol, 6-metil-5-hepten-, nonanal, salicilato de metila, decanal, mirceno e geranil isovalerato. Para os compostos em que não havia disponibilidade de padrões, a quantificação foi realizada com base na curva analítica do padrão α -pineno.

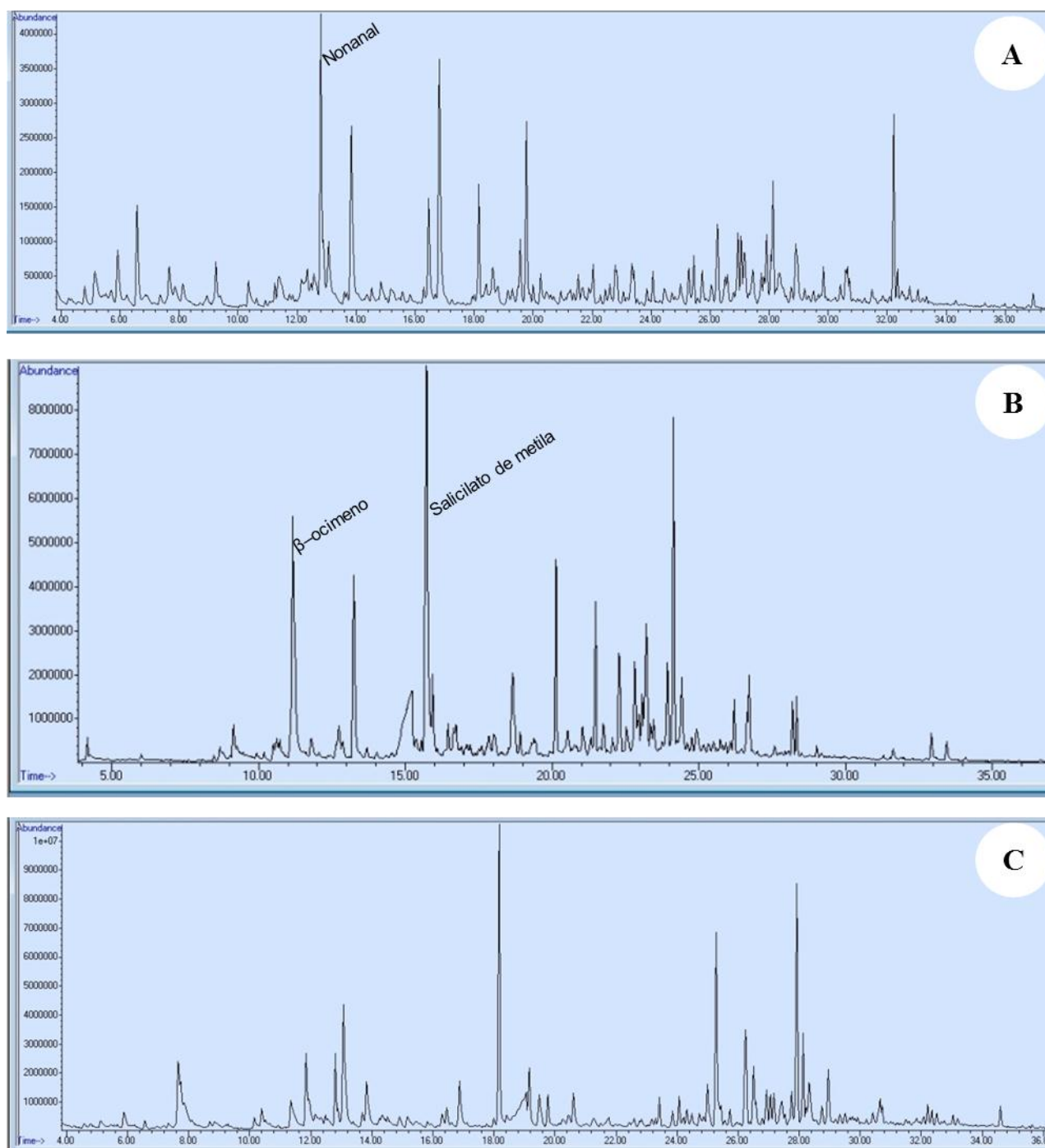


Figura 10 – Representação dos perfis cromatográficos dos três diferentes tratamentos realizados ao longo do estudo. **A:** tratamento ozônio; **B:** tratamento salicilato de metila e **C:** tratamento óxido nítrico.

4.5 Localização *in situ* de NO e Terpenos

Imediatamente após a exposição das plantas aos diferentes tratamentos O₃, MeSA e indutores e sequestradores de NO, lâminas foliares de folhas jovens e adultas foram submetidas a corte transversal à mão livre para a localização *in situ* de NO e de terpenos.

O protocolo de localização do NO foi testado e adaptado às nossas amostras com base nos protocolos descritas em Pedroso *et al.* (2000) e Ederli *et al.* (2006). Secções da região mediana da lâmina foliar jovem e adulta (incluindo a nervura central) foram incubadas no escuro durante 1h à temperatura ambiente com 2mM de corante-indicador fluorescente DAF-FM diacetato (Sigma Aldrich), preparada em 50mM tampão Tris-HCl, pH 7,5. As amostras foram então lavadas três vezes, durante 15minutos, com tampão, e montadas em meio aquoso de solução de Fluoromount (Sigma-Aldrich). Conjuntos paralelos de amostras foram tratados da mesma maneira, mas previamente incubado durante 1h com 400µM de cPTIO (Sigma Aldrich), sequestrador de NO, em Tris-HCl 10mM, pH 7,4. Em primeiro lugar, um Zeiss LSM 510-meta invertido sob microscopia de laser confocal de varredura (CLSM) foi usado para estabelecer a condição de análises que foram então aplicadas no microscopio Leica DM5500 widefield. Este procedimento foi feito, para evitar artefatos, ou seja, visualizar as emissões de compostos fenólicos em vez do fluoróforo DAF-FM utilizando apenas a microscopia widefiel, uma vez que ambos os compostos poderiam ser visualizados nas mesmas linhas de laser. Assim, testaram-se as linhas de laser de excitação de 364nm, 405nm, 458nm, 488nm e 514nm, em que os sinais fluorescentes foram obtidos na gama de emissão de 400-600nm, 420-600nm, 460-600nm, 500-600nm, e 525- 600nm, respectivamente. Independentemente da linha de laser de excitação, todas as amostras apresentaram picos de emissão referentes a compostos fenólicos que, eventualmente, se sobrepueram ao DAF-NO. Uma linha de laser de excitação de 488nm-árgon no qual foi observada quase nenhuma sobreposição nas emissões, e em que a DAF-NO exibiu um pico de intensidade mais elevada de 530nm. Então, esse padrão de emissão foi aplicado em todos os experimentos. As imagens de sobreposição para visualizar as emissões de compostos DAF-NO e fenólicos foram realizadas, em que se sobrepueram resultados foram desconsiderados para evitar erros de interpretação. Além disso, todas as imagens foram capturadas em objetiva de imersão de ar (25x), independentemente do microscópio utilizado.

Para a localização histoquímica de terpenóides foi realizada secções da região mediana das lâminas foliares à mão livre. Pelo menos cinco secções foram usadas para localização *in situ*, utilizando o reagente de terpenóides Nadi naftol + dimetil-parafenilenodiamina (David & Carde, 1964). As secções foram incubadas no escuro durante 60 minutos à temperatura ambiente em Nadi, preparado imediatamente antes da coloração. Após a incubação, as secções foram lavadas durante 2 minutos em tampão de fosfato de sódio (0,1M, pH 7,2). Pelo menos três outras secções permaneceram sem tratamento para a observação da cor e da estrutura das células *in vivo* (branco).

As imagens foram digitalmente adquiridas pelo software Image Pro Express 6.3 obtidas a partir do microscópio composto Olympus BX53 equipado com câmera digital Olympus Q-Color 5 e software Pro Expresso 6.3 image.

4.6 Tratamento dos dados

Os resultados de todas as coletas realizadas foram analisados estatisticamente utilizando o programa SPSS. Primeiramente, foram comparados os resultados obtidos para os três dias de tratamentos (2, 4 e 7 dias de exposição) por meio da análise de variância de um fator (ANOVA one-way). Como não houve diferença significativa entre os dias amostrados, os resultados de todos os dias foram considerados como sendo réplicas dos tratamentos, exceto para o d-limoneno de lâminas foliares jovens sob o indutor de NO, em que houve diferença entre o segundo e o sétimo dia de tratamento. Neste caso, foram consideradas as médias do segundo e quarto dia como sendo réplicas dos tratamentos. As médias das réplicas foram comparadas para cada tratamento, sendo as lâminas foliares jovens e adultas tratadas separadamente. Quando necessário para o teste de distribuição normal, os dados foram transformados para log₁₀. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Para ozônio e salicilato de metila, foram aplicados o teste T para comparação entre o tratamento e seu controle. Para o óxido nítrico, no qual há três controles (neutro: H₂O; positivo: K₃Fe(CN)₆; negativo: cPTIO) a comparação entre as médias do tratamento e seus controles se deu por meio de análise de variância de um fator (ANOVA One-way), e quando encontrado diferenças entre as médias, foi aplicado o teste Tukey para identificar tais diferenças. Para comparação entre os tratamentos e folhas jovens e adultas, foi realizado análise de componentes principais por meio do programa PCORD.

5. Resultados

5.1. Caracterização dos compostos orgânicos voláteis induzíveis

Dentre os compostos voláteis identificados, vinte e três foram caracterizados nas amostras analisadas e ordenados nas seguintes classes químicas: monoterpenos, sesquiterpenos, volátil de folha verde, aromáticos e compostos oxigenados. A classificação dos compostos e suas concentrações médias induzidas por O₃, NO e MeSA estão apresentadas nas Tabelas 3,4-5, 6, respectivamente.

5.1.2 Voláteis induzidos por Ozônio

Diferenças estatísticas não foram observadas entre os valores médios dos níveis de emissão dos voláteis após 2,4 e 7 dias de tratamento tanto em folhas jovens (Figura 11) quanto adultas (Figura 12). Por este motivo, foi considerada a média dos voláteis emitidos dos três dias de exposição para fins de comparação com o seu controle. Assim, em lâminas foliares jovens, houve diferença significativa na emissão dos voláteis monoterpenos induzidos por ozônio (Tabela 3). Os compostos α -pineno ($p=0,026$), β -pineno ($p=0,00$) e β -ocimeno ($p=0,010$) tiveram suas concentrações aumentadas em relação ao controle, enquanto β -mirceno ($p=0,003$) e linalol ($p=0,015$) diminuíram. Não foi observada alteração da porcentagem de monoterpenos em relação à somatória das classes, comparado ao controle (Figura 13 A-B). Em relação aos resultados encontrados para sesquiterpenos, houve um aumento significativo do cariofileno ($p=0,00$), α -cadineno ($p=0,023$), alomadendreno ($p=0,030$) e β -cubebeno ($p=0,009$) e tras-farnesol ($p=0,00$), em contrapartida, a concentração de β -copaeno ($p=0,042$) foi significativamente reduzida (Tabela 3). Tanto o trans-farnesol quanto alomadendreno apareceram apenas após a exposição ao ozônio não estando presente nas plantas controle. Houve um aumento significativo na emissão do 3-hexen-1-ol ($p=0,026$), sendo o único volátil de folhas verdes encontrado após a exposição ao ozônio (Tabela 3; Figura 13 A-B). A porcentagem dos voláteis das folhas verdes apresentou um aumento considerável quando comparado ao seu controle (Figura 13 A-B). Para os compostos aromáticos, o ozônio induziu a emissão de benzaldeído e salicilato de metila. Para os compostos oxigenados, houve aumento das concentrações de α -cumil álcool ($p=0,006$) e nonanal ($p=0,004$) e também observou-se redução do decanal ($p=0,004$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração média de voláteis (ng.MS-1) e erro padrão: tratamento ozônio comparado ao controle (AF). Negrito indica diferença significativa ($p < 0,05$).

	Lâmina foliar jovem		Lâmina foliar adulta	
	<i>O₃</i>	<i>Controle</i>	<i>O₃</i>	<i>Controle</i>
Monoterpenos				
α -pineno	22,96± 10,06	0,70± 0,70	21,59±9,74	3,70±2,43
β -pineno	71,32± 29,85	1,60± 1,60	16,13±9,71	17,93±14,81
β -mirceno	–	37,97± 119,64	–	–
β -ocimeno	137,82± 56,81	15,02± 29,36	250,29±140,97	16,58±11,07
d-limoneno	–	–	–	–
Linalol	0,32± 0,32	2,20± 2,20	0,19±0,19	1,97±1,97
Soma	232,42	57,49	288,2	40,18
Sesquiterpenos				
α -cadineno	90,82± 39,66	19,25± 17,79	40,07±13,59	–
β -bourboneno	23,27± 12,02	9,23± 5,85	42,45±26,50	14,26±14,26
β -copaeno	36,09±10,80	85,41± 68,92	56,83±17,10	33,10±13,35
β -cubebeno	233,63± 108,23	0,60± 0,60	96,48±35,52	4,51±4,51
γ -muroleno	–	–	44,95±17,81	–
Alomadendreno	24,02± 15,67	–	10,65±5,60	2,34±2,34
Cariofileno	220,80± 77,95	1,90± 1,29	139,19±44,46	11,28±8,36
Cis- β -farnesene	1,59± 1,22	2,24± 1,75	20,47±5,71	12,98±8,56
Trans-farnesol	7,93± 4,78	–	13,86±4,63	–
Soma	638,15	118,63	464,95	78,47
Voláteis de folhas verdes				
3-hexen-1-ol	256,36± 134,29	13,83± 8,33	64,75±23,73	19,01±7,25
Aromáticos				
Benzaldeído	99,56±33,29	–	87,57±25,00	212,92±122,90
MeSA	199,97± 39,36	48,89± 23,89	1037,16±514,17	14,72±4,32
Soma	299,53	48,89	1124,73	227,64
Oxigenados				
α -cumil álcool	237,74± 97,87	9,00± 6,19	773,01±175,39	0,71±0,71
Aldeído cinâmico	–	–	13,12±6,53	–
Decanal	10,20± 3,42	16,84± 6,59	5,91±2,77	6,97±4,70
Geranil acetona	14,46± 5,66	14,88± 6,56	19,48±12,54	9,95±5,62
Nonanal	143,95± 50,37	48,73± 18,45	62,09±21,13	23,43±9,34
Soma	406,35	89,45	873,61	41,06

Em lâminas foliares adultas, para os monoterpenos analisados, foi observada uma redução significativa na concentração de linalol ($p=0,001$) (Tabela 3) e não houve variação na porcentagem dos monoterpenos totais em relação ao controle (Figura 13 C-D). Em relação aos sesquiterpenos, houve um aumento significativo na concentração de cariofileno ($p=0,005$) e γ -muroleno ($p=0,010$), sendo que esse último não foi emitido no tratamento controle (Tabela 3). Ainda, houve uma redução de 3% da emissão dos sesquiterpenos totais nas plantas expostas ao ozônio (Figura 13 C-D). Para os voláteis de folhas verdes, representados por 3-hexen-1-ol, observou-se um aumento significativo ($p=0,013$) nas lâminas foliares adultas expostas ao ozônio (Tabela 3), em contrapartida, a porcentagem de voláteis das folhas verdes foi reduzida em 2% quando comparado ao seu controle (Figura 13 C-D). Considerando os aromáticos, houve uma redução significativa nos níveis de benzaldeído ($p=0,00$) e um aumento do salicilato de metila ($p=0,05$) em relação ao controle. A porcentagem total dos aromáticos emitidos em lâminas foliares sob ozônio foi reduzida em 16 %. Para os compostos oxigenados, o ozônio acarretou aumento significativo nos compostos α -cumil álcool ($p=0,000$), nonanal ($p=0,019$) e aldeído cinâmico ($p=0,014$) e gerou um aumento representativo de 22% nos oxigenados totais. (Tabela 3).

A análise de componentes principais mostrou que a soma dos eixos 1 e 2 explicou 74 % da variabilidade dos tratamentos entre lâminas foliares jovens e adultas (Figura 14). O benzaldeído foi positivamente correlacionado com o eixo 1, enquanto β -farneseno foi correlacionado com esse eixo negativamente. Os compostos α -copaeno, nonanal, cariofileno e 3-hexen-1ol foram os principais compostos correlacionados positivamente com o eixo 2. Por outro lado, apenas o β -bourboneno foi relacionado negativamente ao eixo 2. Houve agrupamento das amostras das lâminas foliares expostas ao ozônio: adultas no primeiro quadrante e jovens no segundo quadrante. Os tratamentos controle não foram diferenciados.

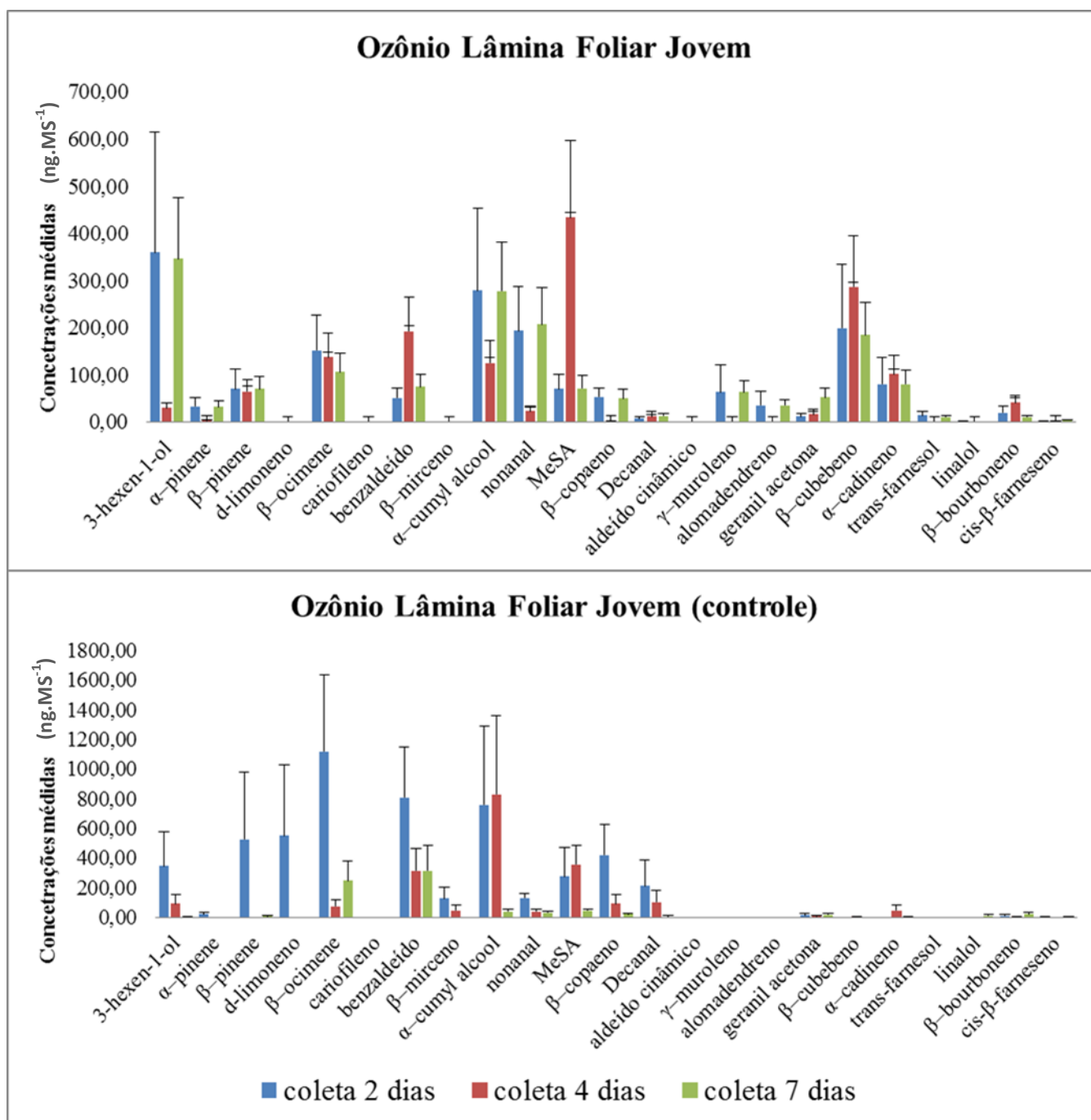


Figura 11 - Concentrações médias dos voláteis emitidos em folhas jovens de *C. floribundus* entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias para o tratamento O₃ e seu controle (AF) .

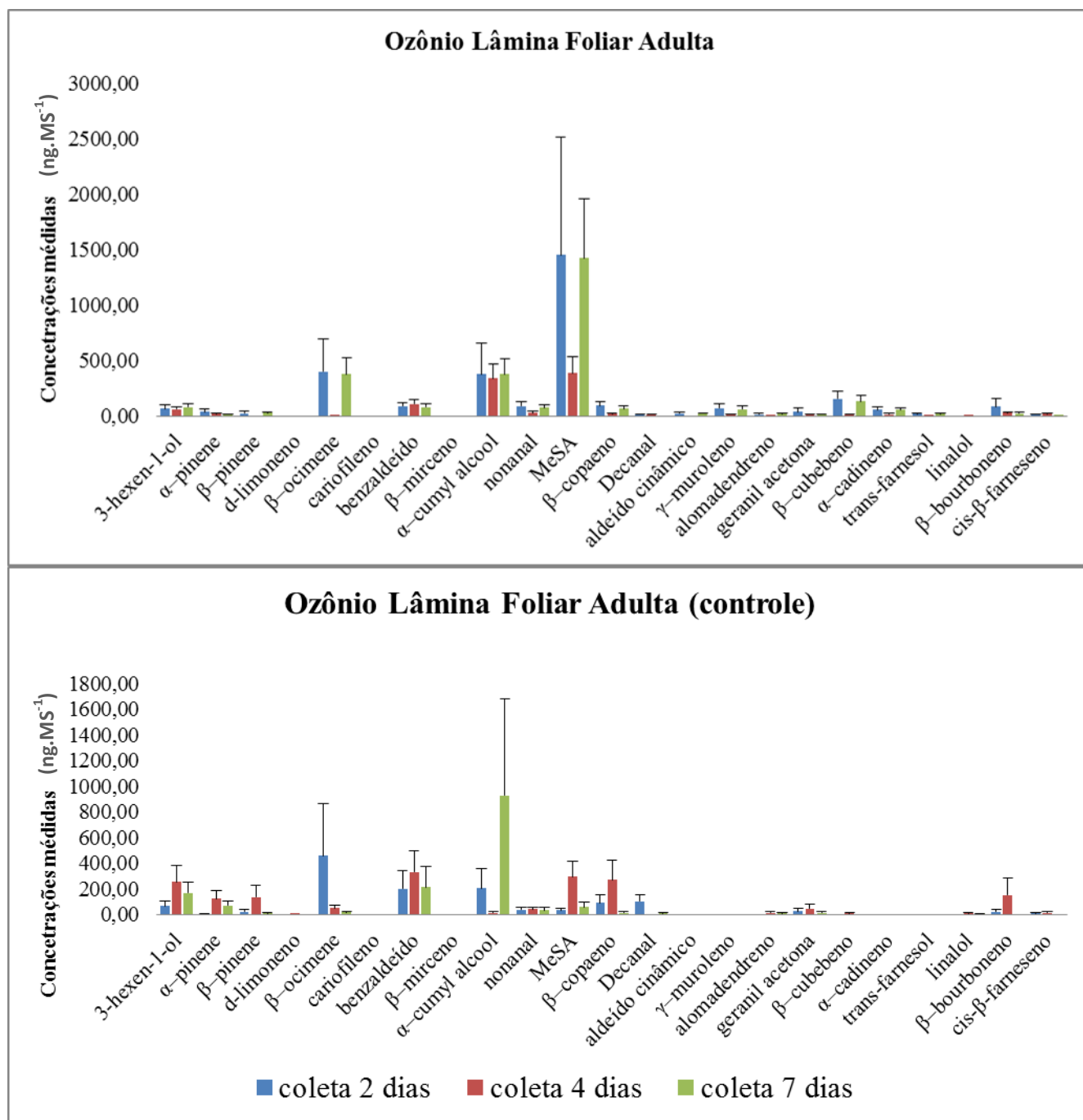


Figura 12 - Concentrações médias dos voláteis emitidos em folhas adultas de *C. floribundus* entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias para o tratamento O₃ e seu controle (AF).

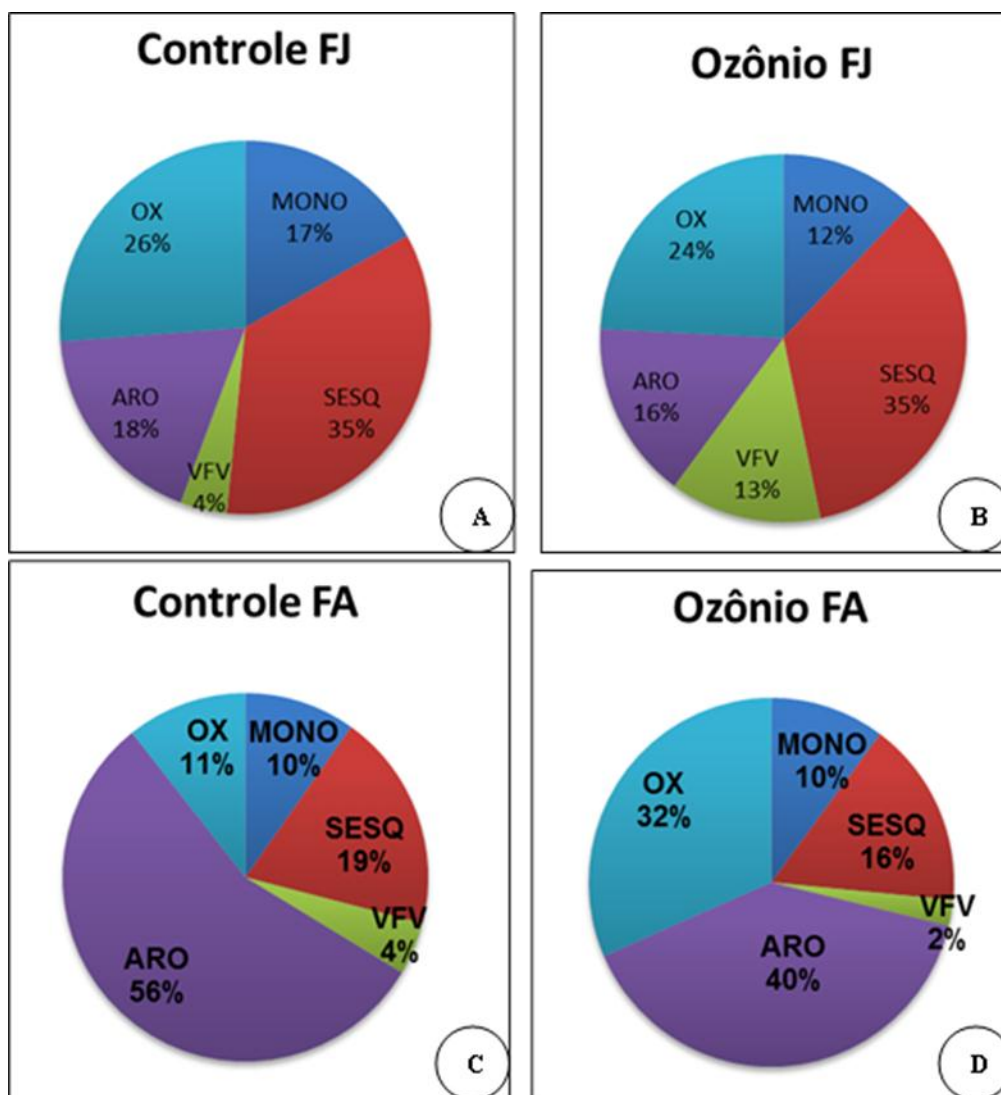


Figura 13 - Distribuição em porcentagem de emissão de compostos orgânicos voláteis após exposição ao ozônio em um período de 7 dias. A e B: exposição em lâminas foliares jovens. C e D: exposição em lâminas foliares adultas. FJ: lâmina foliar jovem, FA: lâmina foliar adulta; OX: oxigenados, MONO: monoterpenos; SESQ: sesquiterpenos; VFV: voláteis de folhas verdes; ARO: aromáticos.

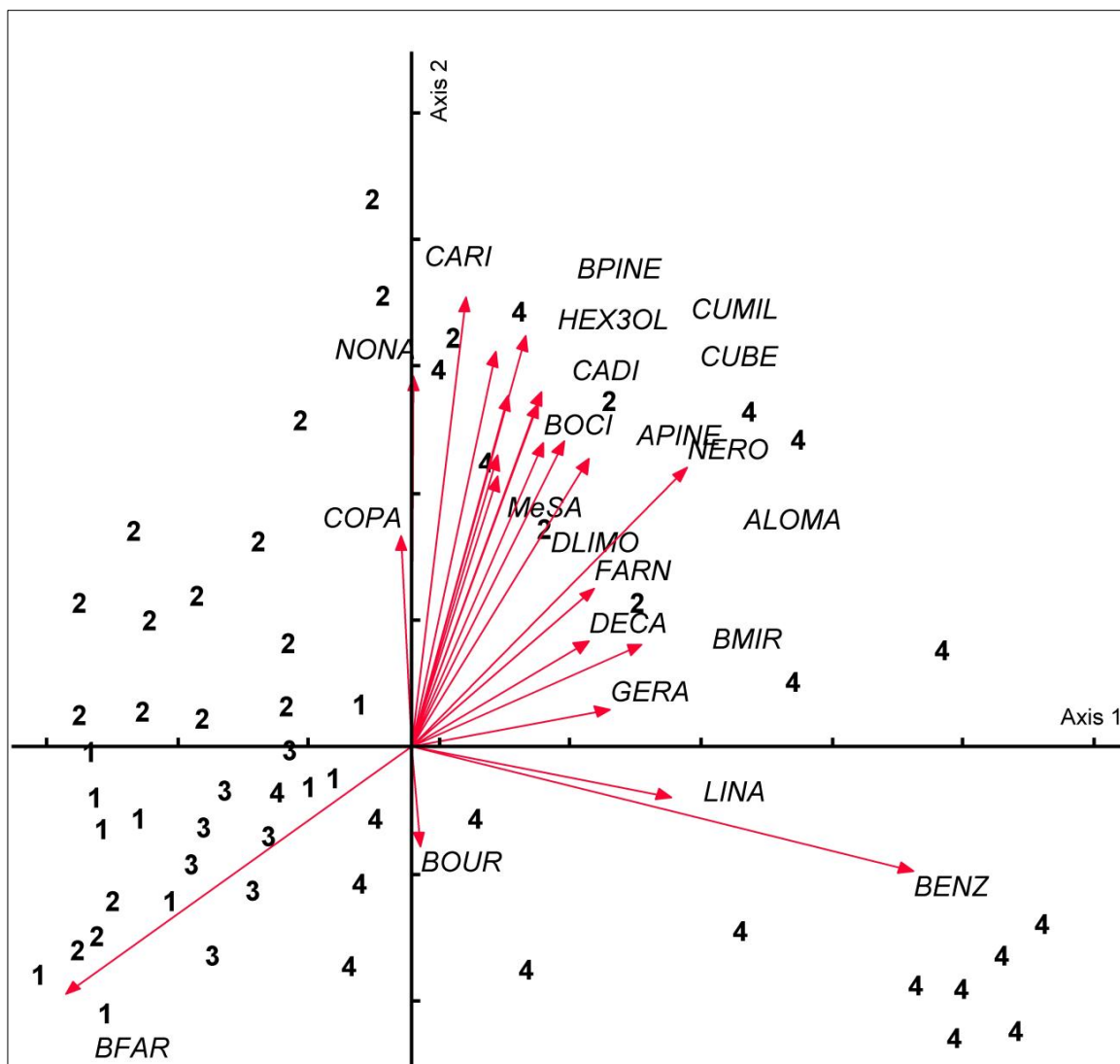


Figura 14 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *C. floribundus* sob ação do ozônio. **1:** Lâminas foliares jovens controle; **2:** lâminas foliares jovens expostas ao ozônio; **3:** Lâminas foliares adulta controle; **4:** Lâminas foliares adultas exposta ao ozônio. **APINE:** α -pineno; **BPINE:** β -pineno; **BMIR:** β -mirceno; **BOCI:** β -ocimeno; **DLIMO:** D-limoneno; **LINA:** Linalol; **CADI:** α -cadinene; **BOURB:** β -bourboneno; **COPA:** β -copaeno; **CUBE:** β -cubebeno; **ALOMA:** Alomadendreno; **CARI:** Cariofileno; **BFAR:** Cis- β -farneseno; **HEX3OL:** 3-hexen-1ol; **BENZ:** Benzaldeído; **MeSA:** Salicilato de metila; **CUMIL:** α -Cumyl-alcool; **DECA:** decanal; **FARN:** Trans-farnesol; **GERA:** Geranil acetona; **NONA:** nonanal; **NERO:** nerolidol.

A localização *in situ* de NO, mostrou elevada ocorrência de NO em lâminas foliares jovens e adultas de plantas de *C. floribundus* expostos ao ozônio. Houve maior produção de NO em lâminas foliares adultas, tanto no parênquima paliçádico quanto no lacunoso (Figura 15). A localização *in situ* com o teste Nadi evidenciou a presença de terpenos totais em lâminas foliares jovens e adultas, indicando maior abundância no parênquima paliçádico de lâminas foliares adultas (Figura 16).

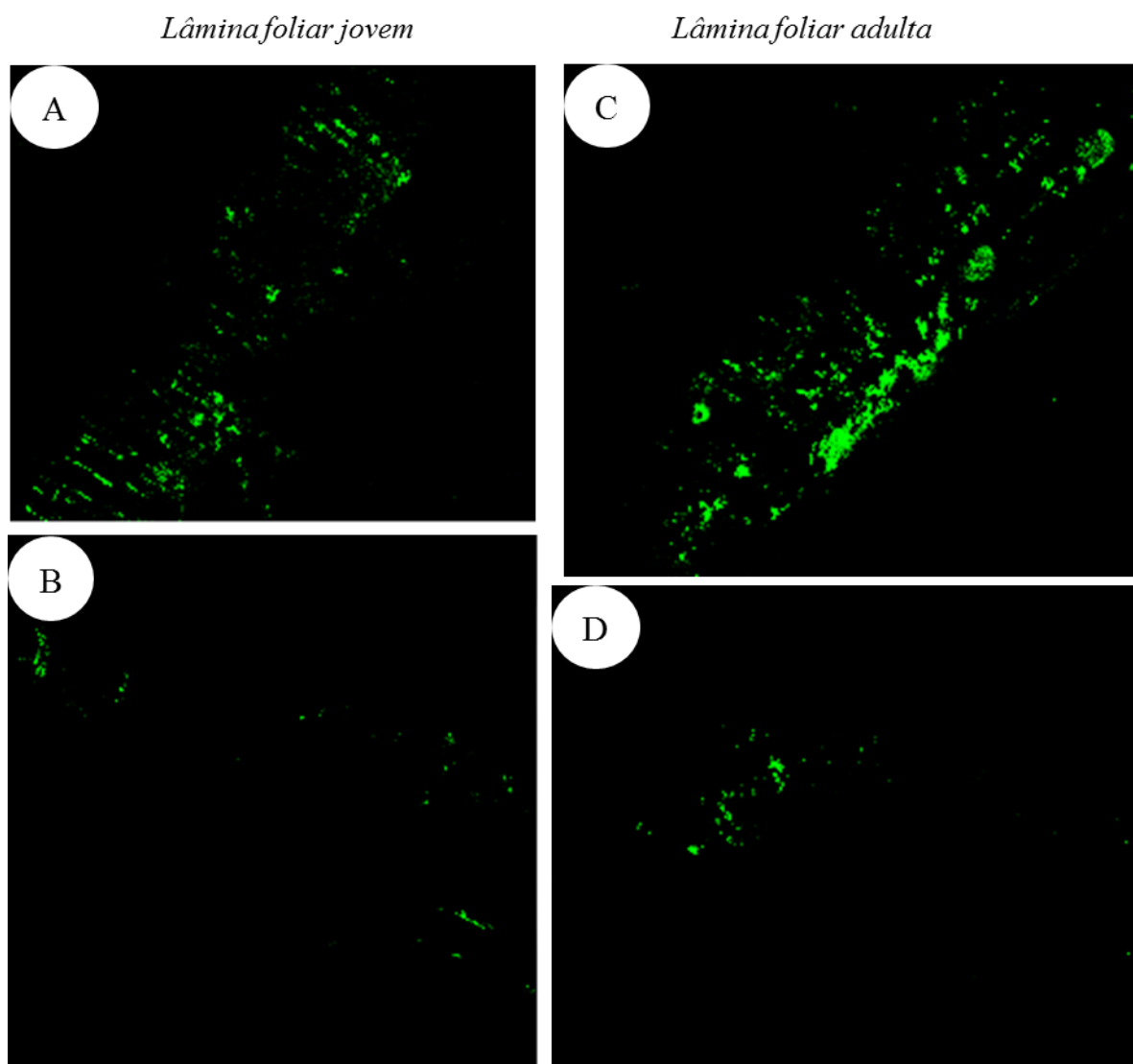


Figura 15 - Plântulas de *Croton floribundus* expostos ao ozônio ao longo de 7 dias. Após este período, lâminas foliares jovens e adultas foram submetidas ao reagente DAF-FM (indutor de NO). A e C: tratamento ozônio; B e D: controle (AF). Fluorescência (pontos verdes) indica presença de NO.

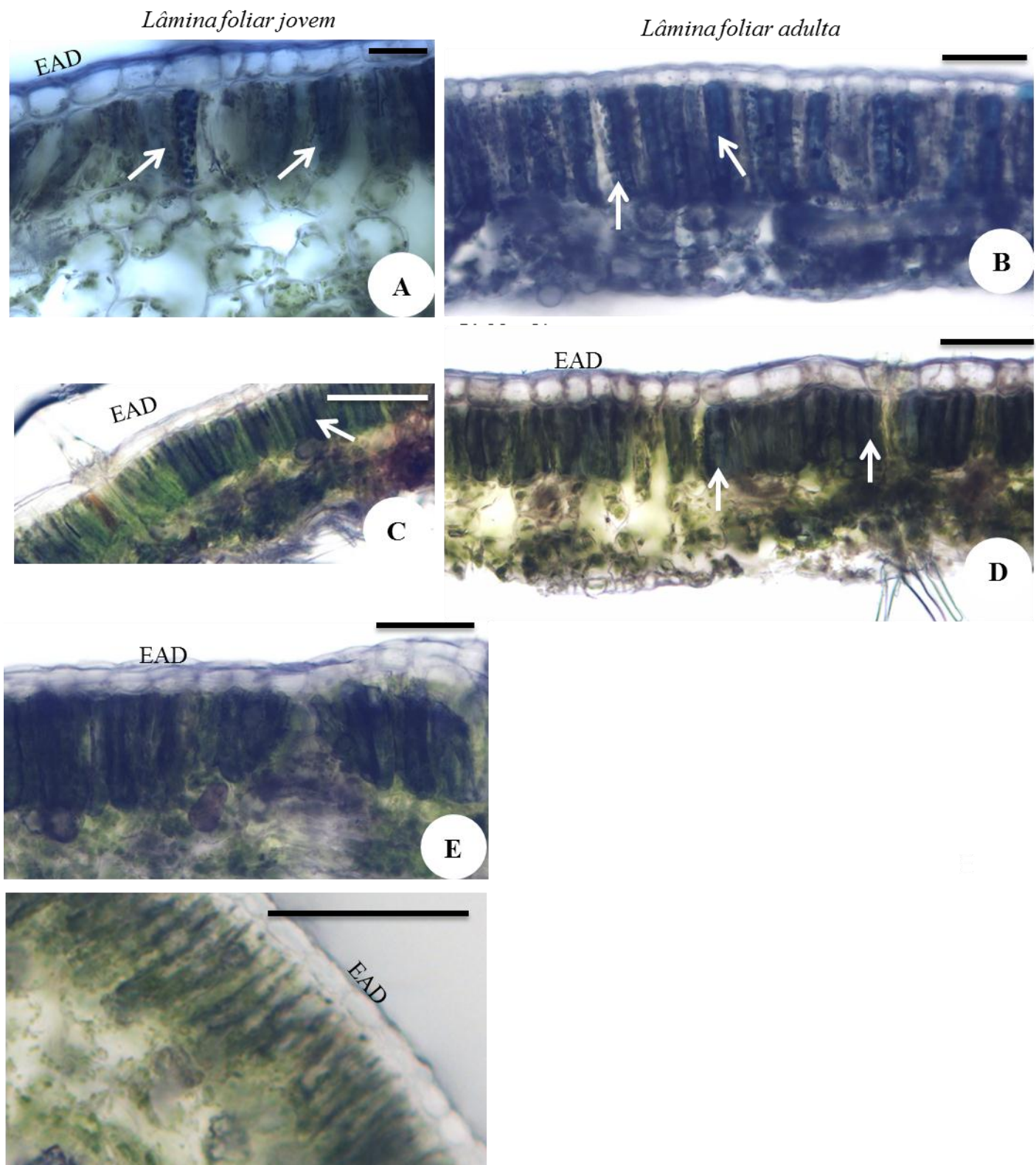


Figura 16 - Plântulas de *Croton floribundus* expostas ao ozônio ao longo de 7 dias. Após este período, lâminas foliares jovens e adultas foram submetidas ao teste histoquímico Nadi (David & Carde, 1964). A e B: câmara 1 (O₃); C e D: câmara 2 (O₃); E e F: câmara 3 (Controle – AF); G: Branco (Controle – AF). Barras: A: 25 μm B: 50 μm C: 75 μm D-F: 50 μm G: 250 μm. EAD: epiderme adaxial. Setas indicam presença de terpenos em algumas células.

5.1.3 Voláteis induzidos por Óxido nítrico

Os valores médios dos níveis de emissão dos voláteis de lâminas foliares jovens tratadas com indutor de NO e seu controle, ao longo do período de 7 dias, estão apresentados na Figuras 17. Embora diferenças estatísticas não tenham sido encontradas entre os dias de tratamento, observamos que NO foi capaz de induzir os terpenos γ -muruleno, alomadendreno e linalol.

Considerando a média de todos os dias amostrados, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos nitroprussiato de sódio (NPS) e seu controle negativo (cPTIO), quando avaliado os monoterpenos em lâminas foliares jovens, exceto para o composto d-limoneno ($p=0,004$) em que sua indução foi totalmente inibida no tratamento cPTIO. Em relação aos tratamentos NPS e $K_3Fe(CN)_6$, nenhuma diferença significativa foi também observada (Tabela 4). Quanto à porcentagem de monoterpenos totais, houve uma diminuição em torno de 10% nos controles negativo e positivo, cPTIO e $K_3Fe(CN)_6$, respectivamente, comparado ao NPS, enquanto uma redução de 5% foi observada entre os tratamentos NPS e água (Figura 18). Neste mesmo experimento, diferença significativa também foi observada para o volátil de folhas verdes, 3-hexen-1-ol ($p=0,050$), quando comparado aos tratamentos NPS e água. Enquanto NPS e seus controles, positivo e negativo, não apresentaram nenhuma diferença significativa para este composto. Para os sesquiterpenos, observou-se que lâminas foliares jovens tratadas com NPS foram capazes de emitir compostos, como alomadendreno e γ -muroleno, que não foram observados no tratamento controle (Tabela 4). Considerando a porcentagem dos sesquiterpenos em relação ao total da composição de voláteis, observou-se que o tratamento NPS foi o que mais contribuiu para o aumento de sesquiterpenos, seguido do cPTIO, $K_3Fe(CN)_6$ e água (Figura 18). Para os aromáticos, observou-se o aumento dos níveis de benzaldeído e MeSA, comparando os tratamentos NPS, cPTIO e $K_3Fe(CN)_6$ com o tratamento água, embora nenhuma diferença estatística tenha sido constatada. A contribuição da soma dos aromáticos na emissão total de voláteis foi relativamente baixa, variando de 9 a 15%, sendo que o tratamento $K_3Fe(CN)_6$ foi o que contribuiu para o maior valor (Figura 18). Em relação aos oxigenados, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os tratamentos, embora a contribuição dessa classe de compostos tenha sido menor no tratamento NPS (Tabela 4; Figura 18).

Tabela 4 - Concentração média de voláteis (ng.MS⁻¹) e erro padrão: tratamento óxido nítrico (lâminas foliares jovens) comparado ao controle. Negrito indica diferença significativa (p<0,05).

	Lâmina foliar jovem			
	Controle	NPS	cPTIO	K ₃ Fe(CN) ₆
Monoterpenos				
α -pineno	1,17± 1,17	2,57± 1,26	0,84± 0,84	3,14± 3,14
β -pineno	–	1,39± 0,77	2,31± 2,31	2,05± 2,05
β -mirceno	–	1,79± 1,79	–	1,92± 1,92
β -ocimeno	10,42± 4,64	23,97± 16,30	8,19± 4,14	10,63± 7,64
d-limoneno	0,83± 0,83	0,75± 0,54	–	2,77± 1,68
Linalol	0,95± 0,95	2,47± 2,47	2,80± 2,80	1,57± 1,57
Soma	13,37	33,89	14,14	22,08
Sesquiterpenos				
α -cadinene	–	–	–	–
β -bourboneno	1,71± 1,12	15,83± 11,15	14,31± 7,74	4,09± 4,09
β -copaeno	0,80± 0,80	11,19± 11,19	1,10± 1,10	14,52± 11,33
β -cubebeno	–	–	2,31± 1,64	4,05± 2,52
γ -muroleno	–	4,93± 3,96	–	1,80± 1,80
Alomadendreno	–	8,11± 5,43	2,61± 2,37	1,36± 1,36
Cariofileno	5,19± 3,12	29,10± 18,36	17,58± 7,76	14,31± 6,60
Cis-b-farnesene	0,35±0,35	3,66±2,40	1,76±0,95	–
Trans-farnesol	–	–	–	–
Soma	8,05	72,82	39,67	40,13
Voláteis de folhas verdes				
3-hexen-1ol	10,77± 2,74	13,88± 9,39	11,29± 4,77	13,50± 9,57
Aromáticos				
Benzaldeído	4,45± 2,74	10,02± 4,27	10,06± 5,64	18,97± 12,60
MeSA	0,19± 0,19	6,12± 5,53	4,06±3,64	3,35±3,07
Soma	4,64	16,14	14,12	22,32
Oxigenados				
α -cumil álcool	–	–	–	0,70±0,70
Aldeído cinâmico	–	–	–	–
Decanal	10,64±5,23	14,99±4,82	20,44±10,66	30,16±19,78
Geranil acetona	0,89±0,89	3,27±2,31	7,80±5,94	10,57±7,69
Nonanal	2,53±1,27	3,38±1,00	4,89±1,98	5,69±3,66
Soma	14,06	21,64	33,13	47,12

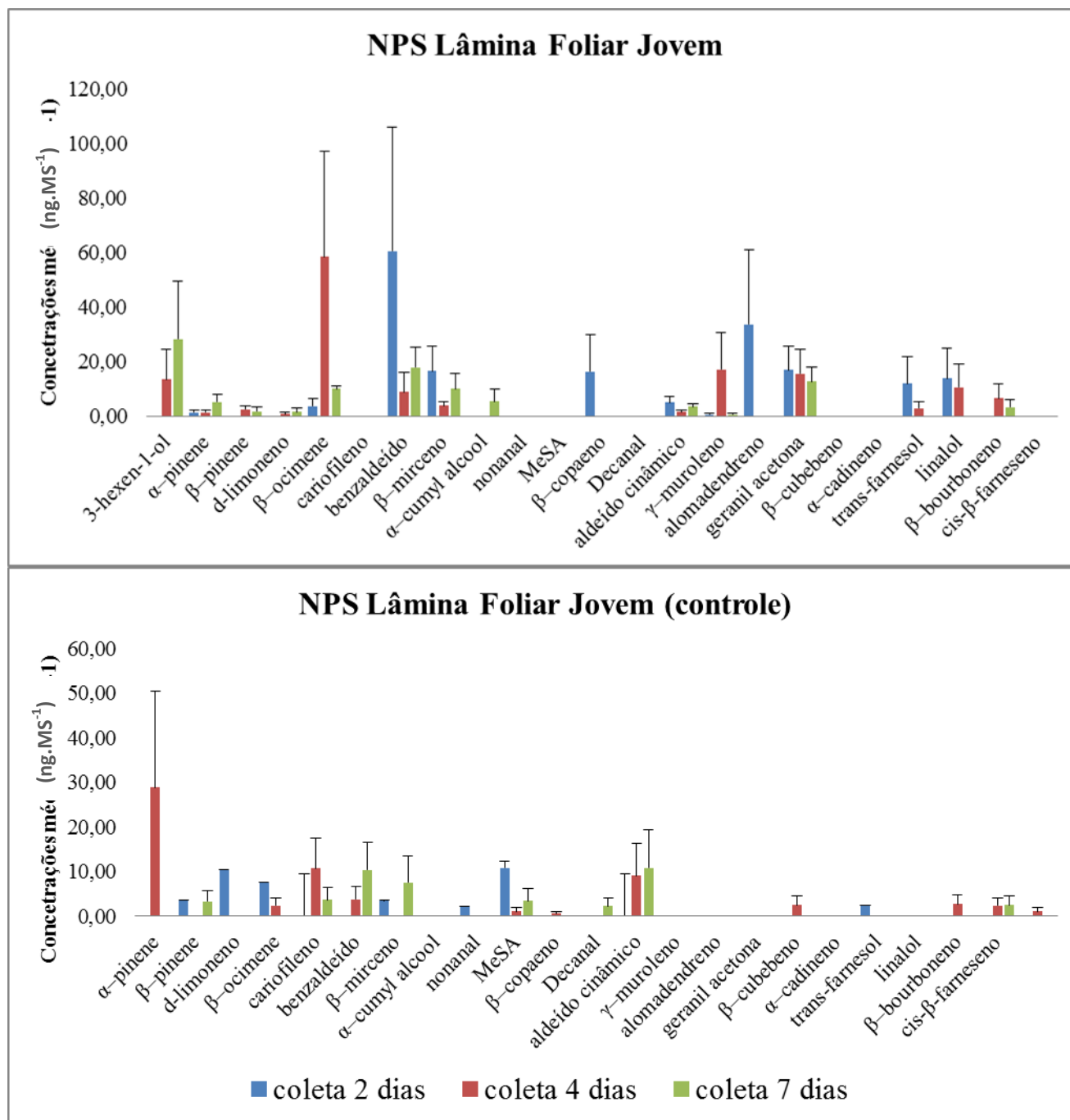


Figura 17 - Exposição ao ozônio ao longo de sete dias. Comparações entre lâminas foliares jovens expostas ao NPS e seu controle (H₂O deionizada) considerando os períodos de coleta de voláteis. Concentrações médias dos voláteis emitidos entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias.

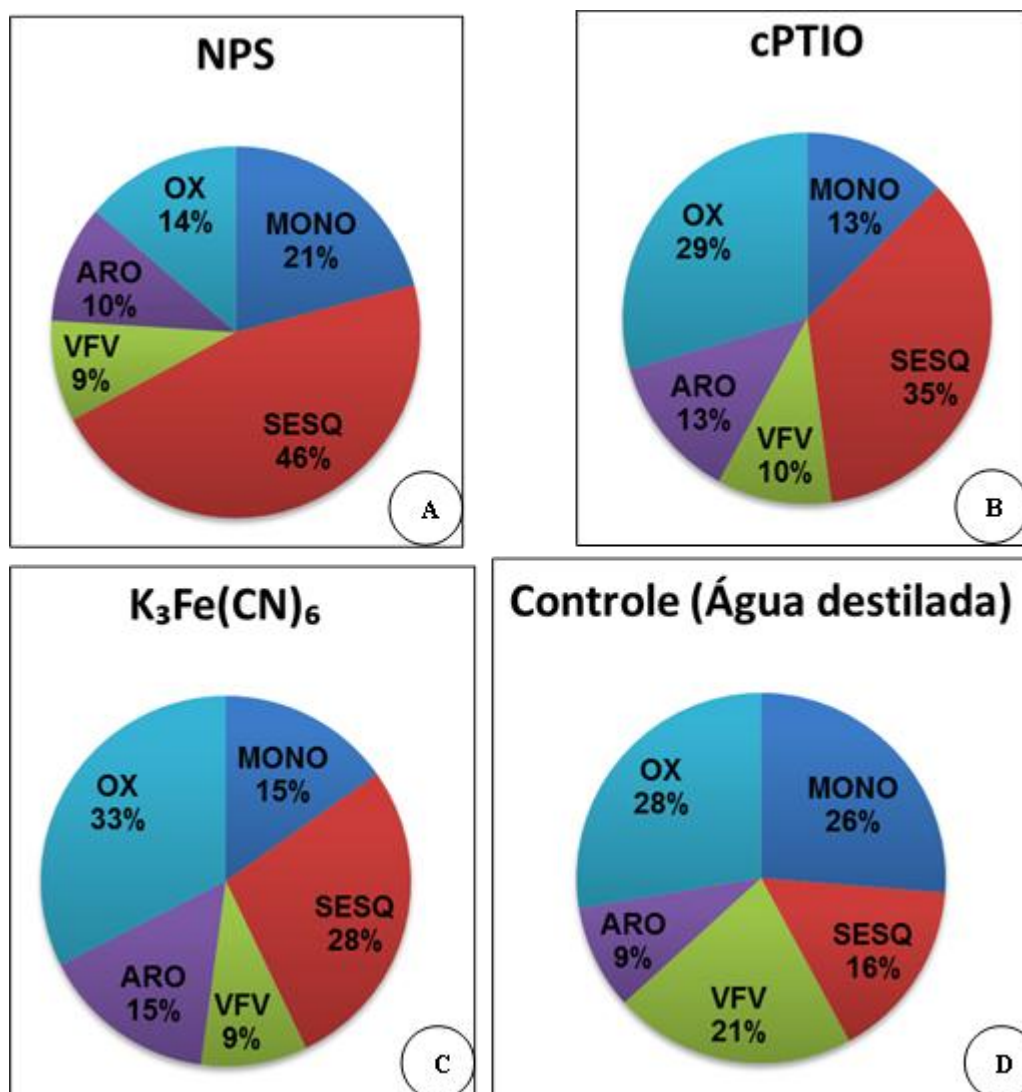


Figura 18 - Distribuição em porcentagem de emissão de compostos orgânicos voláteis em lâminas foliares jovens após exposição ao NPS (nitroprussiato de sódio), cPTIO ((2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido) e K₃Fe(CN)₆ em um período de 7 dias. Exposição em lâminas foliares jovens. OX: *oxigenados*, MONO: *monoterpenos*, SESQ: *sesquiterpenos*, VFV: *voláteis de folhas verdes* e ARO: *aromáticos*

Em relação às lâminas foliares adultas, nenhuma diferença estatística foi observada nos diferentes dias de tratamento (Figura 19). Contudo, no geral, observamos que os voláteis induzidos por NO (NPS) tenderam a reduzir seus níveis ao longo do período. Considerando a média dos dias amostrados, em relação às lâminas foliares adultas, não foram observadas diferenças estatísticas para os monoterpenos entre os diferentes tratamentos, em contrapartida, foi verificada a inibição total dos compostos β -pineno e d-limoneno, na presença de NO (NPS), enquanto houve uma indução de β -ocimeno, d-limoneno e β -mirceno, na ausência de NO (cPTIO). A contribuição dos monoterpenos na composição total dos voláteis mostrou-se relevante apenas na ausência de NO, totalizando 14% da composição dos voláteis emitidos (Figura 20). Para os sesquiterpenos, houve diferença estatística entre os tratamentos NPS e água para os compostos: alomadendreno ($p=0,010$), β -cubebeno ($p=0,010$) e β -bourboneno ($p=0,009$) (Tabela 5). A contribuição da soma dos sesquiterpenos na emissão total de voláteis, para os quatro tratamentos, variou de 42 a 65%, sendo que o tratamento cPTIO foi o que contribuiu para o maior valor (Figura 20), indicando que o NO apresenta potencial em inibir a produção de sesquiterpenos em folhas adultas. Em relação aos voláteis das folhas verdes, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os tratamentos, embora o indutor de NO (NPS) tenha contribuído para o aumento da concentração destes compostos (Figura 20). Para os aromáticos, não foi observado nenhuma diferença estatística entre os tratamentos. O indutor de NO não alterou a porcentagem dos aromáticos em relação à soma de todos os compostos e em comparação ao tratamento água e cPTIO (Figura 20). Em relação aos oxigenados, houve diferença estatística entre os tratamentos NPS e água para os compostos α -cumil ($p=0.05$). A porcentagem dos oxigenados foi aumentada nos tratamentos NPS e $K_3Fe(CN)_6$, comparado ao tratamento água (Figura 20).

A análise de componentes principais (APC) foi realizada para distinguir diferenças entre as folhas jovens e adultas e resumiu 78% da variabilidade total dos dados amostrais em seus dois primeiros eixos de ordenação. Para essa ordenação, foram utilizados as variáveis dos tratamentos NO (NPS) e o seu controle (H_2O). As principais variáveis associadas ao eixo 1 foram β -bourboneno, nonanal e cubebeno. O eixo 2 foi associado a 3-hexen-1ol e β -ocimeno. O eixo 1 reflete a idade da folha e o eixo 2 a composição dos voláteis. As folhas adultas foram distinguidas das jovens pela alta presença de mono e sesquiterpenos e VFV.

Tabela 5 - Concentração média de voláteis (ng.MS⁻¹) e erro padrão: tratamento óxido nítrico (lâminas foliares adultas) comparado ao controle. Negrito indica diferença significativa (p<0,05).

	Lâmina foliar adulta			
	Controle	NPS	cPTIO	K ₃ Fe(CN) ₆
Monoterpenos				
α -pineno	5,36±3,72	4,32±1,83	4,25±2,15	2,71±2,00
β -pineno	0,02±0,02	–	1,33±1,33	0,70±0,70
β -mirceno	–	–	1,25±1,25	–
β -ocimeno	10,40±5,25	1,39±1,07	28,88±25,30	1,78±1,33
d-limoneno	0,83±0,83	–	5,23±3,76	1,37±0,93
Linalol	1,20±1,20	2,87±2,07	25,30±19,99	1,40±1,40
Soma	17,81	8,58	61,99	7,96
Sesquiterpenos				
α -cadinene	–	–	–	–
β -bourboneno	93,32±50,08	56,70±22,40	135,00±60,39	3,59±2,35
β -copaeno	3,81±3,70	1,46±1,46	24,92±24,92	5,48±4,09
β -cubebeno	17,57±11,62	15,26±10,87	20,11±13,30	29,09±20,12
γ -muroleno	3,56±3,51	5,09±2,78	0,85±0,85	2,24±1,47
Alomadendreno	2,40±2,40	3,23±1,66	39,06±28,18	2,10±2,10
Cariofileno	27,85±16,05	26,01±11,40	69,43±41,35	18,69±10,20
Cis- β -farneseno	4,06±2,19	1,99±1,56	7,09±5,99	0,97±0,74
Soma	152,57	109,74	296,46	62,16
Voláteis de folhas verdes				
3-hexen-1ol	49,20±15,70	56,06±19,47	53,07±21,29	24,19±9,50
Aromáticos				
Benzaldeído	11,65±4,11	14,34±7,65	12,59±7,68	16,60±9,42
MeSA*	0,62±0,40	0,33±0,22	1,35±0,78	2,24±1,04
Soma	12,27	14,67	13,94	18,84
Oxigenados				
α -cumil álcool	–	0,48±0,48	–	1,93±1,27
Aldeído cinâmico	–	–	–	–
Decanal	22,77±5,75	22,37±11,82	16,59±6,63	16,26±9,54
Geranil acetona	6,72±2,87	21,49±13,22	7,21±5,31	12,08±5,29
Nonanal	5,82±1,75	5,70±2,33	5,40±1,47	4,69±3,44
Soma	35,31	22,37	29,20	33,03

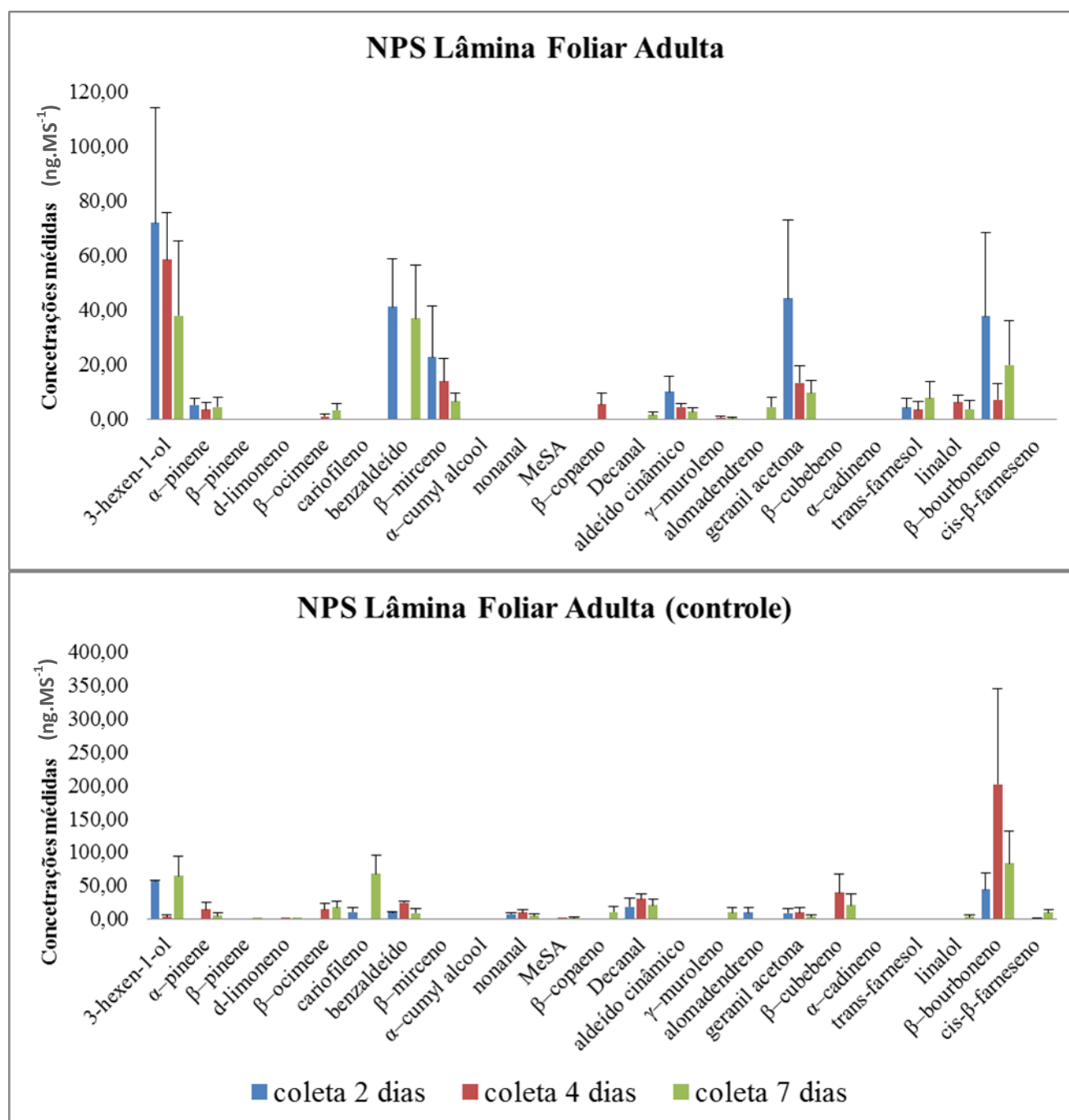


Figura 19 - Exposição ao ozônio ao longo de sete dias. Comparações entre lâminas foliares adultas expostas ao NPS e seu controle (H₂O deionizada) considerando os períodos de coleta de voláteis. Concentrações médias dos voláteis emitidos entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias.

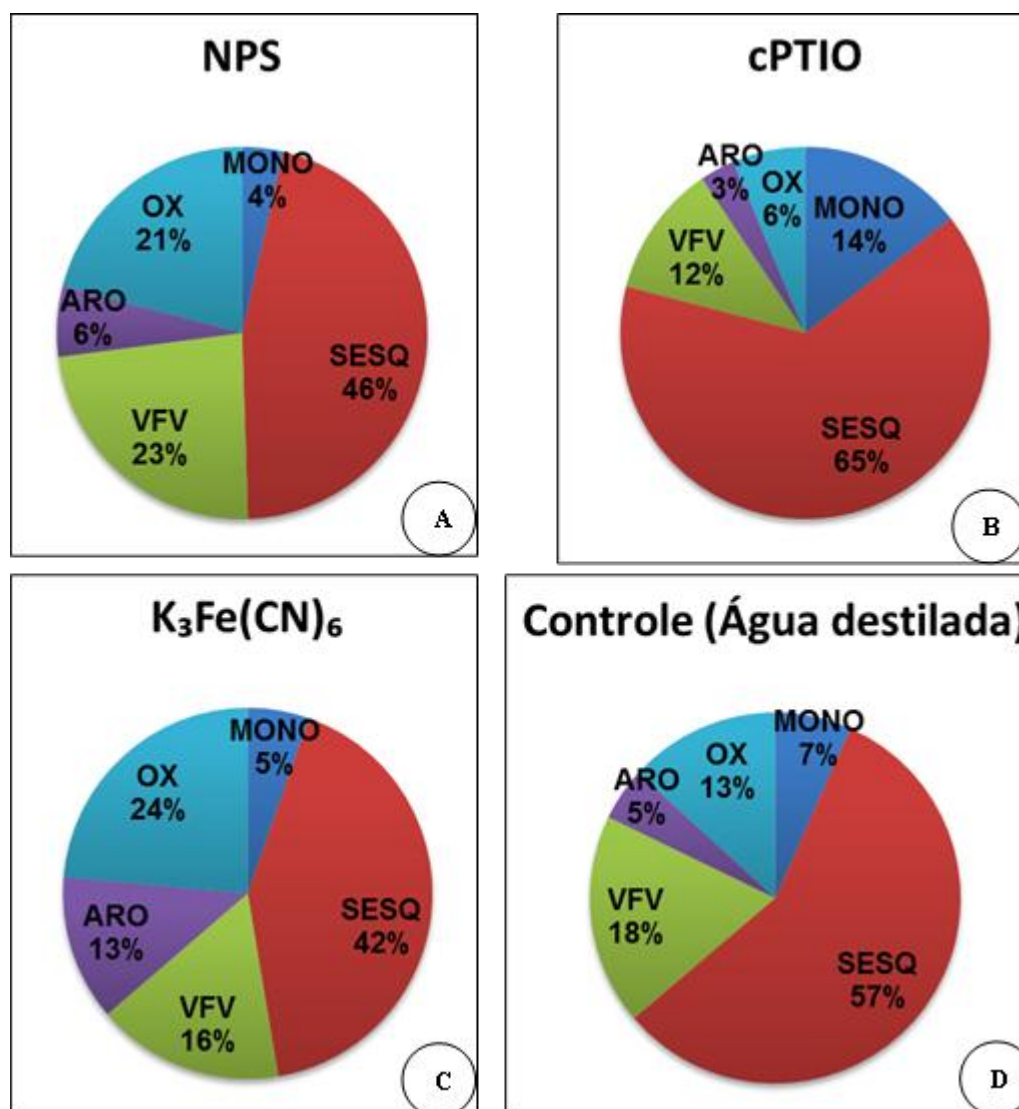


Figura 20 - Distribuição em porcentagem de emissão de compostos orgânicos voláteis após exposição ao NPS (nitroprussiato de sódio), cPTIO ((2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido) e K₃Fe(CN)₆ em um período de 7 dias. Exposição em lâminas foliares adultas. OX: oxigenados, MONO: monoterpenos, SESQ: sesquiterpenos, VFV: voláteis de folhas verdes e ARO: aromáticos.

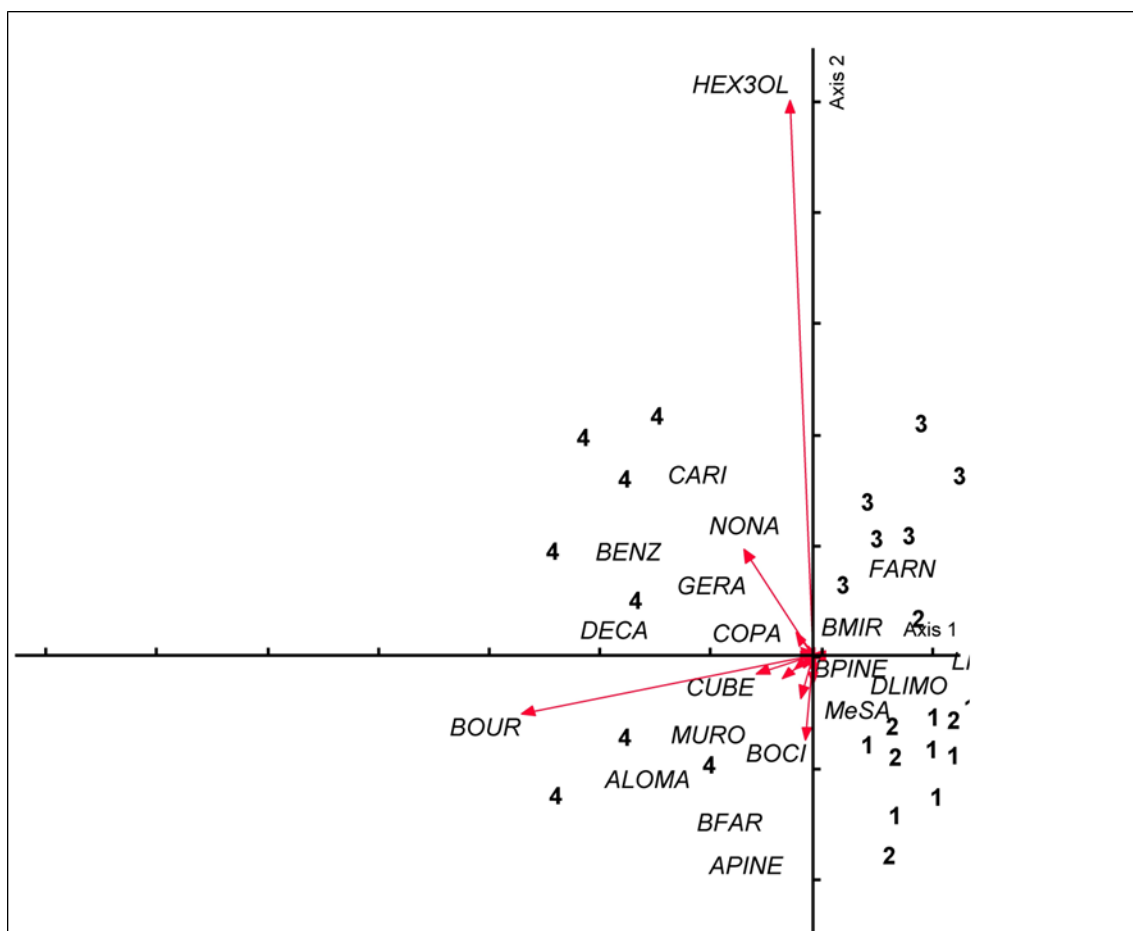


Figura 21 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *C. floribundus* sob ação do indutor de NO (NPS): 1 - Folhas jovens controle (H_2O); 2- folhas jovem expostas ao NPS, 3: folhas adulta controle (H_2O), 4 folhas adultas expostas ao NPS APINE: α -pineno; BPINE: β -pineno; BMIR: β -mirceno; BOCI: β -ocimeno; DLIMO: D-limoneno; LINA: Linalol; CADI: α -cadinene; BOURB: β -bourboneno; COPA: β -copaeno; CUBE: β -cubebeno; ALOMA: Alomadendreno; CARI: Cariofileno; BFAR: Cis- β -farneseno; HEX3OL: 3-hexen-1ol; BENZ: Benzaldeído; MeSA: Salicilato de metila; CUMIL: α -Cumyl-alcool; DECA: decanal; FARN: Trans-farnesol; GERA: Geranil acetona; NONA: nonanal; NERO: nerolidol.

A fluorescência detectada na Figura 22, em lâminas foliares jovens e adultas, indica a indução de NO na região do mesofilo, em plantas de *C. floribundus* expostas ao tratamento NPS. O controle positivo ($K_3Fe(CN)_6$) não levou ao surgimento de NO em lâminas foliares jovens e houve um ligeira indução nas lâminas foliares adultas. Como esperado, para o controle negativo (cPTIO) não houve surgimento de fluorescência indicativa de presença de NO na região do mesofilo. Em contrapartida, no tratamento água, houve a presença de NO constitutivo em lâminas foliares adultas e ausência em lâminas foliares jovens (Figura 22). Estas mesmas plantas, em seguida, foram submetidas ao teste histoquímico Nadi, sendo observado uma tendência em lâminas foliares jovens produzirem mais terpenos na região do parênquima paliçádico quando comparada às lâminas foliares adultas submetidas ao tratamento NPS (Figura 23).

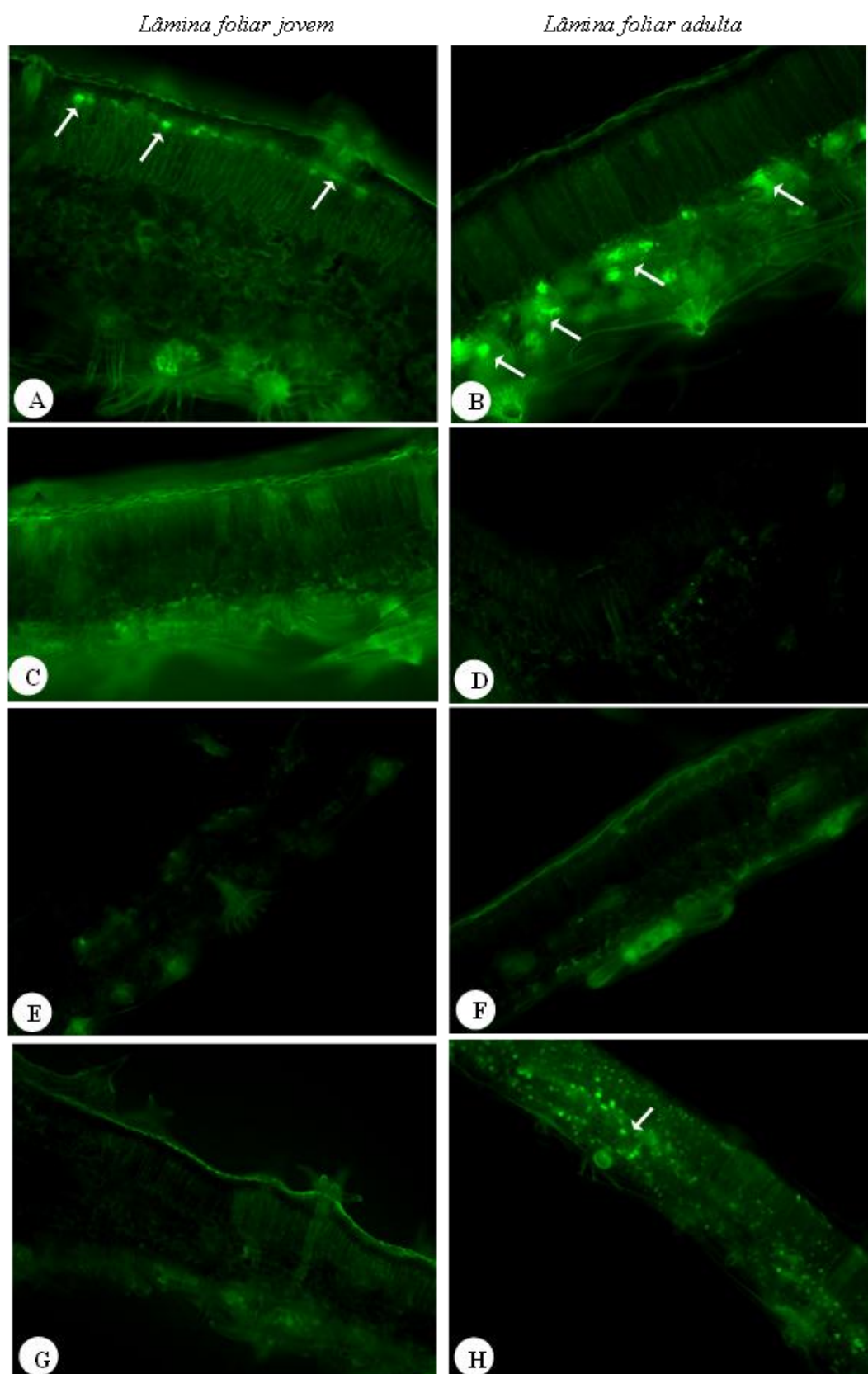


Figura 22 - Lâminas foliares de *Croton floribundus*. A e B: NPS; C e D: $K_3Fe(CN)_6$; E e F: cPTIO; G e H: Controle (água). Setas brancas indicam regiões com presença de óxido nítrico (fluorescência intensa).

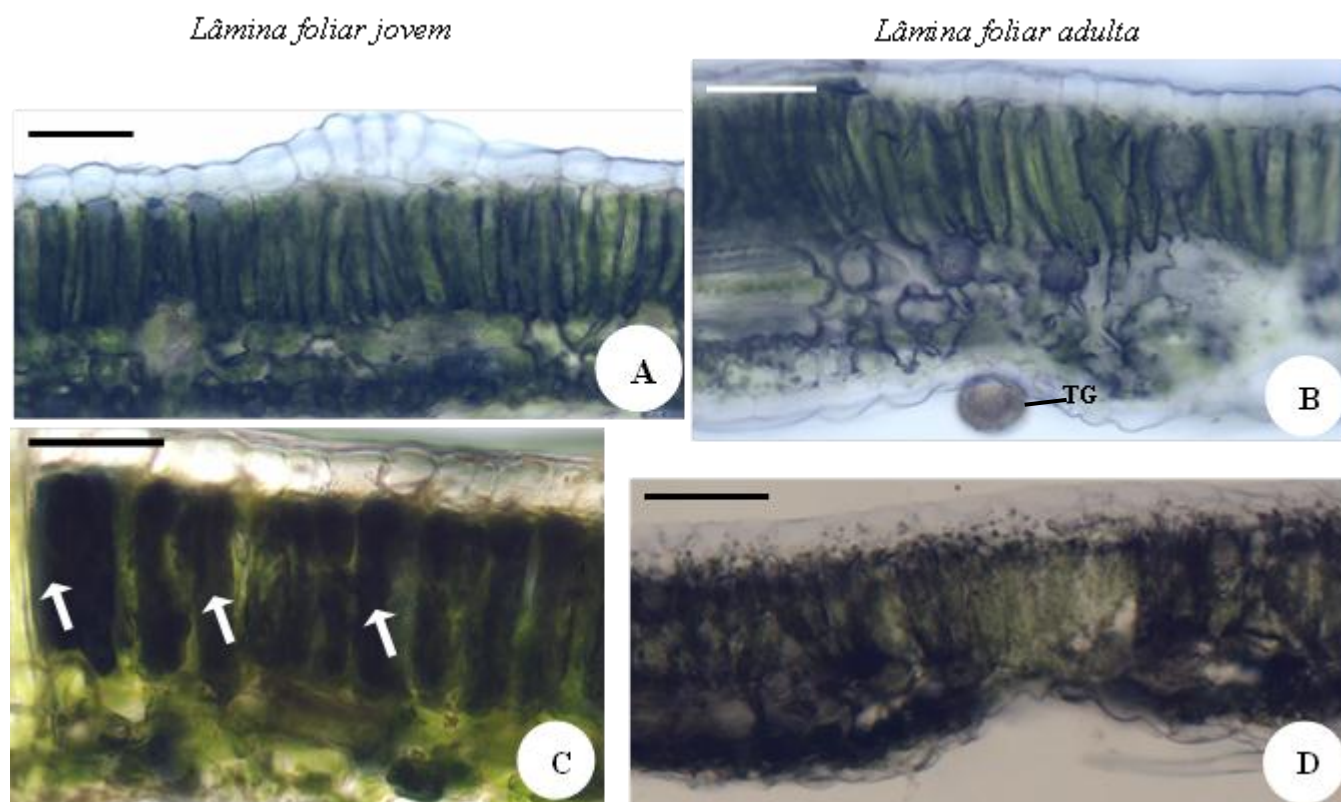


Figura 23 - Plantas de *Croton floribundus* expostas ao tratamento doador de NO (NPS). A e B: controle (H₂O deionizada); C e D: lâminas foliares jovens e adultas pulverizadas com doador de NO (NPS) ao longo de sete dias, posteriormente, submetidos ao teste histoquímico Nadi. TG: tricoma glandular. Setas brancas indicam regiões com presença terpenos. Barras: A, B e D: 50µm; C: 75µm.

5.1.4 Voláteis induzidos por Salicilato de metila

A concentração média dos voláteis induzidos no 2º, 4º e 7º dia de exposição para lâminas foliares jovens está apresentada na Figura 24. Embora não tenha sido observada diferença estatística entre os tratamentos, o tratamento MeSA tendeu a inibir os voláteis no 2º dia de exposição.

Considerando os dias de exposição como réplicas dos tratamentos, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na indução e emissão de monoterpenos nas plantas tratadas com MeSA, quando comparadas ao controle em lâminas foliares jovens. O tratamento MeSA elevou a concentração de α -pineno ($p=0,032$) e inibiu a produção de d-limoneno ($p=0,002$), enquanto induziu a produção de linalol ($p=0,032$) (Tabela 6). A porcentagem dos monoterpenos totais no tratamento MeSA foi semelhante ao seu controle (Figura 26). Para os sesquiterpenos, foi encontrado diferença significativa em β -copaeno ($p=0,031$), alomadendreno ($p=0,027$), β -cubebeno ($p=0,051$) e cis- β -farneseno ($p=0,022$) (Tabela 6). O MeSA aumentou a taxa de emissão de β -copaeno e β -cubebeno, reduzindo a emissão de alomadendreno e induzindo o cis- β -farneseno. Embora tenha sido detectadas diferenças em vários sesquiterpenos, a porcentagem dessa classe não variou se comparado ao seu controle (Figura 26). Para o VFV e aromáticos, não foram encontradas diferenças estatísticas. Em relação aos compostos oxigenados, houve diferença significativa para o decanal ($p=0,036$). A porcentagem dos oxigenados também apresentou uma baixa variação com uma diferença de 5% em relação ao seu controle.

Em lâminas foliares adultas, na classe de monoterpenos, foi observada diferença significativa apenas para o linalol ($p=0,049$), o qual foi induzido pelo MeSA (Tabela 6). Essa indução não gerou aumento na porcentagem dos monoterpenos totais (Figura 26). Dos sesquiterpenos analisados, houve aumento significativo para o cariofileno ($p=0,033$), alomadendreno ($p=0,004$) e β -bourboneno ($p=0,023$) em plantas tratadas com MeSA. Esse aumento não foi suficiente para elevar a porcentagem dos sesquiterpenos em relação ao seu controle. O tratamento MeSA promoveu um aumento significativo na emissão de VFV, 3-hexen-1-ol ($p=0,015$), variando sua porcentagem de 1% para 15 % (Figura 26). Em relação aos aromáticos, foi observada diferença significativa apenas para o benzaldeído ($p=0,047$), em que sua concentração foi aumentada quando plantas foram expostas ao MeSA. Esse aumento não foi tão pronunciado ao ponto de elevar sua porcentagem na somatória das classes de composto,

em relação ao controle. Para os compostos oxigenados em estudo, houve um aumento significativo apenas para o composto geranil acetona ($p=0,007$), o que levou um aumento de 5% na porcentagem dessa classe comparado ao controle.

Não foi observada formação de óxido nítrico nas plantas tratadas com MeSA (Figura 27 A e B). Lâminas foliares adultas, anatomicamente, apresentaram uma tendência na produção de terpenos em maior concentração no parênquima paliçádico, conforme com a (Figura 27 F).

A análise de componentes principais resumiu 59% da variabilidade total dos dados amostrais (folhas jovens e adultas) em seus dois primeiros eixos de ordenação. O composto 3-hexen-1-ol foi a principal variável associada negativamente ao eixo 1 e o cariofileno ao eixo 2. Não se observou correlações significativas dos outros compostos com os eixos 1 e 2 e também não foi observado um claro agrupamento entre os tratamentos (Figura 28).

Tabela 6 - Concentração média de voláteis (ng.MS⁻¹) e erro padrão: tratamento salicilato de metila comparado ao controle. Negrito indica diferença significativa (p<0,05).

	Lâmina foliar jovem		Lâmina foliar adulta	
	<i>MeSA</i>	<i>Controle</i>	<i>MeSA</i>	<i>Controle</i>
Monoterpenos				
α -pineno	9,91±5,02	7,87±3,73	9,76±4,26	7,61±4,81
β -pineno	1,10±1,10	2,11±1,37	5,85±4,13	–
β -mirceno	–	–	–	–
β -ocimeno	18,31±10,39	16,96±7,02	18,94±14,20	4,09±4,09
d-limoneno	–	0,94±0,94	–	–
Linalol	2,29±1,61	–	1,74±1,21	–
Soma	31,61	27,88	36,29	11,7
Sesquiterpenos				
α -cadinene	–	–	–	–
β -bourboneno	32,30±18,38	11,06±4,98	79,73±14,09	25,49±10,41
β -copaeno	15,98±6,54	9,86±3,22	39,68±10,99	17,82±8,73
β -cubebeno	15,77±6,47	4,26±3,35	24,48±8,27	22,86±11,34
γ -muroleno	6,04±3,98	6,60±4,77	32,26±13,59	4,77±4,77
Alomadendreno	2,61±2,09	9,70±7,21	16,62±6,07	1,13±1,13
Cariofileno	16,90±11,94	30,78±22,15	118,83±52,96	29,39±23,74
Cis-b-farneseno	3,26±2,02	–	22,29±12,10	9,08±8,13
Trans-farnesol	–	–	–	–
Soma	92,86	72,26	333,89	110,54
Voláteis de folhas verdes				
3-hexen-1ol	19,60±9,54	14,08±4,11	92,12±27,72	2,50±1,65
Aromáticos				
Benzaldeído	23,09±8,83	10,97±6,03	62,06±23,60	17,65±10,50
MeSA	7,28±4,79	6,52±4,87	19,86±7,43	11,70±6,57
Soma	30,37	17,49	81,92	29,35
Oxigenados				
α -cumil álcool	–	–	1,16±1,16	–
Aldeído cinâmico	–	–	–	–
Decanal	12,27±5,62	2,60±2,60	12,21±4,25	4,88±4,88
Geranil acetona	14,66±5,32	6,85±3,58	25,36±8,76	5,70±3,62
Nonanal	10,29±4,32	6,61±2,19	14,27±4,96	14,32±8,18
Soma	37,22	16,06	53	24,9

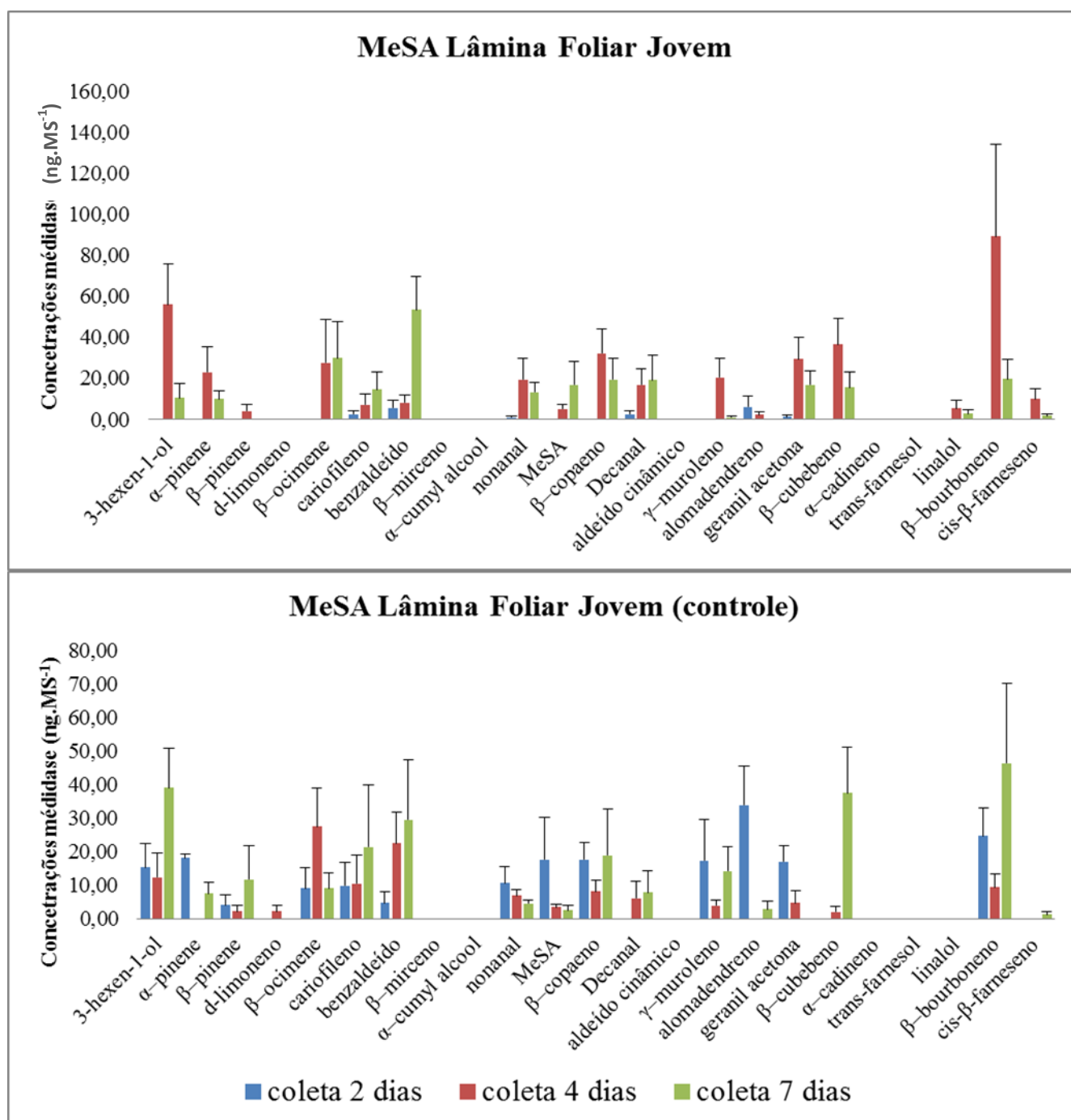


Figura 24 - Exposição ao MeSA ao longo de sete dias. **A:** lâminas foliares jovens expostas ao MeSA e seu controle (AF); **B:** lâminas foliares adultas expostas ao MeSA e seu controle (AF). Comparações entre as concentrações médias dos voláteis emitidos entre os períodos de coleta 2, 4, e 7 dias.

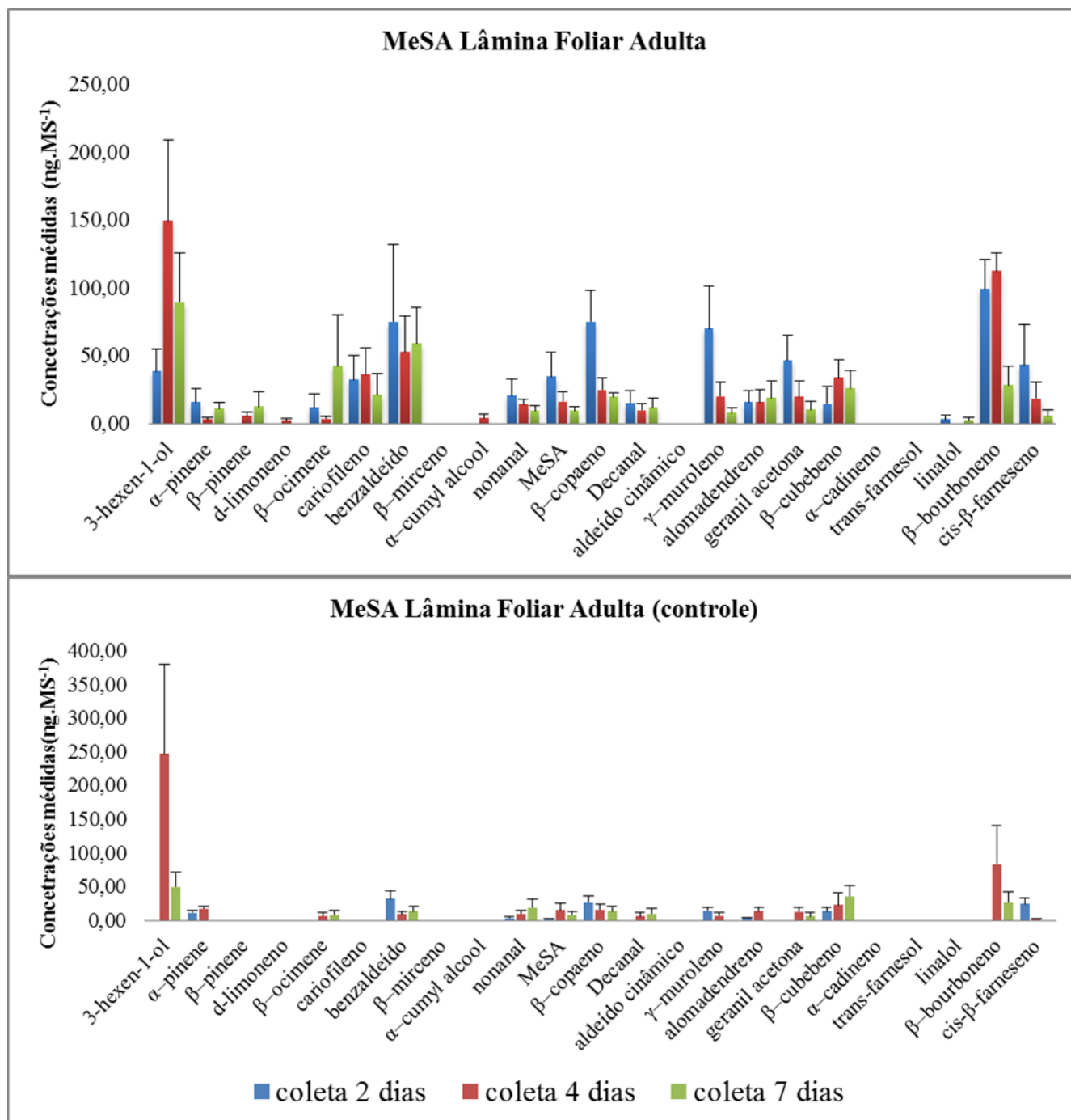


Figura 25 - Exposição ao ozônio ao longo de sete dias. Comparações entre lâminas foliares jovens expostas ao MeSA e seu controle (H₂O deionizada) considerando os períodos de coleta de voláteis. Concentrações médias dos voláteis emitidos entre os períodos de coleta 2,4, e 7 dias

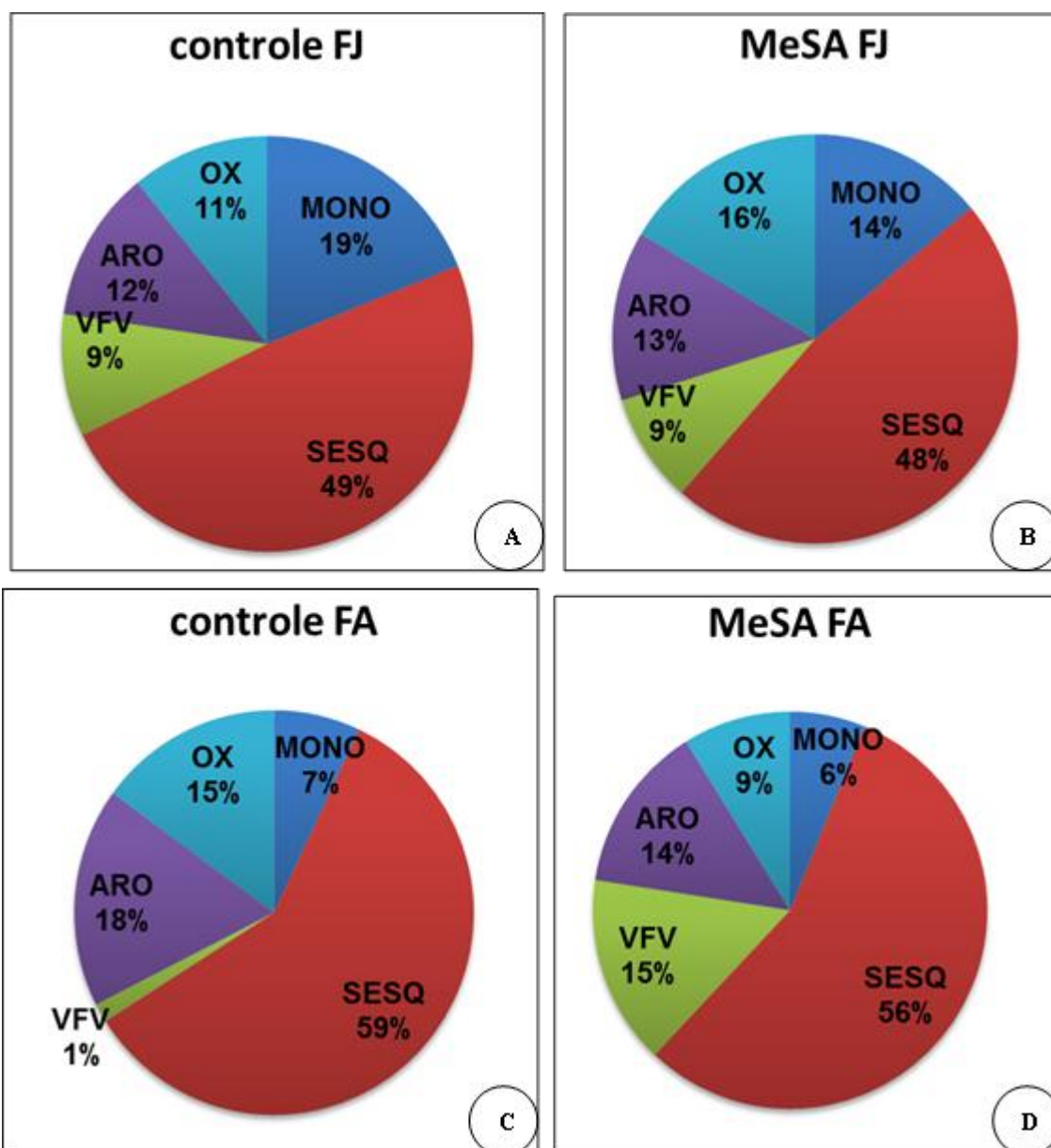


Figura 26 - Distribuição em porcentagem de emissão de compostos orgânicos voláteis após exposição à salicilato de metila em um período de 7 dias. A e B: exposição em lâminas foliares jovens. C e D: exposição em lâminas foliares adultas. OX: oxigenados, MONO: monoterpenos, SESQ: sesquiterpenos, VFV: voláteis de folhas verdes e ARO: aromáticos.

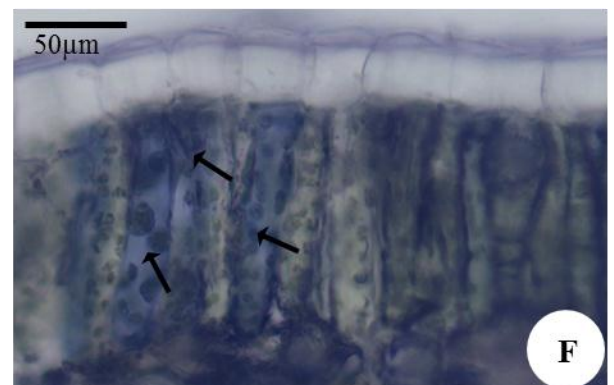
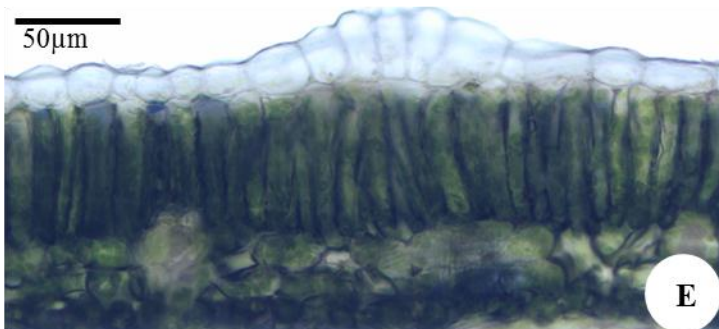
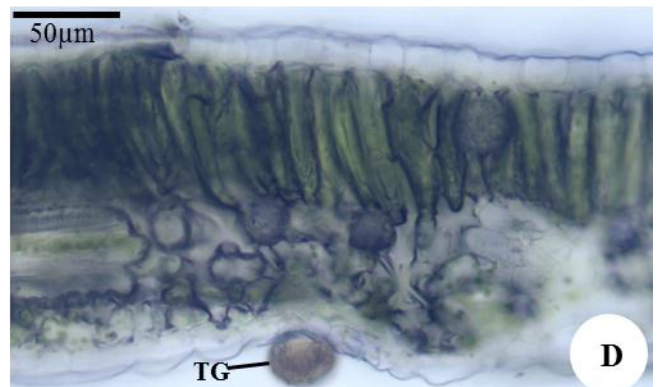
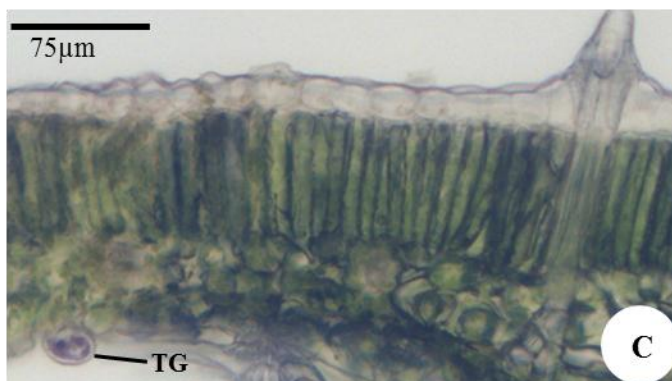
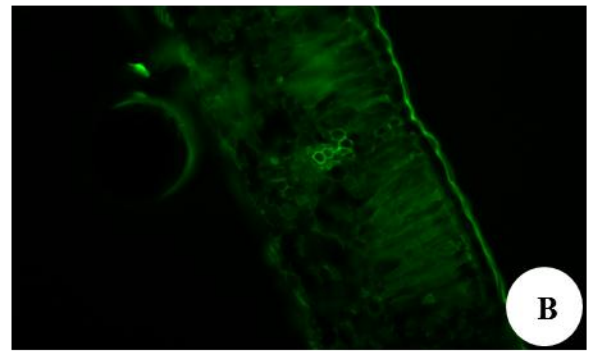
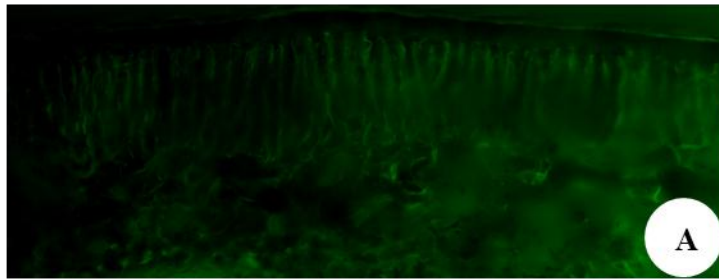
*Lâmina foliar jovem**Lâmina foliar adulta*

Figura 27 - Plantas de *Croton floribundus* expostas ao tratamento MeSA ao longo de sete dias. A e B: C e D: lâminas foliares jovens e adultas, respectivamente, submetidas à H₂O deionizada (controle); E e F: lâminas foliares jovens e adultas, respectivamente, submetidas ao teste para detecção de terpenos (Nadi). Setas pretas indicam presença de terpenos. TG: tricoma glandular. Barras: C: 75µm; D,E e F: 50µm.

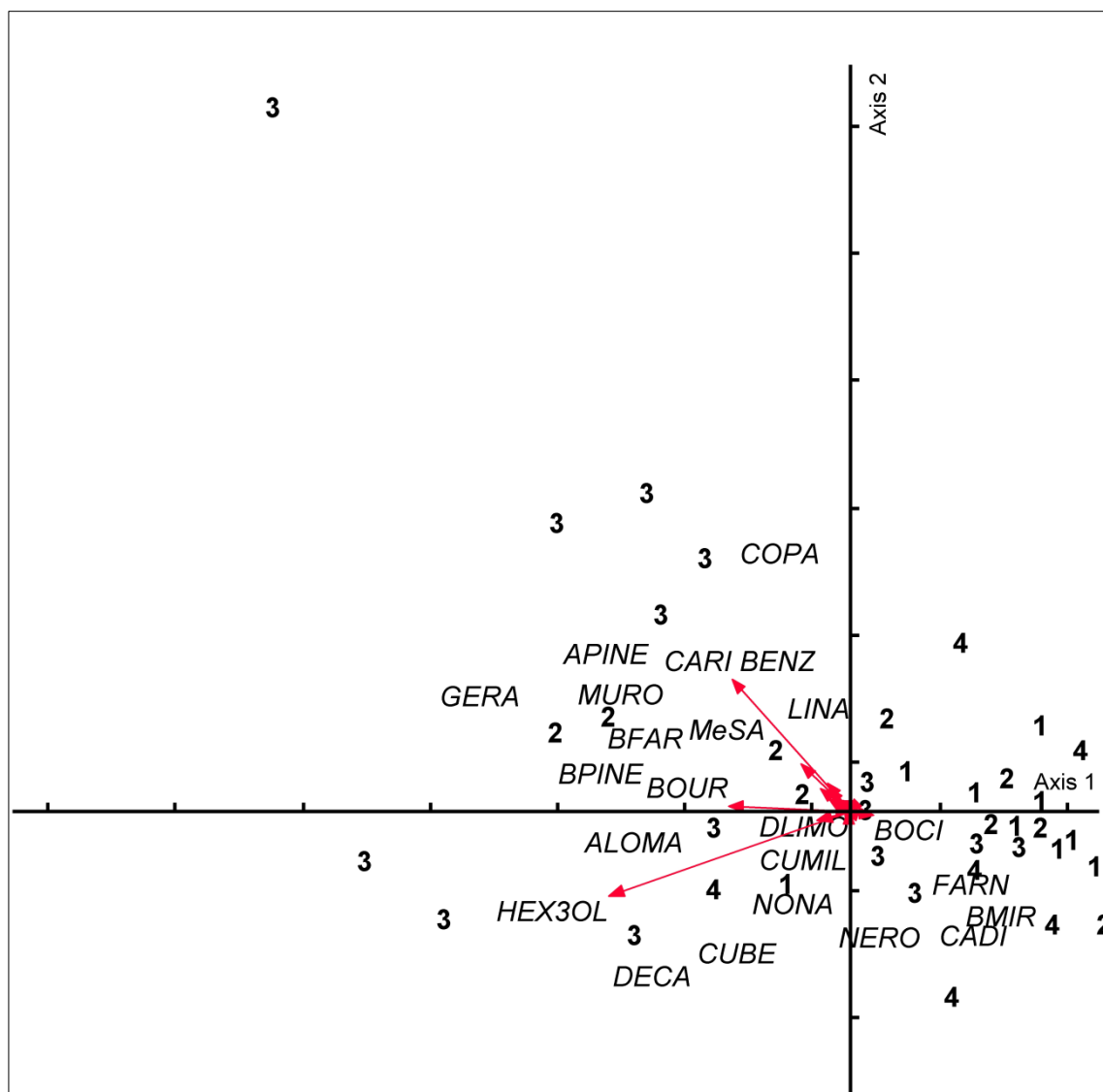


Figura 28 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *C. floribundus* sob ação de MeSA. 1: Lâminas foliares jovens controle; 2: Lâminas foliares jovens expostas ao MeSA; 3: Lâminas foliares adulta controle; 4: Lâminas foliares adultas expostas ao MeSA APINE: α -pineno; BPINE: β -pineno; BMIR: β -mirceno; BOCI: β -ocimeno; DLIMO: D-limoneno; LINA: Linalol; CADI: α -cadinene; BOURB: β -bourboneno; COPA: β -copaeno; CUBE: β -cubebeno; ALOMA: Alomadendreno; CARI: Cariofileno; BFAR: Cis- β -farneseno; HEX3OL: 3-hexen-1ol; BENZ: Benzaldeído; MeSA: Salicilato de metila; CUMIL: α -Cumyl-alcool; DECA: decanal; FARN: Trans-farnesol; GERA: Geranil acetona; NONA: nonanal; NERO: nerolidol

5.2 Relação entre os voláteis induzidos e os indutores Ozônio, Óxido Nítrico e Salicilato de Metila

Análise de componentes principais (APC) foi utilizada para estudar a relação entre os voláteis induzidos e os diferentes indutores estudados nesse trabalho. Para simplificação do estudo, duas APC foram realizadas; uma para lâminas foliares jovens (Figura 29) e outra para lâminas foliares adultas (Figura 30). A primeira componente da APC das lâminas foliares jovens explicou 36.5% da variação dos dados, sendo caracterizada pelo baixo score de voláteis que distinguiu os tratamentos de seus controles. A segunda componente da APC, explicada por 22 % do total da variação dos dados, foi caracterizada pelo alto score de voláteis, o que diferenciou os tratamentos. O tratamento ozônio foi caracterizado pela indução de monoterpenos, sesquiterpenos, voláteis de folhas verdes e salicilato de metila. Já o tratamento MeSA, se distinguiu do seu controle pelos voláteis d-limoneno e β -mirceno. Nenhum volátil foi capaz de separar o tratamento NO do seu controle.

A primeira componente da APC das lâminas foliares adultas explicou 39 % da variação total dos dados, e foi caracterizada pelo baixo score de mono e sesquiterpenos e alta score de benzaldeído e 3-hexen-1-ol. Essa componente foi capaz de agrupar as amostras em cada tratamento e, especialmente, foi responsável pela separação das amostras do tratamento MeSA e seu controle. A segunda componente, explicou 21 % da variação total dos dados e foi caracterizada por alto score de mono e sesquiterpenos. Essa componente separou o tratamento ozônio do seu respectivo controle. Não houve uma distinção clara entre o tratamento NO e seu controle.

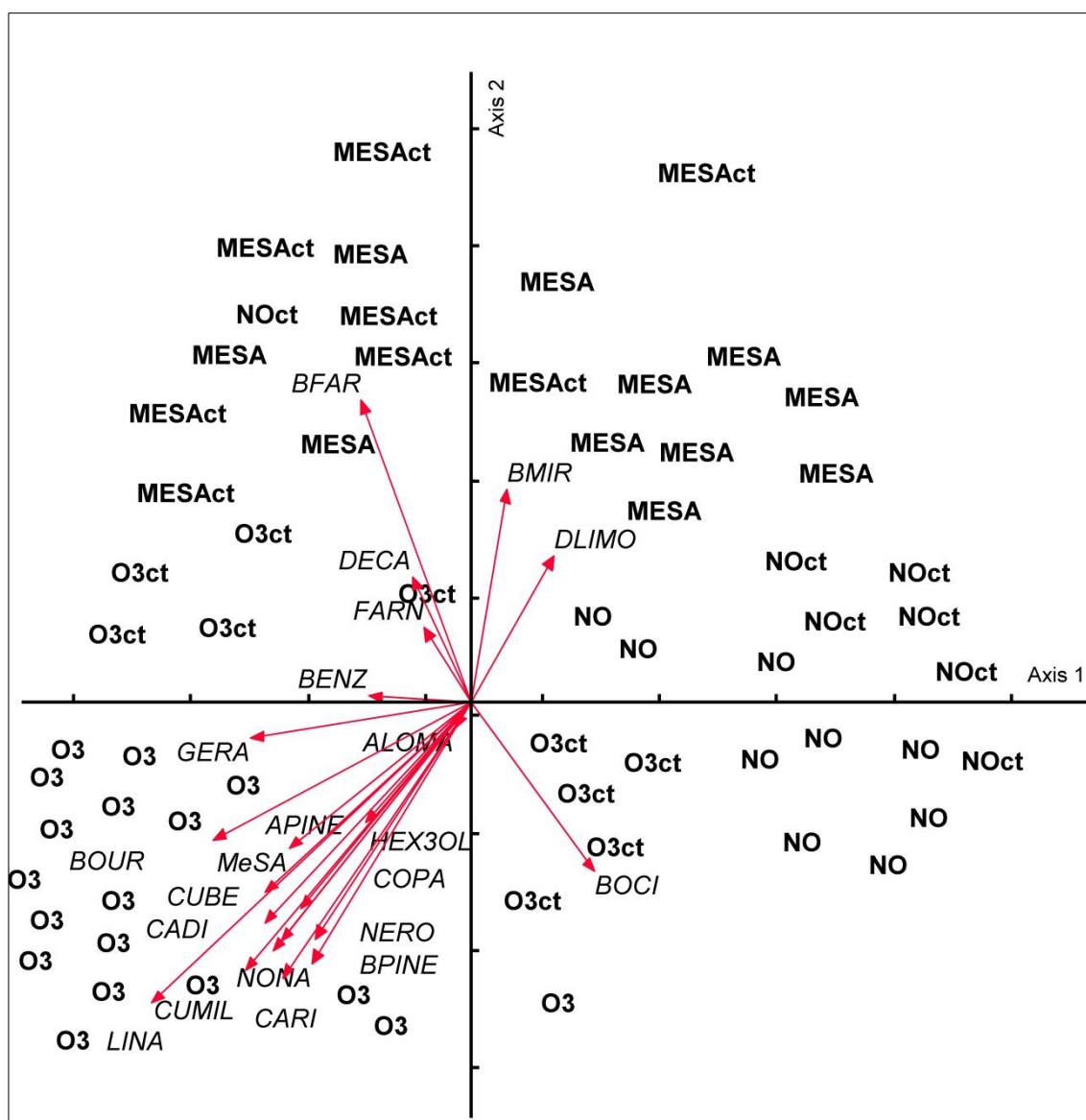


Figura 29 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por lâminas foliares jovens de *C. floribundus* sob ação dos tratamentos O₃, NO e MeSA e seus respectivos controles. O₃: ozônio, O₃CT: controle; NO: indutor de óxido nítrico (NPS), NO_{CT}: controle; MeSA: salicilato de metila, MeSA_{CT}: controle. *APINE*: α -pineno; *BPINE*: β -pineno; *BMIR*: β -mirceno; *BOCI*: β -ocimeno; *DLIMO*: D-limoneno; *LINA*: Linalol; *CADI*: α -cadinene; *BOURB*: β -bourboneno; *COPA*: β -copaeno; *CUBE*: β -cubebeño; *ALOMA*: Alomadendreno; *CARI*: Cariofileno; *BFAR*: Cis- β -farneseno; *HEX3OL*: 3-hexen-1ol; *BENZ*: Benzaldeído; *MeSA*: Salicilato de metila; *CUMIL*: α -Cumyl-alcool; *DECA*: decanal; *FARN*: Trans-farnesol; *GERA*: Geranil acetona; *NONA*: nonanal; *NERO*: nerolidol.

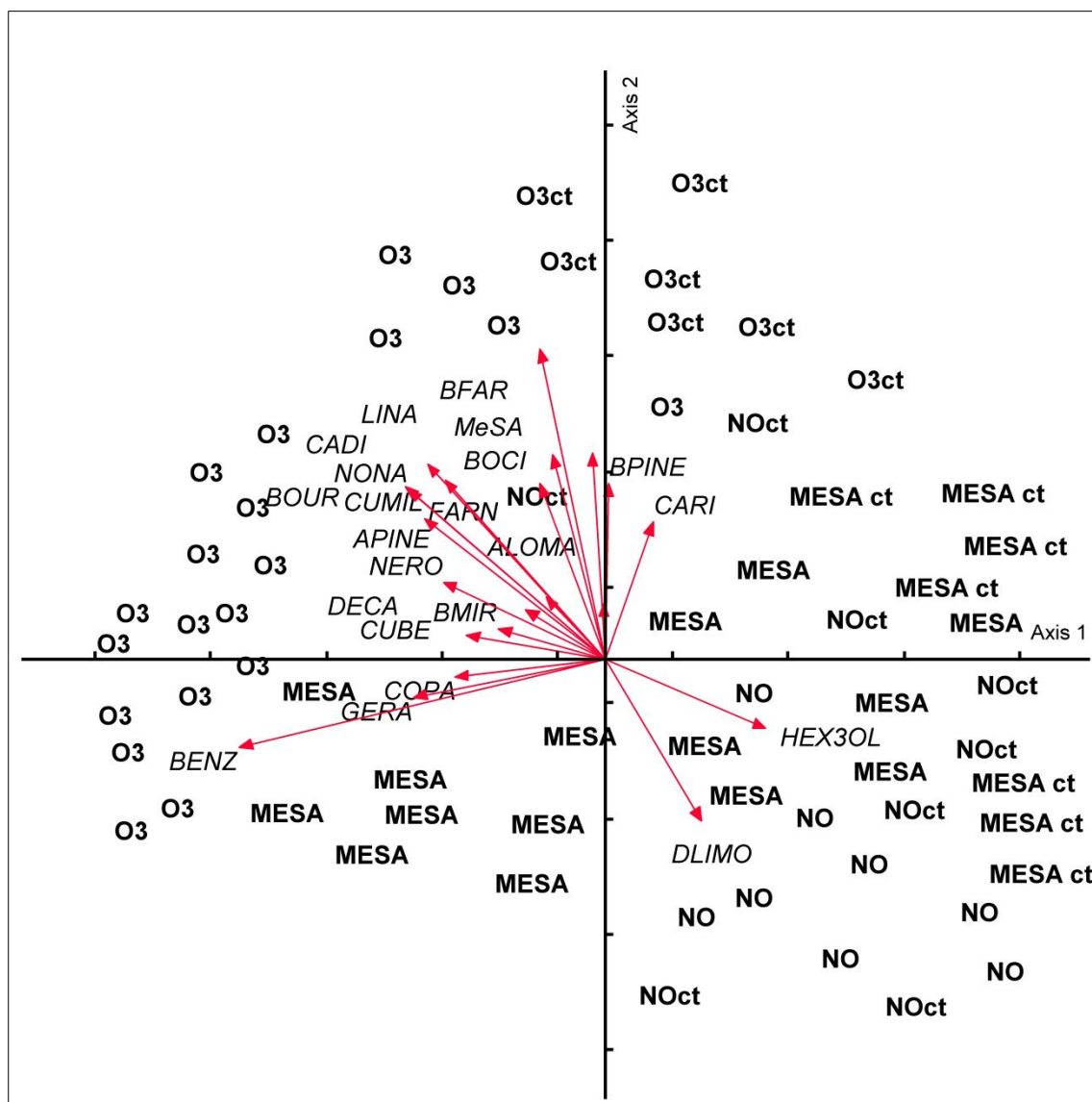


Figura 30 - Análise de componentes principais (APC) dos compostos orgânicos voláteis emitidos por lâminas foliares adultas de *C. floribundus* sob ação dos tratamentos O₃, NO e MeSA e seus respectivos controles. O₃: ozônio, O₃CT: controle; NO: indutor de óxido nítrico (NPS), NO_{CT}: controle; MeSA: salicilato de metila, MeSA_{CT}: controle. APINE: α -pineno; BPINE: β -pineno; BMIR: β -mirceno; BOCI: β -ocimeno; DLIMO: D-limoneno; LINA: Linalol; CADI: α -cadinene; BOURB: β -bourboneno; COPA: β -copaeno; CUBE: β -cubebeño; ALOMA: Alomadendreno; CARI: Cariofileno; BFAR: Cis- β -farneseno; HEX3OL: 3-hexen-1ol; BENZ: Benzaldeído; MeSA: Salicilato de metila; CUMIL: α -Cumyl-alcool; DECA: decanal; FARN: Trans-farnesol; GERA: Geranil acetona; NONA: nonanal; NERO: nerolidol.

6. Discussão

Folhas jovens e adultas de *C. floribundus* emitiram constitutivamente quantidades consideráveis de compostos orgânicos voláteis. As taxas dos compostos constitutivos variaram com os lotes de indivíduos utilizados em cada tratamento. Por exemplo, d-limoneno, um monoterpene constitutivo, foi emitido nos indivíduos controle, para os experimentos com os indutores MeSA e NO, mas o mesmo não foi observado nos controles do experimento com ozônio. O β -pineno foi encontrado constitutivamente nas lâminas foliares jovens e adultas das plântulas controle do tratamento ozônio, mas não o foi para as lâminas foliares adultas no tratamento MeSA. Essas variações nas concentrações dos voláteis constitutivos podem ser explicadas pela variabilidade genética de cada lote, bem como pelas mínimas alterações na temperatura em cada tratamento. A temperatura variou de 22-30°C, dependendo da época de cada experimento (Tabela 2). Segundo Loreto *et al.* (2001), a temperatura é um fator abiótico que tem grande influência sobre a atividade enzimática responsável pela síntese de muitos compostos orgânicos voláteis, sendo que a temperatura ótima para emissão de isoprenóides, apesar de pouco estudada, compreende um intervalo entre 25 e 30 ° C (Monson 1992, Loreto *et al.* 2001). No presente estudo, a temperatura dos experimentos se manteve, quase sempre, dentro da faixa ótima esperada, mas não foi possível manter a mesma temperatura em todos os tratamentos, o que pode ter influenciado na taxa de emissão dos voláteis das plantas utilizadas como controle.

As lâminas foliares dos indivíduos controle não emitiram os mesmos níveis de voláteis dos indivíduos que receberam os tratamentos, as classes químicas dos voláteis emitidos permaneceram constantes. O *bouquet* de voláteis constitutivos foi marcado pela presença de monoterpenos, sesquiterpenos e aromáticos. Os voláteis constitutivos de *C. floribundus* pertencentes às classes de monoterpenos e sesquiterpenos já foram reportados por vários autores como compostos que apresentam alto potencial antioxidativo (Gouinguene *et al.* 2002; Niinemets *et al.* 2004; Holopainen & Gerherzon 2010; Maffei *et al.* 2011, Bray *et al.* 2000). Entre os vários compostos constitutivos identificados em folhas jovens e adultas de *C. floribundus*, os que apresentam potencial oxidativo confirmados pela literatura são α -pineno, β -ocimeno, cariofileno, farneseno e geranyl acetona (Marques 2010). Esses monoterpenos são muito reativos (Atkinson, 1997) e podem capturar as espécies reativas de oxigênio no meio celular bem como evitar a entrada de gases oxidantes, por exemplo, ozônio, que podem contribuir para o

aumento das EROS, os quais aceleram a morte celular (Pellegrini *et al.* 2012., Fares *et al.* 2008).

Os monoterpenos, além de ser constitutivos, podem ser induzidos em respostas a condições de estresse biótico e abiótico (Loreto and Schnitzler, 2010, Pinto *et al.* 2010, Souza *et al.* 2013), atuando como antioxidantes e prevenindo danos celulares irreversíveis. A herbivoria, como exemplo de estresse biótico, é capaz de induzir significativamente a emissão de mirceno, careno, β -ocimeno, E- 4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene ((E)-DMNT) e salicilato de metila (MeSA) em indivíduos jovens de *Populus tremula* (Blande *et al.* 2007) e em *Phaseolus lunatus* (Vuorinen *et al.* 2004). Já como exemplo de estresse abiótico, o ozônio é capaz de induzir mono e sesquiterpenos, bem como os voláteis das folhas verdes, em varias espécies vegetais, tais como *Nicotina tabacum*, *Phaseolus lunatus* e *Populus deltoides* (Ariruma *et al.* 2001; Blande *et al.* 2007; Asensi-Fabado *et al.* 2013). Estudos recentes realizados no nosso grupo de pesquisa mostraram que folhas de indivíduos jovens de *C. floribundus* expostos à herbívoro *Tetranychus urticae* (Pinheiro *et al.* 2015), emitem alta taxa de mirceno, β -ocimeno, cariofileno, DMTT e MeSA. No presente trabalho, o ozônio induziu em folhas jovens de *C. floribundus*, os monoterpenos, α -pineno, β -pineno, β -ocimeno, corroborando com os dados reportados por Vuorinen *et al.* 2004, Lluizà *et al.* 2002 e Heidemann 1999, em que esses monoterpenos foram elevados em *Phaseolus lunatus*, *Ceratonia siliqua*, *Olea europaea* e *Quercus ilex* na presença de ozônio, conferindo-lhes maior tolerância a esse poluente. Os resultados ainda corroboram a nossa hipótese de que os voláteis induzidos pela herbivoria são também induzidos por ozônio.

Segundo Pellegrini *et al.* 2012, a taxa de emissão de monoterpenos e sesquiterpenos está relacionada com a idade da folha. De acordo com o autor, monoterpenos são mais abundantes em folhas jovens, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho. Os sesquiterpenos são muito mais ativos que os monoterpenos no sequestro das espécies reativas de oxigênio e, por isso, auxiliam no combate ao estresse oxidativo de forma mais efetiva. Ainda, sob ação do ozônio, os sesquiterpenos parecem ser mais induzidos que os monoterpenos (Hartikainen 2012). No presente trabalho, ozônio induziu o α -cadieno, cariofileno, β -copaeno, β -cubebeno, alomadendreno, o trans-farnesol em lâminas foliares jovens e α -cadieneno, cariofileno, γ -muruleno e trans-farnesol em lâminas foliares adultas. Segundo Hartikainen (2012), sesquiterpenos são compostos comumente induzidos por ozônio em *Betula pendula*

Roth, espécie considerada tolerante ao estresse extremo. Vários outros estudos tem sido relatados de que espécies vegetais que emitem sesquiterpenos quando estão sob estresse são muito mais tolerantes do que as não emissoras dessa classe de compostos (Pelegrini *et al.* 2012). *C. floribundus* tem sido considerado uma espécie tolerante por apresentar defesas antioxidativas elevadas e características anatômicas peculiares, por exemplo presença de uma densa camada de tricomas não-secretores estrelares, que lhe confere uma alta resistência a ataques por herbívoros (Domingos *et al.* 2015). Até o momento, não tinha sido relatado que essa espécie vegetal apresentava alta taxa de emissão de sesquiterpenos sob ação do ozônio, o que deve contribuir para o aumento de sua tolerância ao estresse oxidativo (Gouinguene *et al.* 2002).

Os sesquiterpenos, por exemplo, β -cariofileno, tem atividade bactericida (Huang *et al.* 2012) e pode atuar como repelente à herbivoria (Blande *et al.* 2014). Além disso, β -cariofileno, farneseno e alomadendreno são considerados voláteis florais atuantes na polinização (Souza *et al.* 2013; Huang *et al.* 2012). Essa atividade dual dos sesquiterpenos podem ser contrabalanceada pela presença de monoterpenos (Vickers *et al.* 2009). Em nossos estudos, a porcentagem de sesquiterpenos foi reduzida em folhas adultas e, em contrapartida, a porcentagem de monoterpeno foi mantida constante em ambas as folhas, em indivíduos expostos ao ozônio. Essa alteração do *bouquet* dos voláteis promovida pelo ozônio aponta a ação biológica dos voláteis de *C. floribundus* pode ser alterada na presença desse poluente.

Vários estudos relatam que a alteração da composição do *bouquet* dos voláteis promovida por ozônio implica em mudanças nas interações ecológicas, levando, muitas vezes, ao aumento da herbivoria e redução da atração de polinizadores (Blande *et al.* 2012; Pinto *et al.* 2010; Holopainen *et al.* 2010) e, por isso, acreditamos que a alteração da composição dos voláteis de *C. floribundus* devido a ação do ozônio pode levar a distúrbios ecológicos dessa espécie vegetal ainda não conhecidos.

Além dos mono e sesquiterpenos, os voláteis das folhas verdes e metil salicilato são compostos atuantes na atração e repelência à patógenos e herbívoros (Beauchamp *et al.* 2005). Os VFV, frequentemente chamados como produto do LOX, são produzidos no momento em que há ruptura foliar (Beauchamp *et al.* 2005). Fisiologicamente, esses compostos tem propriedade antibiótica, inibindo a invasão de tecidos danificados e tem função sinalizadora entre plantas. Recentes achados têm mostrado que o estresse abiótico, por exemplo ozônio, altera a taxa de emissão desses voláteis, sugerindo degradação da membrana celular (Pinto *et al.* 2010). Em nossos estudos, uma diferença

significativa foi observada na taxa de emissão dos 3-hexen-1ol em folhas jovens e adultas, sendo que maior variação foi observada em folhas jovens, corroborando a análise de componente principais, em que 3-hexen 1-ol está entre os compostos que distingue a idade das folhas. Se considerarmos que lâminas foliares jovens são mais resistentes ao ozônio, por apresentarem maiores níveis de sesqui- e monoterpenos, danos celulares deveriam ocorrer em menores proporções quando comparado às folhas adultas. Danos visíveis foram observados tanto em folhas jovens quanto em folhas adultas, contudo, os níveis de 3-hexen-1ol, um indicador de distúrbio da membrana celular, foram maiores nas folhas jovens. A redução do 3-hexen-1ol em lâminas foliares adultas pode ser explicada pelo drástico aumento de MeSA e não significa que o processo oxidativo não tenha ocorrido. De acordo com Sayyari *et al.* (2011) e Llusia *et al.* (2005), o MeSA é um sinalizador com alto potencial de indução das defesas químicas, elevando, por exemplo, os níveis de compostos fenólicos, antiocianinas e antioxidantes totais, o que aumenta a resistência ao estresse biótico (Aghdam & Bodbodak 2013) e abiótico (Peñuelas *et al.* 2007) e segundo Cardoso-Gustavson *et al.* 2014, as defesas antioxidantes de *C. floribundus* induzidas por MeSA leva a um acúmulo de Ca^{+2} que pode alterar a taxa de emissão de produtos do LOX (Heiden *et al.* 2003). Assim, os altos níveis de MeSA podem estar relacionados aos baixos níveis de VFV, porém, os altos níveis de compostos oxigenados em lâminas foliares adultas, sugerem que os danos oxidativos estão também acontecendo.

O ozônio pode provocar uma resposta sistêmica generalizada, exigindo um aumento nas defesas antioxidantes como um todo, que muitas vezes é sinalizada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), hormônios (Jasmonatos, etileno e metil salicilatos) e óxido nítrico (NO). As respostas ao ozônio são muitas vezes semelhantes às ocorridas pela herbivoria (Gosset *et al.* 2009). No presente trabalho, os voláteis induzidos pelo ozônio em *C. floribundus* são os mesmos reportados na literatura em lima Bean infestada por *T. urticae* (Holoapenen 2004, Zhu & Park 2005) e *A. bétula* infestada por *Euceraaphis betulae* (Blande *et al.* 2010)

Além dos compostos orgânicos voláteis induzidos pelo ozônio, o NO endógeno também é um indicador de que as espécies vegetais estão com suas defesas químicas ativadas (Zuccarelli, 2015). Em nosso trabalho, o ozônio promoveu aumento na produção de NO tanto em lâminas foliares jovens quanto em adultas, indicando que as defesas químicas foram ativadas na plântula como um todo, independente da idade da folha.

Numerosos estudos têm sugerido que NO é uma importante molécula sinalizadora atuante em muitos processos fisiológicos, incluindo o crescimento, o desenvolvimento e a indução de respostas de defesa (Delledonne *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000; Delledonne *et al.*, 2001; Velikova *et al.*, 2005). É também notável por ser altamente lipofílico, permeando com facilidade as membranas celulares e por consistir, em sua forma neutra (NO.), de um radical livre, característica essa que confere alta reatividade e instabilidade química, permitindo sua participação em inúmeras reações químicas no meio celular (Zuccarelli, 2015). A especificidade de sua ação como molécula sinalizadora é altamente dependente da concentração no meio celular e da velocidade de reação com outros compostos (McCleverty 2004). Dependendo dos seus níveis celulares, o NO pode levar ao aumento de espécies reativas culminando no estresse oxidativo ou atuar como sinalizador de defesas químicas (Gupta *et al.*, 2011). O balanço entre promover uma sinalização e causar um estresse oxidativo, está diretamente associado com a intensidade do estresse (Ederli *et al.*, 2006; Zucarelli, 2015). Estresse crônico pode induzir o NO, o qual é esperado sinalizar a ativação da rota do MeSA, ET e JA (Vickers *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2010). MeSA e JA são particularmente importantes na indução de defesas indiretas, como por exemplo as emissões de COV induzidos (Pinto *et al.*, 2010). É provável que a MeSA e JA regulem a via biossintética MEP (Bartram *et al.*, 2006), que produz sesquiterpenos no citosol. Em nossos estudos, o indutor de NO foi capaz de elevar os níveis de alguns mono e sesquiterpenos em lâminas foliares jovens e, em contrapartida, reduzir e/ou inibir os seus níveis em lâminas foliares adultas, inclusive foi mostrado que o d-limoneno é NO-dependente. Entretanto, o NO não foi capaz de induzir o MeSA como era esperado. Entretanto, MeSA e terpenos foram elevados em lâminas foliares jovens e adultas sob ação do ozônio, sugerindo que a sinalização para produção de MeSA em *C. floribundus* não parece ser ativada pelo NO. É também notório que tanto plantas expostas ao ozônio quanto as expostas ao indutor de NO promoveram elevado aumento de NO no meio celular, indicando que ambos os indutores são capazes de sinalizar a ativação das defesas primárias.

Contrariamente ao indutor NO e O₃, o indutor MeSA não foi capaz de gerar NO em lâminas foliares jovens e adultas, contudo, foi capaz de induzir a produção de mono e sesquiterpenos em lâminas foliares jovens e adultas. Esse resultado levanta a hipótese de que a produção de terpenóides não é dependente da associação entre NO e MeSA. A ação de ambos os sinalizadores no meio celular parece ser independente. O MeSA não é

ativado pela ação do NO, porém ambos atuam como precursores de terpenos e, inclusive, de voláteis de folhas verdes, que são considerados os primeiros sinalizadores de defesa.

A aplicação de MeSA em plantas tem sido relatado por vários autores (Cardoso-Gustavson *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2005; Ament *et al.*, 2004; Ozawa *et al.*, 2000). Esse indutor aumenta a resistência ao estresse às baixas temperaturas, devido ao acúmulo de compostos antioxidantes (Sayyari *et al.* 2011), promove acúmulo de íons Ca^{2+} , diminuindo a herbivoria (Cardoso-Gustavson *et al.*, 2014), e altera o perfil dos isoprenóides (Penuleas *et al.*, 2007; Ozawa *et al.*, 2000). No presente trabalho, o MeSA induziu a produção de mono e sesquiterpenos, que são considerados atuantes nas interações ecológicas.

Comparando os diferentes indutores estudados, podemos afirmar que a composição dos voláteis induzidos e/ou inibidos parece ser dependente das características químicas e sinalizadoras de cada indutor químico. Por exemplo, ozônio, uma molécula oxidante e altamente reativa, foi o que induziu a maior taxa de compostos orgânicos voláteis, especialmente, os oxigenados, característicos de processos oxidativo, o que era de se esperar. Já é comprovado que o ozônio eleva a produção de (E)- β -ocimeno, limoneno, linalool, e nonanal em várias espécies vegetais rompendo a sinalização entre plantas e as interações tróficas oriundas desses voláteis (Blande *et al.*, 2014). Em contrapartida, o NO, uma espécie oxidante menos agressiva e ainda, considerada uma molécula sinalizadora, não promoveu alterações significativas nos níveis de voláteis estudados. Já o MeSA, que é uma molécula pouco reativa, mas também considerada sinalizadora, foi capaz de induzir provavelmente a via do ácido chiquímico, uma vez que altos níveis de benzaldeídos foram detectados e também a via de sesquiterpenos, mas nada comparado ao ozônio.

7. Considerações finais

Os compostos orgânicos voláteis das plantas apresentam várias funções ecológicas, como a atração de polinizadores e inimigos naturais de pragas e a sinalização de defesas químicas. Eles também são considerados compostos antioxidantes que combatem o estresse oxidativo. No presente trabalho, mostramos que o *bouquet* de voláteis constitutivos de *C. floribundus* é formado de mono e sesquiterpenos que apresentam alto potencial oxidativo, o que indica tolerância da espécie ao estresse.

O estresse pode ser originado de várias fontes bióticas e/ou abióticas. Em relação às fontes abióticas, as mudanças climáticas podem ser consideradas as principais fontes de estresse nas plantas na atualidade. Alterações da temperatura, mudanças do ciclo de chuvas e aumento dos poluentes atmosféricos são alguns dos fatores de maior impacto à vegetação. Entre os poluentes atmosféricos considerados fitotóxicos, destacam-se o ozônio e o óxido nítrico, os quais apresentam ação oxidativa e podem induzir ou inibir a produção de voláteis, além de sinalizar as defesas químicas. No presente estudo, consideramos esses dois poluentes como agentes indutores. O MeSA não é considerado um poluente atmosférico, mas é emitido pela vegetação e tem sido encontrado em atmosfera de regiões florestais.

Assim, o presente trabalho permitiu concluir e comprovar a hipótese levantada: os indutores químicos ozônio, óxido nítrico e salicilato de metila foram capazes de induzir a emissão de uma mistura complexa de compostos orgânicos voláteis em *Croton floribundus*, embora em alguns casos, tenha sido observada a inibição de alguns destes compostos. Lâminas foliares jovens e adultas emitiram constitutivamente quantidades consideráveis de voláteis, no entanto, ambas responderam de maneiras diferentes após as exposições aos diferentes tratamentos. De fato, observamos não apenas variação nas quantidades dos voláteis emitidos, o que poderia ser uma resposta proporcional direta ao nível de dano, mas mudanças no *bouquet* emitido, com a priorização da emissão de uma classe específica de voláteis em relação à outra. Logo, de acordo com os resultados obtidos, há indícios de que a idade, ou estágio de desenvolvimento foliar, contribuem de formas diferentes para a emissão dessa mistura complexa de voláteis, podendo estar relacionadas às respostas de defesas da planta aos diferentes agentes causadores de estresse.

O ozônio foi capaz de induzir mais compostos voláteis oxigenados, característicos de processos oxidativo, nas lâminas foliares adultas comparadas às jovens, sugerindo maior defesas das lâminas foliares jovens. Voláteis induzidos por herbivoria tais como, MeSA e produtos da via LOX, também foram induzidos por ozônio, em lâminas foliares jovens e adultas, indicando que as defesas nas folhas adultas também são ativadas. Este estudo demonstrou que o ozônio tem potencial em induzir NO. Comparativamente, foi notado uma tendência de plantas expostas ao ozônio produzirem óxido nítrico em seu parênquima paliçádico e lacunoso, além de produção de terpenos no parênquima paliçádico.

O óxido nítrico induziu mono e sesquiterpenos nas lâminas foliares jovens e ainda, mostramos, que o d-limoneno é NO-dependente. Lâminas foliares jovens produziram mais terpenos, quando comparadas às lâminas foliares adultas, na região do parênquima paliçádico. Ambas as lâminas foliares foram capazes de produzir óxido nítrico endógeno quando expostas ao indutor de NO, sendo este relatado na literatura como uma molécula sinalizadora, reguladora de processos bioquímicos e atuando tanto como oxidante quanto antioxidante.

Já o MeSA foi capaz de induzir o 3-hexen-1-ol, composto que participa das defesas indiretas das plantas, mas em menores níveis quando comparados ao ozônio. Mono e sesquiterpenos também foram induzidos pelo MeSA, embora uma variação na emissão total de cada classe não tenha sido notória. O MeSA não induziu o NO em lâminas foliares jovens e adultas. Logo, sugere-se que a emissão de voláteis é independente de qualquer interação entre NO e MeSA.

Ainda, estes voláteis de plantas que foram induzidos pelos diferentes indutores químicos, e conforme comparado com a literatura, estão relacionados com as classes de compostos orgânicos voláteis com papel fundamental nas interações ecológicas.

O estudo realizado no presente trabalho, além de caracterizar os voláteis de *C. floribundus* decorrentes da exposição ao ozônio, óxido nítrico, salicilato de metila, também nos trouxe uma série de questões quando comparamos esses voláteis com os reportados na literatura, permitindo-nos uma melhor reflexão sobre trabalhos futuros.

Por exemplo, a indução dos voláteis de planta por agente abióticos pode ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de estratégias ecológicas e sustentáveis para o programa de manejo integrado de pragas. Os voláteis induzidos por agentes químicos indutores, como MeSA e JA, têm despertado o interesse na comunidade científica, uma vez que eles podem atuar na indução de voláteis que não só guiam os inimigos naturais

em direção à planta hospedeira da presa, mas também na mediação de várias interações ecológicas. No presente estudo, mostramos que o óxido nítrico tem um perfil de indução semelhante ao MeSA e, por isso, pode ser interessante para o manejo de praga.

Do ponto de vista ecológico, tivemos indícios de que os voláteis associados ao sistema de defesa, estavam fortemente ligados às características oxidantes do agente estressor. Neste contexto, acreditamos que os COV poderão ser marcadores de estresse e possivelmente, em estudo de campo, poderão elucidar se uma dada área vegetal está sob forte impacto de um agente oxidante. Assim, concluímos que uma abordagem mais sistêmica e ecologia deve ser aprofundada para obtenção de uma visão mais ampla das estratégias de defesas das plantas nas interações planta-planta e planta-herbívoro, em ambientes contaminados.

8. Referências

- Aghdam, M.S. & Bodbodak, S.** 2013. Physiological and biochemical mechanisms regulating chilling tolerance in fruits and vegetables under postharvest salicylates and jasmonates treatments. *Scientia Horticulturae* 156: 73-85.
- Arimura, G., Matsui, K., Takabayashi, J.** 2009. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiology* 50: 911-923.
- Arimura, G., Ozawa, R., Horiuchi, J., Nishioka, T., Takabayashi, J.** 2001. Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 1049-1061.
- Asensi-Fabado, M. A., Oliván, A., Munné-Bosch, S.** 2013. A comparative study of the hormonal response to high temperatures and stress reiteration in three *Laiatae* species. *Environmental and Experimental Botany* 94: 57-65.
- Atkinson, R., Baulch, R. A., Cox, J. N., Crowley, R. F., Hampson, R. G., Hynes, M. E., Jenkin, M. J., Rossi, Tro J.** 2006. Evaluated kinetic and photochemical data for atmospheric chemistry: Volume II – gas phase reactions of organic species . *Atmos. Chem. Phys.* 6: 3625–4055.
- Atkison, R. & Arey, J.** 2003. Atmospheric Degradation of Volatile Organic Compounds, *Chemical Reviews* 103: 4605-4638.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C. C., Preston, C. A.** 2006. Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: "Talking Trees" in the Genomics. *Science* 311: 812-815.
- Baluska, F. & Ninkovic, V.** 2010. *Plant Communication from Ecological Perspective*. Springer, Alemanha.
- Baluska, F.** 2010. *Long-Distance Systemic Signaling and Communication in Plants*, Springer, Alemanha.
- Bartram, S., Jux, A., Gleixner, G., Boland, W.** 2006. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry* 67: 1661-1672.
- Beauchamp, J., Wisthaler, A., Hansel, A., Kleist, E., Miebach, M., Niinemets, U., Schurr, U., Wildt, J.** 2005. Ozone induced emission of biogenic VOC from tabacoo: relationships between ozone uptake and emission of LOX product. *Plant Cell & Environment* 28: 1334-1343.

- Bennett, R.N. & Wallsgrove, R.M.** 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127: 617–633.
- Blande, J.D., Holopainen, J.K., Ninemets, U.** 2014. Plant volatiles in polluted atmospheres: stress responses and signal degradation. *Plant & Cell, Environment* 37: 1892–1904.
- Blande, J.D., Turunen, K., Holopainen, J.K.** 2009. Pine weevil feeding on Norway spruce bark has a stronger impact on needle VOC emissions than enhanced UV-B radiation. *Environ. Pollut.* 157: 174–80.
- Blande, J.D., Tiiva, P., Oksanen, E., Holopainen, J.K.** 2007. Emission of herbivore-induced volatile terpenoids from two hybrid aspen (*Populus tremula* x *tremuloides*) clone under ambient and elevated ozone concentration in the field. *Global change biology* 13: 2538–2550.
- Blande, J.D., Korjus, M., Holopainen, J.K.** 2010. Foliar methyl salicylate emissions indicate prolonged aphid infestation on silver birch and black alder. *Tree Physiology* 30: 404–416.
- Bolwell, G.P. & Daudi, A.** 2009. Reactive oxygen Species in Plant-pathogen interaction In: Río, L. A., Puppo A. Reactive oxygen Species in plant signaling. *Signalling in communication in plant*. Springer-Verlag, Berlin.
- Brausser, G.P., Orlando, J.J., Tyndall, G.S.** 1999. Atmospheric chemistry and global change. Oxford University Press, N.Y.
- Bray, E.A., Bailey-Erres, J., Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan BB, Gruissen W, RL Jones, editors. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, New York.
- Calfapietra, C., Fares, S., Loreto, F.** 2009. Volatile organic compounds from Italian vegetation and their interaction with ozone. *Environmental Pollution* 157: 1478–1486.
- Cardoso-Gustavson P., Bolsoni V.P., Oliveira D.P., Gromboni-Guaratini M.T., Aidar, M.P.M., Marabesi, M.A., E.S., Alves, Souza, S.R.** 2014. Ozone-induced responses in *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae): metabolic cross-talk between volatile organic compounds and calcium oxalate crystal formation. *Plos One* 9: e105072.
- Carter, W.P., Pierce, J.A., Luo, D., Malkina, I.** 2005. Environmental chamber study of maximum incremental reactivities of volatile organic compounds. *Atmospheric Environment*. 29: 2499–2511.

- Cascone, P., Luigi, I., Massimo, E.M., Bossi, S., Arimura, G., Guerrieria, E.** 2015. Tobacco overexpressing γ -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants Pasqual. *Journal of Plant Physiology* 173: 28–32.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., Fan, B.** 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling & Behavior* 4(6): 493-496.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N., Prakash, A.** 2008. Volatile as priming agents that initiate plant growth and defence responses. *Current Science* 94: 595-604.
- Claeys, M., Graham, B., Vas, G., Wang, W., Vermeylen, R., Pashynska V., Cafmeyer J., Guyon P., Andreae M.O., Artaxo P., Maenhaut, W.** 2004. Formation of secondary organic aerosols through photooxidation of isoprene. *Science* 303: 1173–1176.
- Conklin, P.L.** 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment*. 24: 383-394. *Global Change biology* 9: 295-394.
- Cornell, H.V & Hawkins, B.** 2003. Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. *American Naturalist* 161: 507-533.
- Daniel, F., Klessig, D.F, Durner, J.R, Noad, R., Navarre, D.N., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M, Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H.** 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *PNAS* 97: 8849-8855.
- David, R., Carde, J.P.** 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris*. 258: 1338-1340.
- Del-Claro, K., Torezan-Silingardi, H.M.** 2012. *Ecologia das Interações Plantas-Animais: uma abordagem ecológico evolutiva*. Technical Books, Rio de Janeiro.
- Delledone M., Xia Y., Dixon R.A, Lamb C.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 365: 586-588.
- Delledone, M., Zeier, J. Marocco, A., Lamb, C.** 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *PNAS* 23: 13454–13459.
- Dicke, M., Van Loon, J.A.L., Soler, R.** 2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attacks. *Nature Chemical Biology* 5: 317-324.

- Domingos, M., Bulbovas, P., Camargo, C.Z.S, Aguais-Silva, C., Brandão S., Dafré-Martinelli, Dias, A.P.L, Engela, M,R.G.S, Gagliano, J., Moura, B.B., Alves, E.S., Rinaldi, M.C.S., Gomes, E.P.C., Furlan, C.M., Figueiredo, A.G.** 2015. Searching for native tree species and respective potential biomarkers for future assessment of pollution effects on the highly diverse Atlantic Forest in SE-Brazil. *Environmental Pollution* 202: 85-95.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, Orlova, I.** 2006. Plant volatile; recent advance and future perspectives. *Plant Science* 25: 417-440.
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gerhenzon J.** 2004. Biochemistry of plant volatile. *Plant Physiology* 135: 1893-1902.
- Durrant, W.E. & Dong, X.** 2004. Systemic Acquires Resistance. *Annual Review Phytopathology*. 42: 185-209.
- Ederli, L., Morettini, R., Borgoni, A., Wastemack, C., Miersh, O., Reale, L.** 2006. Interaction between Nitric oxide and Ethylene in the induction of alternative oxidase in Ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiology* 142: 595-608.
- Erb, M., Veyrat, N., Robert, C.A.M, Xu, H., Frey, M., Ton, J., Turling ,T.C.J.** 2015. Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nature communications* 6273: 1-10.
- Fares, S., Loreto, F., Kleist, E., Wildt, J.** 2008. Stomatal uptake and stomatal deposition of ozone in isoprene and monoterpene emitting plants. *Plant Biology* 44-54.
- Frederick, M. Q.S., Fuentes, J.D., Roulston, T., Kathilankal, J.C., Lerda, M.** 2009. Effects of air pollution on biogenic volatiles and ecological interactions. *Oecologia* 160: 411-420.
- Frost, C.J., Appel, M.H., Carlson, J.E., Moraes, C.M, Mescher, M.C., Shultz, J.C.** 2007. Within-plant signaling via volatile overcomes vacular constraints on systemic signaling and prime responses against herbivores. *Ecology Letters* 10: 490-498.
- Frost, C. J., Mescher, M. C., Dervinis, C., Davis, J. M., Carlson, J. E., De Moraes, C.M.** 2008. Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate *New Phytol.* 180: 722-734.
- Gigot, C., Ongena M., Fauconnier, M., Wathelet ,J., Jardin, P.D., Thonart, P.** 2010. The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(3): 451-460

- Gosset, V., Harmel, N., Bel, C., Francis, F., Haubruge, E., Wathelet, E., Jardin, P., Feussner, I., Fauconnier, M.** 2009. Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *Journal of Experimental Botany* 60(4): 1231–1240.
- Gouinguene, S.P. & Turlings, T.** 2002. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology* 129: 1296-1299.
- Grosjean, D., Willamns, E.L., Grosjean, E., Andino, J.M., Seinfeld, J.H.** 1993. Atmospheric Oxidation of Biogenic Hydrocarbons: Reaction of Ozone with Pinene, D-Limonene and trans Caryophyllene. *Environmental Science Technology* 27: 2754-2758.
- Guenther, A., Hewitt, C.N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., Harley, P., Klinger, L., Lerdau, M., MacKay, W.A., Pierce, T., Scholes, B., Steinbrecher, R., Tallaraju, R., Taylor, J., Zimmerman, P.** 1995. A global model of nature volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysical Research* 100: 8873-8892.
- Gupta, J.K, Fernie, A.R., Kaiser, W.M, Van Dongen, J.T.** 2011. On the origins of nitric oxide. *Trend in Plant science* 3: 160-168.
- Halliwell, B. & Guteridge, J.M.C.** 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hartikainen, K., Nerg, A.M., Kivimaenpaa, M., Kontunensoppela, S., Maenpaa, M., Oksanen, E., Rousi, M., Holopainen, T.** (2009). Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristic of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature. *Tree Physiol.* 29: 1163–1173.
- Hassan, M.N., Zainal, Z., Ismail, I.** 2015. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal* 13: 727–739.
- Hayat, S., Mori, M., Pichtel, J., Ahmad, A.** 2010. *Nitric Oxide in Plant Physiology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Alemanha.
- Heiden, A.C., Kobel, K., Langebartels, C., Schuh-Thomas, G., Wildt, J.** 2003. Emissions of oxygenated volatile organic compounds from plants Part I: Emissions from lipoxygenase activity. *J. Atmos. Chem.* 45:143–172.
- Heil, M. & Ton, J.** 2008. Long-distance signalling in plant Defence .*Trends in Plant Science* 13: 264-272.

- Heil, M. & Bueno, J.C.S.** 2007. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 5467-5472.
- Hoffmann, T., Odum, J.R., Bowman, F., Collins, D., Klockow, D., Flagan, R.C., Seihfeld, J.H.** 1997. Formation of organic aerosols from the oxidation of biogenic hydrocarbons. *Journal Atmospheric Chemistry* 26(2): 189-222.
- Holopainen, J.K & Gerhenson, J.** 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science* 15: 1360- 1385.
- Holopainen, J.K.** 2004. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science* 11: 529-533.
- Huang, J, Zhibing, M.G, Baofang, F., Shi, K., Zhou, Y., Yu, J., Chen, Z.** 2010. Functional Analysis of the Arabidopsis PAL Gene Family in Plant Growth, Development, and Response to Environmental Stress. *Plant Physiology* 153: 1526–1538.
- Joutsensaari, J., Loivamaki, M., Vuorinen, T., Miettinen, P., Nerg, A., Holopainen, J. K., Laaksonen, A.** 2005. Nanoparticle formation by ozonolysis of inducible plant volatile. *Atmospheric Chemistry and Physics* 5: 1-16.
- Kegge, W. & Pierik, R.** 2009. Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends in Plant Science* 15: 126-132.
- Kocsy, G., Galiba, G., Brunold, C.** 2001. Role of glutathione in adaptation and signaling during chilling cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* 113(2): 158-164.
- Laothawornkitkul, J., Taylor, J.E., Paul, N.D., Hewitt, N.C.** 2009. Biogenic volatile organic compounds in the Earth system. *New Phytologist*. 183: 27–51.
- Leaitch, W.R., Bottenheim, J.W., Biesenthal, T.A., Li, S.M., Liu, P.S.K., Asalian, K., Dryfhout-Clark, H., Hopper, F., Brechtel, F.** 1999. A case study of gas-to-particle conversion in an eastern Canadian forest. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* 104: 8095–8111.
- Lelieveld, J., Butler, T.M., Crowley, J.N., Dillon, T.J., Fischer, H., Ganzeveld, L., Harder, H., Lawrence, M.G., Martinez, M., Taraborrelli, D., Williams, J.** 2008. Atmospheric oxidation capacity sustained by a tropical forest. *Nature* 452: 737-740.
- Llusà, J., Peñuelas, J., Gimeno, B.S.** 2002. Seasonal and species-specific response of VOC emissions by Mediterranean woody plant to elevated ozone concentrations. *Atmospheric Environmental* 36: 3931–3938.

- Llusia, J., Penuelas, J., Munne-Bosch, S.** 2005. Sustained accumulation of methyl salicylate alters antioxidant protection and reduces tolerance of holm oak to heat stress. *Physiologia Plantarum* 124: 353–361.
- Lorenzi, H.** 1992. *Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Plantarum, Nova Odessa.
- Loreto, F. & Schnitzler, J. P.** 2010. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in plant science* 15(3): 154-166.
- Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F., Pasqualini, S.** 2001. Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology* 126(3): 993-1000.
- Luis Sampedro, L., Moreira, X., Llusia, J., Penuelas, J., Zas, R.** 2010. Genetics, phosphorus availability, and herbivore-derived induction as sources of phenotypic variation of leaf volatile terpenes in a pine species. *Journal of Experimental Botany* 61(15): 4437–4447.
- Maffei, M.E., Fer, A.M., Boland, W.** 2007. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry* 68: 2946–2959.
- Maffei, M.E., Gertsch, J., Giovanni, A.** 2011. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Natutal. Products Reports* 28: 1359–1380.
- Matsui, K.** 2006. Green leaf volatiles: Hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 274–280 .
- McCleverty, J.A.** 2004. Chemistry of nitric oxide relevant to biology. *Chemical Reviews* 104: 403-418.
- Montanari, R. M.** 2010. *Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de anacardiácea, spirunaceae e verbenácea*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- Moraes, C.M., Mescher, M.C., Tumlinson, J.H.** 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410: 577-580.
- Moura, B.B.** 2013. *Análises estruturais e ultraestruturas em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos*. Tese de doutorado, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Wilson, I.** 2008. Nitric oxide evolution and perception. *Journal Experimental Botany* 59(1): 25-35.

- Neilli, S., Desikan, R., Clarke, A., Hust, R., Hancock, J.T.** 2001. Hydrogen peroxide and nitric oxide is signaling molecules in plants. *Journal of experiment Botany* 53: 1237-1247.
- Niinemet, U. & Monson, R.K.** 2013. *Biology, Controls and Models of Tree Volatile Organic Compound Emissions*. Springer, New York.
- Niinemets, U., Kannaste, A., Copolovici, L.** 2013. Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in plant science*. 4: 180-186.
- Niinemets, U., Loreto, F., Reischsten, M.** 2004. Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trens in Plant Science* 9: 180-186.
- Niinemets, Ü.** 2010. Mild versus severe stress and BVOCs: Thresholds, priming and consequences. *Trends Plant Sci.* 15: 145–153.
- Ozawa, R., Arimura, G., Takabayashi, J., Shimoda, T., Nishioka, T.** 2000. Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant Cell Physiol.* 4: 391-398.
- Ozawa, R., Shiojiri, K., Matsui, K., Takabayashi, J.** 2013. Intermittent exposure to traces of green leaf volatiles triggers the production of (Z)-3-hexen-1-acetate and (Z)-3-hexen-1-ol in exposed plants. *Plant Signaling & Behavior* 8(11): e27013.
- Pedroso, M.C., Magalhães, J.R., Durzan, D.** 2000. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *Journal Experimental Botany* 51(347): 1027-1036.
- Pellegrini, E., Cioni, L.P., Francini, A., Lorenzini, G., Nali, C., Flamini, G.** 2012. Volatiles Emission Patterns in Poplar Clones Varying in Response to Ozone. *Journal of Chemical Ecology* 38: 924–932.
- Peñuelas, J., Llusià, J., Filella, I.** 2007. Methyl salicylate fumigation increases monoterpene emission rates. *Biologia Plantarum* 51(2): 372-376.
- Pinheiros, D.O., Pedrosa, G., Souza, S.R.** The effect of herbivory on constitutive and incuded defenses ina pionner tree (*Croton floribundus* Spreng). XI Congresso de Ecologia Química, Belo Horizonte, Brasil, livro de resumos pag. 123.
- Pinto, D.M., Blande, J., Souza, S.R., Nerg, A., Holopainen, J.K.** 2010. Plant volatile organic compound (VOCs) in ozone polluted atmospheres: The ecological Effects. *Journal Chemical Ecology* 36: 22-24.

- Pinto, D.M., Nerg, A.M., Holopainen, J.K.** 2007a. The role of ozone-reactive compounds, terpenes, and green leaf volatiles (GLVs), in the orientation of *Cotesia plutellae*. *Journal Chemical Ecology* 33: 2218-2228.
- Pinto, D.M., Blande, J.D., Nykanen, R., Dong, W.X., Nerg, A.M., Holopainen, J.K.** 2007b. Ozone degrades common herbivore-induced plant volatile: does this affect herbivore prey location by predators and parasitoids? *Journal Chemical Ecology* 33: 683-694.
- Pinto, M.C. & Tommasi, Gara, L.** 2002. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in Tobacco Bright-Yellow 2 cell. *Plant Physiology* 130: 698-708.
- Pinto-Zevallos, D.M., Martins, C.B.C., Pellerino, A.C., Zarbin, P.H.G.** 2013. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Química Nova* 36(9): 1395-1405.
- Rayn, C.A.** 2001. Night moves of pregnant moths. *Nature* 410: 530-531.
- Rondon-Neto, R.M., Botelho, S.A., Fontes, M.A.L., Davide, A.C., Faria, J.M.R.** 2000. Estrutura e composição florística da comunidade arbustivo-arbórea de uma clareira de origem antrópica, em uma floresta estacional semidecídua montana, Lavras-MG, Brasil. *Cerne* 6(2): 79-94.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martínez-Romero, Guillén, F., Serrano, M., Valero, D.** 2011. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chemistry* 124: 964–970.
- Shiojiri, K., & Karban, R.** 2006. Plant age, communication, and resistance to herbivores: young sagebrush plants are better emitters and receivers. *Oecologia* 149: 214-220.
- Shiojiri, K., Takabayashi, J., Yano, S., Takafuji, A.** 2000. Flight response of parasitoids toward plant-herbivore complexes: A comparative study of two parasitoid-herbivore systems on cabbage plants. *Appl. Entomol. Zool.* 2000: 35, 87.
- Smid, H. M., Van Loon, J.J., Posthumus, M.A., Vet, L.E.M.** 2002. Analysis of volatiles from Brussels sprouts plants damaged by two species of *Pieris* caterpillars: olfactory receptive range of a specialist and a generalist parasitoid wasp species. *Chemoecology* 12: 169-172.

- Souza, S.R. & Pagliuso, J.D.** 2009. Design and assembly of an experimental laboratory for the study of atmosphere-plant interactions in the system of fumigation chambers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 158: 243-249.
- Souza, S.R., Blande, J., Holopainen, K.** 2013. Pre-exposure to nitric oxide modulates the effect of ozone on oxidative defenses and volatile emissions in lima bean. *Environmental Pollution* 157: 1478-1486.
- Van Loon, L.C. & Van Strien, E.A.** 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Vautier, M.N. & Jolivet, Y.** 2015. Ozone sensing and early signaling in plants: An outline from the cloud, *Environmental and Experimental Botany*. 114: 144–152.
- Velikova, V., Pinelli, P., Reale, L., Ferranti, F., Loreto F.** 2005. Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytology* 166: 419-426.
- Verhage, A., Van Wess, S.C.M., Pitterse, M.J.** 2010. Plant Immunity: It's Hormones talking, but what do they say? *Plant Physiology* 154: 536-540.
- Vickers, C.E., Gershenzon, J., Lerdau, M.T., Loreto, F.** 2009. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology* 5: 283-291.
- Virtanen, A., Joutsensaari, J., Koop, T., Kannosto, J., Yli-Pirilä, P., Leskinen, J., Mäkelä, J., Holopainen, J.K., Pöschl, P., Kulmala, M., Worsnop, D.P., Laaksonen, A.** 2011. An amorphous solid state of biogenic secondary organic aerosol particles. *Nature* 467: 824-827.
- Vuorinen, T., Nerg, A.M., Holopainen, J.K.** 2004. Ozone exposure triggers the emission of herbivore-induced plant volatiles, but does not disturb tritrophic signaling. *Environmental Pollution*, 131, 305-311. Birch (*Betula pendula* Roth) clones grown under ambient and elevated CO₂ and different O₃ concentration. *Atmospheric Environment*. 39: 1185-1197.
- Wennberg, P.O. & Dabdub, D.** 2008. Rethinking ozone production. *Science* 320: 1624-1625.
- Yu, A., Ying-bai, S., Li-juan, W., Zhi-xiang, X.** 2006. A change of phenolic acids content in poplar leaves induced by methyl salicylate and methyl jasmonate. *Journal of Forestry Research* 17: 107–110.

- Yuan, J.S, Himanen, S.J, Holopainen, J.K, Chen, F., Stewart, C.N.** 2009. Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 323-321.
- Zuccarelli, R.** 2015. Influencia da luz sobre o metabolismo de óxido nítrico em tecidos vegetativos e reprodutivos de tomateiros. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.