

VANESSA PALERMO BOLSONI

**Compostos orgânicos voláteis (COV) emitidos por espécies vegetais da Mata Atlântica sob alto ozônio**

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

SÃO PAULO

2017

VANESSA PALERMO BOLSONI

# **Compostos orgânicos voláteis (COV) emitidos por espécies vegetais da Mata Atlântica sob alto ozônio**

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

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SILVIA RIBEIRO DE SOUZA

Ao universo,

Aos meus familiares e amigos,

Especialmente ao meu avô (*in memoriam*),

Dedico.

“Nesses tempos de céus cinzas e chumbos, nós  
precisamos de árvores desesperadamente verdes.”

**Mário Quintana**

## Agradecimentos

À Deus, ao Universo e à Energia Cósmica que me impulsionou e impulsiona sempre, me mantendo próxima ao equilíbrio, inclusive durante toda a elaboração deste trabalho.

Aos meus familiares Thereza Christina Barone Palermo (mãe), João Bolsoni (pai), Adriana Amado Bolsoni (madrasta), Marlete Bolsoni (avó), Nelson Palermo (avô, *in memoriam*), Wilson Palermo Bolsoni (irmão), Marina Palermo Bolsoni (irmã), tias, tios, primos, primas e animais de estimação, que sempre me apoiaram durante toda a jornada acadêmica, que investiram de forma material e emocional, dedicando atenção e carinho. Ainda, aos meus amigos, especialmente à Fernanda Galluzzi Saraiva, Marina Mastrangelo Franconeti, Lauara Lubachewiski Barquero e Loraine Lubachewiski Barquero, que permanecem ao meu lado por anos, me proporcionando momentos de alegria, apoio e motivação. Agradeço também ao amor, que acima de tudo, recebi destes amigos e familiares.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Ribeiro de Souza, que desde as iniciações científicas desenvolvidas dedicou seu tempo e conhecimento. À confiança depositada e ao investimento no meu crescimento profissional, à continuidade dentro da área acadêmica para que este trabalho de mestrado pudesse ser desenvolvido, por acreditar e impulsionar o meu potencial. Muito obrigada!

Aos meus colegas e amigos de trabalho, especialmente ao grupo do Laboratório de Interação Atmosfera-Planta (LABIAP) por todo o auxílio durante os experimentos, pela troca de experiências e conhecimentos, pelo ótimo convívio e pelos momentos de alegria e leveza que trouxeram motivação. Agradeço à cada um que passou pela equipe e dedicou seu sorriso, bom dia e atividade intelectual à mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (12/11663-8).

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pelo espaço físico e a infraestrutura, além da contribuição das disciplinas para aprendizado e desenvolvimento deste trabalho de mestrado.

Ao Núcleo de Pesquisa em Ecologia, especialmente aos pesquisadores, funcionários e colegas, que sempre estiveram dispostos e compartilharam seus conhecimentos e, ainda, por todo o auxílio material e intelectual fornecido, especialmente pelo bom humor e alegria. Também agradeço especialmente ao Prof. Dr. Gustavo Muniz Dias, da Universidade Federal do ABC (UFABC) por toda a gentileza e auxílio na estatística deste trabalho.

À banca examinadora, tanto do exame de qualificação quanto da defesa que se aproxima por contribuir com suas sugestões, conhecimentos e enriquecer o meu trabalho.

Agradeço imensamente e de coração!

## RESUMO

As plantas emitem uma quantidade significativa de compostos orgânicos voláteis (COV) que apresentam suma importância química e biológica no meio ambiente. A quantidade de COV emitida sob as mudanças climáticas futuras é de grande preocupação por afetar o clima e as interações ecológicas. Além disso, é bem conhecido o papel dos COV como precursores dos processos fotoquímicos ocorridos na atmosfera, sendo eles um dos principais atores na produção de partículas e ozônio na troposfera. Portanto, este estudo visou caracterizar os voláteis produzidos constitutivamente e em decorrência da exposição ao ozônio, por indivíduos jovens de *Croton floribundus* Spreng., *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F Macbr., e *Astronium graveolens* Jacq., a fim de avaliar a ação do ozônio no perfil e na taxa de emissão dos voláteis produzidos por essas espécies vegetais, visando verificar se os voláteis constitutivos e induzidos são reconhecidamente importantes para as interações ecológicas e para os processos fotoquímicos atmosféricos. Mudanças das três espécies vegetais foram adquiridas em viveiro comercial, transplantadas e acomodadas por um mês em casa de vegetação com ar filtrado, situada no Instituto de Botânica de São Paulo-SP. Foram realizados os tratamentos ar filtrado (AF) e ar filtrado enriquecido com uma dose de 80 ppb de ozônio durante 2 (AF+2dO<sub>3</sub>) e 4 (AF+4dO<sub>3</sub>) dias de exposição. Os voláteis amostrados constitutivamente e em decorrência da exposição 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-MS). Foram identificados 25 compostos para as amostras constitutivas e 49 compostos para os induzidos pelo ozônio, incluindo as três espécies vegetais. Os constitutivos foram discriminados em quimiotipos devido à emissão de compostos distintos e marcadores para cada espécie, com predominância do monoterpene β-Mirceno e o sesquiterpene Farnesano para *Astronium graveolens*, o monoterpene β-ocimeno e o sesquiterpene γ-Elemeno, além do volátil de folhas verdes 3-Hexen-1-ol para *Croton floribundus*, e os voláteis de folhas verdes como 3-hexen-1-ol e Hexanal, ainda o Metil salicilato para *Piptadenia gonoacantha*. Quando submetidas à exposição ao ozônio, as espécies vegetais apresentaram respostas diferenciadas. *A. graveolens* e *C. floribundus* responderam de forma significativa aos tratamentos com ozônio, emitindo compostos induzidos pela ação desse poluente, como por exemplo o β-Mirceno, Benzaldeído, Nonanal, γ-Muroleno, Decanal e Geranyl acetona para *A. Graveolens*, e os compostos Benzaldeído, Trans-β-Ionone, Decanal, 3-Hexen-1-ol (Z), Hexanal, Metil salicilato, γ-Elemeno e (-)-β-Bourboneno para *C. floribundus*. Já *P. gonocantha* não apresentou uma resposta de defesa sob a perspectiva dos compostos voláteis. Os principais COV encontrados nas três espécies vegetais em estudo apresentam alta relevância ecológica, além de conferirem potencial indicativo de tolerância destas espécies frente ao estresse de origem abiótica.

Palavras-chave: espécies nativas, compostos orgânicos voláteis, constitutivos, ozônio

## ABSTRACT

The plants emit a significant amount of volatile organic compounds (VOCs) that are very important chemically and biologically in the environment. The amount of VOC emitted under future climate change is of great concern because it affects climate and ecological interactions. In addition, the role of VOC as precursors of the photochemical processes occurring in the atmosphere is well known, being one of the main actors in the production of particles and ozone in the troposphere. Therefore, this study aimed to characterize the volatiles produced constitutively and as a result of the exposure to ozone by young plants of *Croton floribundus* Spreng., *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr., and *Astronium graveolens* Jacq., in order to evaluate the action of ozone in the profile and emission rate of the volatiles produced by these plant species, in order to verify if constitutive and induced volatiles are recognized as important for ecological interactions and for atmospheric photochemical processes. Seedlings of the three plant species were purchased in commercial nursery, transplanted and accommodated for a month in a greenhouse with filtered air, located at the Botany Institute of São Paulo-SP. The treatments were filtered air (AF) and filtered air enriched with a dose of 80 ppb of ozone for 2 (AF + 2dO<sub>3</sub>) and 4 (AF + 4dO<sub>3</sub>) days of exposure. The volatiles sampled constitutively and as a result of exposure to ozone were desorbed in nitrogen gas by thermal desorption system, Perkin Helmer Turbo matrix 650 ATD and automatically analyzed in gas chromatography coupled to the mass spectrometer (CG-MS). It was identified 25 compounds for constitutive samples and 49 compounds for those induced by ozone, including the three plant species. The constitutives were discriminated in chemotypes due to the emission of distinct compounds and markers for each species, with predominance of the monoterpene  $\beta$ -Mircene and the sesquiterpene Farnesane for *Astronium graveolens*, the monoterpene  $\beta$ -ocimene and the sesquiterpene  $\gamma$ -Elemene, in addition to the green leaf volatile 3-Hexen-1-ol for *Croton floribundus*, and green leafy volatiles such as 3-hexen-1-ol and Hexanal, also the methyl salicylate for *Piptadenia gonoacantha*. When submitted to exposure to ozone, plant species presented different responses. *A. graveolens* and *C. floribundus* responded significantly to ozone treatments, emitting compounds induced by the action of this pollutant, such as  $\beta$ -Mircene, Benzaldehyde, Nonanal,  $\gamma$ -Murolene, Decanal and Geranylacetone for *A. graveolens*, and the compounds Benzaldehyde, Trans- $\beta$ -ionone, Decanal, 3-Hexen-1-ol (Z), Hexanal, Methyl salicylate,  $\gamma$ -Elemene and (-) -  $\beta$ -Bourbonene for *C. floribundus*. *P. gonocantha* did not present a defense response from the perspective of volatile compounds. The main VOCs found in the three species of plants studied are highly relevant to the environment, in addition to conferring an indicative potential of tolerance of these species to stress of abiotic origin.

Key words: native species, volatile organic compounds, constitutives, ozone

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACoP: Análise de coordenadas principais

AF: Ar filtrado

AF+2dO<sub>3</sub>: Ar filtrado com 2 dias de exposição ao ozônio

AF+4dO<sub>3</sub>: Ar filtrado com 4 dias de exposição ao ozônio

ANOSIM: Análise de dados de similaridade

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O: Nitrato de cálcio tetrahidratado

Cd: Cádmiio

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CH<sub>4</sub>: Metano

Cm: Centímetro

CO: Monóxido de Carbono

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

CONAM: Conselho Nacional de Meio Ambiente

COV: Compostos orgânicos voláteis

COVB: Compostos orgânicos voláteis biogênicos

COVNM: Compostos orgânicos voláteis não metânicos

Cu: Cobre

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: Sulfato de cobre pentahidratado

DAHP: 3-deoxi-D-arabino heptulose-7-fosfato

DMAPP: Pirofosfato de Dimetilalila

E4P: Eritrose 4-fosfato

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FPP: Pirofosfato de farnesila



GG/PP: Pirofosfato de geranylgeranilo

GPP: Pirofosfato de geranilo

$H_2MoO_4$ : Ácido molibídico

$H_2O_2$ : Peróxido de hidrogênio

$H_3BO_3$ : Ácido Bórico

IBAMA: Instituto Brasileiro de Meio Ambiente

IPP: Pirofosfato de Isopentilalila

KCl: Cloreto de Potássio

$KNO_3$ : Nitrato de Potássio

L: Litro

LOX: Lipoxigenase

M: Molécula inerte

MEP: Metileritritol fosfato

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : Fosfato de Magnésio heptahidratado

mL: mililitro

Mn: Manganês

$MnSO_4 \cdot H_2O$ : Sulfato de manganês monohidratado

MVA: Ácido mevalônico

$NH_4H_2PO_4$ : Fosfato de amônio monobásico

Ni: Níquel

nMDS: Escalonamento multidimensional não-métrico

NO: Monóxido de nitrogênio

NO<sub>x</sub>: Óxidos de nitrogênio

NO<sub>2</sub>: Dióxido de nitrogênio

NPP: Pirofosfato de Nerilo

O•: Oxigênio atomômico

O<sub>2</sub>: Gás oxigênio

O<sub>2</sub>•: Superóxido

O<sub>3</sub>: Ozônio triatômico

OH•: Radical hidroxila

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAN: Nitrato de peroxiacetila

PEFI: Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

PEP: Fosfoenolpiruvato

PERMANOVA: Análise de variância multivariada permutativa

PPBV: Partes por bilhão em volume

RMSP: Região Metropolitana de São Paulo

RO<sub>2</sub>•: Radical peróxi

RSA: Resistência sistêmica adquirida

S: Enxofre

SIMPER: Análise de percentual de similaridade

SOA: Aerossol orgânico secundário

Zn: Zinco

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: Sulfato de Zinco heptahidratado

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Classes químicas de voláteis orgânicos representadas por compostos Monoterpenos (A), Sesquiterpenos (B) e Voláteis de folhas verdes (C).....03
- Figura 2. Esquema das rotas bioquímicas de formação dos compostos voláteis adaptado de Dudareva *et al.* (2013). Abreviações dos precursores: eritrose 4-fosfato (E4P), 3-deoxi-D-arabino heptulose-7-fosfato (DAHP), Fosfoenolpiruvato (PEP), Pirofosfato de Dimetilalila (DMAPP), Pirofosfato de Isopentilalila (IPP), Pirofosfato de geranylgeranilo (GG/PP), Pirofosfato de Nerilo (NPP), Pirofosfato de geranilo (GPP) e Pirofosfato de farnesila (FPP).....06
- Figura 3. Esquema da interação do ozônio com o meio intracelular adaptado de Buchanan *et al.* (2015). Radical hidroxila (HO<sup>-</sup>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).....11
- Figura 4. Indivíduos arbóreos de *Astronium graveolens* (A), *Croton floribundus* (B) e *Piptadenia gonoacantha* (C), espécies vegetais nativas estudadas.....13
- Figura 5. Vista frontal da casa de vegetação (A) com plantas de *Croton floribundus* acomodadas sobre caixas de polietileno pós transplante para aclimação (B).....18
- Figura 6. Vista lateral (A) e frontal (B) das câmaras revestidas com Teflon associadas ao sistema de fumigação do Laboratório de Interação Atmosfera-Planta no Instituto de Botânica de São Paulo.....20
- Figura 7. Gerador de ozônio (A) e monitor fotométrico Ecotech (B) .....21
- Figura 8. Foto ilustrativa da coleta de compostos orgânicos voláteis em lâminas foliares de *C. floribundus*.....21
- Figura 9. Sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (A) e sistema de dessorção térmica (B).....22
- Figura 10. Análise de coordenadas principais (ACoP) realizada para *Astronium graveolens* (1), *Croton floribundus* (2) e *Piptadenia gonoacantha* (3).....23
- Figura 11. Taxa de emissão [ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] dos compostos voláteis constitutivos encontrados para as três espécies vegetais para cada classe química: Monoterpenos (A), Sesquiterpenos (B), Voláteis de folhas verdes e Metil salicilato (C).....29
- Figura 12. Gráfico de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) realizado para *Astronium graveolens* (Δ1), *Croton floribundus* (O2) e *Piptadenia gonoacantha* (□3), em seus respectivos controles de Ar filtrado (AF1, AF2, AF3) e tratamentos de dois dias de exposição ao ozônio (2dO31, 2dO32, 2dO33) e quatro dias de exposição ao ozônio (4dO31, 4dO32, 4dO33).....32
- Figura 13. Taxa de emissão [ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] dos compostos voláteis induzidos pela exposição ao ozônio encontrados para *Astronium graveolens*. Tratamentos Ar filtrado (AF), Ar filtrado +

ozônio com dois dias de exposição (2dO<sub>3</sub>) e Ar filtrado + ozônio com quatro dias de exposição (4dO<sub>3</sub>).....36

Figura 14. Taxa de emissão [ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] dos compostos voláteis induzidos pela exposição ao ozônio encontrados para *Croton floribundus*. Tratamentos Ar filtrado (AF), Ar filtrado + ozônio com dois dias de exposição (2dO<sub>3</sub>) e Ar filtrado + ozônio com quatro dias de exposição (4dO<sub>3</sub>).....38

Figura 15. Taxa de emissão [ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] dos compostos voláteis encontrados para *Piptadenia gonoacantha*. Tratamentos Ar filtrado (AF), Ar filtrado + ozônio com dois dias de exposição (2dO<sub>3</sub>) e Ar filtrado + ozônio com quatro dias de exposição (4dO<sub>3</sub>).....40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Compostos orgânicos voláteis emitidos por espécies vegetais tropicais. Adaptado de Bracho-Nunez *et al.* (2013) .....04
- Tabela 2. Compostos orgânicos voláteis constitutivos emitidos pelas três espécies vegetais, detectados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Valores representam a média [ $\text{ng g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]  $\pm$  erro padrão. (-) Ausência de emissão.....27
- Tabela 3. Análise Simper indicando os compostos que mais contribuem para a similaridade das amostras pertencentes às espécies vegetais.....30
- Tabela 4. Compostos orgânicos voláteis emitidos pelas três espécies vegetais nos tratamentos AF, AF+O<sub>3</sub> (2 dias) AF+O<sub>3</sub> (4 dias), mensurados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Valores representam a média [ $\text{ng g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]  $\pm$  erro padrão. (-) Ausência de emissão.....33
- Tabela 5. Análise Simper indicando os compostos que mais contribuem para a similaridade entre as amostras AF, AF+2dO<sub>3</sub>, AF+4dO<sub>3</sub> para *Astronium graveolens* e *Croton floribundus*. *Piptadenia gonoacantha* não apresentou diferença estatística entre os tratamentos.....42

## SUMÁRIO

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Lista de abreviaturas.....	III
Lista de figuras.....	VI
Lista de tabelas.....	VIII
<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
1.1 Emissões biogênicas de Compostos orgânicos voláteis (COV).....	01
1.2 Funções e biossíntese de voláteis.....	04
1.3 Ozônio troposférico (O <sub>3</sub> ).....	07
1.4 Ozônio e a vegetação.....	10
1.5 Espécies vegetais estudadas.....	12
1.6 Objetivos.....	17
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>18</b>
2.1 Cultivo e material vegetal .....	18
2.2 Exposição ao ozônio (O <sub>3</sub> ).....	19
2.3 Coleta dos compostos orgânicos voláteis (COV).....	21
2.4 Análise em cromatografia gasosa (CG-EM).....	22
2.5 Identificação e quantificação dos compostos .....	22
2.6 Tratamento de dados.....	23
2.7 Análise estatística .....	23
<b>3. Resultados .....</b>	<b>25</b>
3.1 Voláteis constitutivos.....	25
3.2 Voláteis induzidos pela exposição ao ozônio.....	31
<b>4. Discussão .....</b>	<b>45</b>
4.1 Voláteis constitutivos .....	45
4.2 Voláteis induzidos pela exposição ao ozônio.....	49
<b>5. Considerações finais.....</b>	<b>54</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>56</b>

# 1. INTRODUÇÃO

---

## *1.1. Emissões biogênicas de compostos orgânicos voláteis (COV)*

As plantas são organismos sésseis e para compensar sua imobilidade desenvolveram diversos mecanismos de interação com o meio ambiente, dentre os quais, a liberação de compostos orgânicos voláteis (COV) para o solo e a atmosfera a partir de raízes, frutos, flores e folhas, sendo esta última a fonte predominante de emissão para a atmosfera (Dudareva *et al.* 2006, Laothawornkitkul *et al.* 2009). Uma quantidade considerável de carbono fixado pelas plantas é emitida de volta para a atmosfera sob a forma desses COV, e estima-se que 1.150 Tg de carbono por ano (aproximadamente 90% do total de emissões de COV) são liberados pela vegetação mundialmente (Guenther *et al.* 1995). Tais emissões pela vegetação têm papel fundamental na química da atmosfera e ultrapassam, em ordem de grandeza, as de origem antropogênica, em escala regional e global (Guenther *et al.* 1997, Souza *et al.* 2002).

Uma dada espécie vegetal é capaz de emitir centenas de COV (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014), incluindo classes químicas de hidrocarbonetos não-metânicos saturados e insaturados e hidrocarbonetos oxigenados, tais como ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e álcoois (Baldwin *et al.* 2006). Até recentemente, os COV eram considerados produtos do metabolismo secundário que não tinham nenhuma função ecológica evidente (Bennett & Wallsgrove 1994, Close & McArthur 2002, Dudareva *et al.* 2006). Contudo, as novas descobertas sobre as múltiplas funções desses voláteis têm realçado a importância química e biológica desses compostos no meio ambiente (Holopainen & Gershenzon 2010). Esses compostos têm um papel sinalizador nas interações tróficas, podendo agir como repelentes de pragas e atraentes de inimigos naturais (Blande *et al.* 2007, Arimura *et al.* 2009, Holopainen & Gershenzon 2010). Os COV também estão relacionados com as defesas químicas das plantas e

estão envolvidos na comunicação planta-planta mediadas por essas defesas (Yu *et al.* 2006, Frost *et al.* 2007, Choudhary *et al.* 2008).

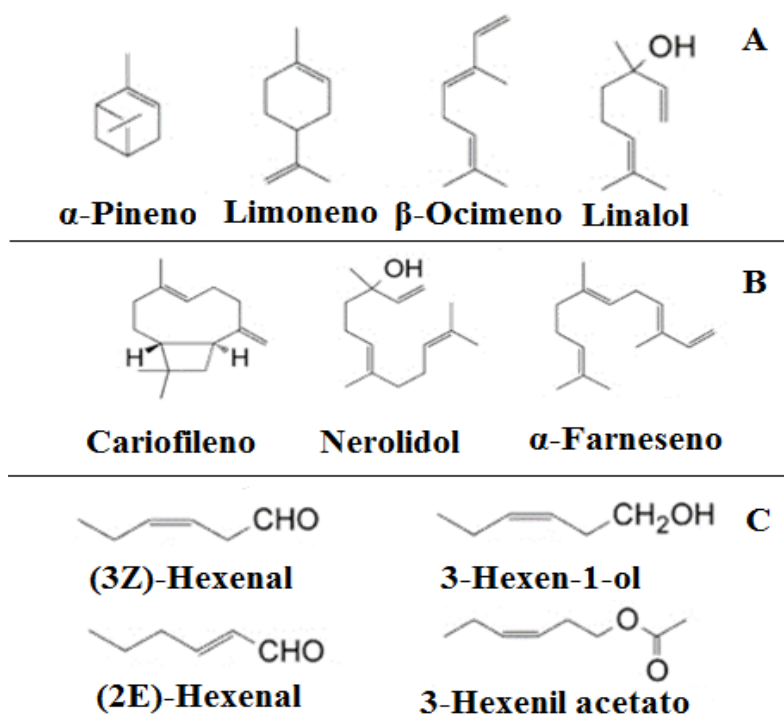
Pesquisas apontam que há aproximadamente 1.700 substâncias que são emitidas constitutivamente por organismos vegetais. Emissões estas que podem estar presentes durante todo o ciclo da planta (Loreto & Schnitzler 2010) e serem influenciadas por fatores ambientais como temperatura, umidade, radiação solar, concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sazonalidade e poluição atmosférica (Schirmer & Quadros 2010). Além destes, fatores biológicos como a espécie vegetal, densidade e área específica das folhas, bem como o metabolismo da planta também podem atuar na produção desses compostos (Schirmer & Quadros 2010).

Acredita-se que a composição química das misturas emitidas, bem como sua intensidade, está diretamente relacionada ao estado fisiológico da planta e aos tipos de estresse a que está sujeita (Pichersky & Gershenzon 2002). Por definição, os COV são compostos que apresentam elevada pressão de vapor e baixo peso molecular (Schirmer & Quadros 2010).

Estudos realizados com plantas de zonas temperadas estimam que a emissão de isopreno representa aproximadamente 40% das emissões totais de hidrocarbonetos biogênicos a partir da vegetação (Padhy & Varshney 2005). Já as pesquisas com COV no Brasil, iniciaram-se na vegetação da Amazônia, em que evidenciaram a suma importância de tais emissões na composição química da atmosfera (Kesselmeier *et al.* 2009).

Existe uma ampla gama de compostos orgânicos voláteis (COV) de plantas estudadas, como os alcenos, alcanos, ácidos carboxílicos e álcoois. No entanto, os terpenóides, especialmente monoterpenos (Figura 1A) e sesquiterpenos (Figura 1B), e os voláteis de folhas verdes (Figura 1C) são as classes predominantes e comuns de compostos conhecidos (Holopainen 2004, Fontana *et al.* 2011).





**Figura 1.** Classes químicas de voláteis orgânicos representadas por compostos Monoterpenos (A), Sesquiterpenos (B) e Voláteis de folhas verdes (C).

As Florestas Tropicais são importantes contribuintes para a emissão desses COV devido às suas condições de temperatura e radiação solar favoráveis às emissões desses compostos, dos quais hemiterpenos e monoterpenos, subclasses dos terpenóides, são as mais emitidas pela vegetação (Schirmer & Quadros 2010). Segundo Bracho-Nunez e colaboradores (2013), espécies tropicais, representantes das famílias Euphorbiaceae como *Hevea brasiliensis*, *Hevea guianensis*, *Hevea spruceana*, e *Hura crepitans*, e da família Fabaceae como *Vatairea guianensis* e *Zygia juruana* (Tabela 1), apresentaram emissão de monoterpenos, isopreno e metanol. As emissões biogênicas mais representativas, para os compostos monoterpenos, foram  $\alpha$ -Pineno, Limoneno, Sabineno, p-cimeno e  $\gamma$ -Terpinene para as espécies de Euphorbiaceae.

**Tabela 1.** Compostos orgânicos voláteis emitidos por espécies vegetais tropicais. Adaptado de Bracho-Nunez *et al.* (2013).

<b>Composto emitido</b>	<b>Espécie vegetal</b>	<b>Família</b>
Isopreno	<i>Garcinia macrophylla</i> (Mart.) Planch. & Triana	Clusiaceae
	<i>Pachira insignis</i> (Sw.) Sw. ex Savigny	Malvaceae
	<i>Vatairea guianensis</i> Aubl.	Fabaceae
	<i>Zygia juruana</i> (Harms) L. Rico	Fabaceae
<hr/>		
Monoterpenos	<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex. A.Juss.) Mull.Arg.	Euphorbiaceae
	<i>Hevea guianensis</i> Aubl.	Euphorbiaceae
	<i>Hevea spruceana</i>	Euphorbiaceae
	<i>Scleronema micranthum</i> Ducke	Malvaceae
<hr/>		
Metanol	<i>Garcinia macrophylla</i> (Mart.) Planch. & Triana	Clusiaceae
	<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex. A.Juss.) Mull.Arg.	Euphorbiaceae
	<i>Hura crepitans</i> L.	Euphorbiaceae
	<i>Pachira insignis</i> (Sw.) Sw. ex Savigny	Malvaceae
	<i>Pseudobombax munguba</i> (Mart. & Zucc.) Dugand	Malvaceae
	<i>Scleronema micranthum</i> Ducke	Malvaceae
	<i>Vatairea guianensis</i> Aubl.	Fabaceae

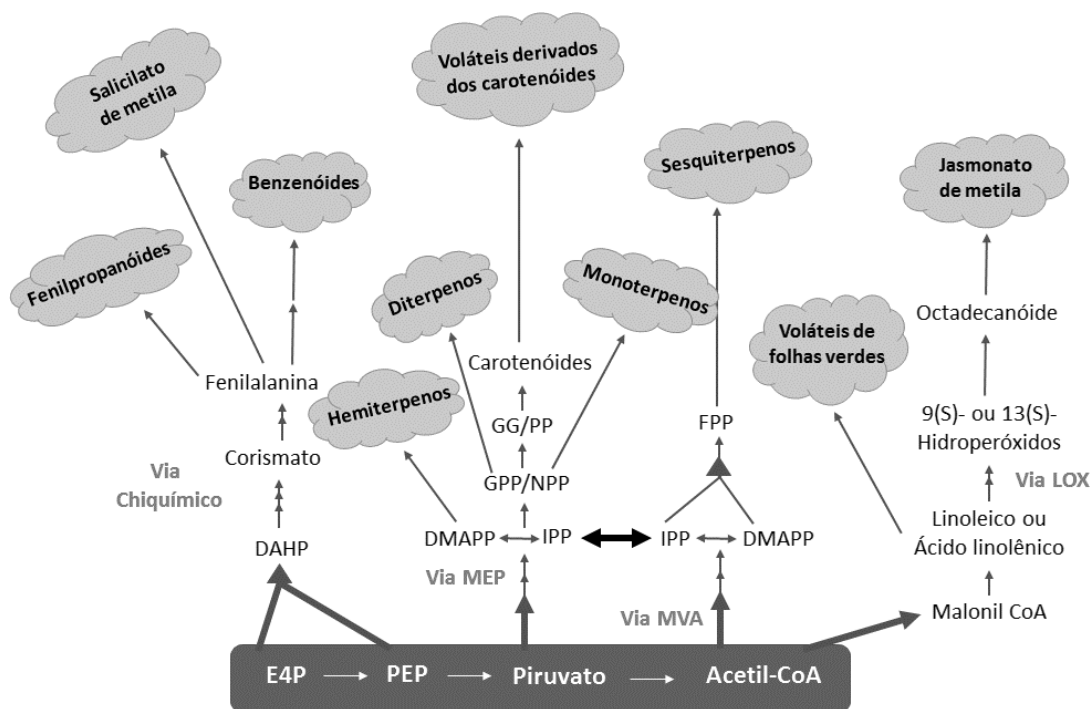
### 1.2. Funções e biossíntese de voláteis

As trajetórias das emissões dos COV são diversas, passando pelos locais de produção nas células foliares até estruturas específicas de armazenamento (Arimura *et al.* 2009), e são classificadas como constitutivas e induzidas. Os voláteis constitutivos não são dependentes de fatores externos para serem produzidos e podem estar presentes em diversos compartimentos celulares das plantas (Schirmer & Quadros 2010). No entanto, os voláteis induzidos são

desencadeados em resposta à estímulos externos como fatores bióticos e/ou abióticos, que funcionam como eliciadores de tais emissões (Grote *et al.* 2013).

As emissões apresentam múltiplas funções como defesa contra herbívoros e patógenos, e papel de sinalização na comunicação planta-planta. Além disso, são também constituintes das essências florais, portanto, estão relacionadas ao processo de polinização como atrativos de polinizadores e dispersores de sementes (Kesselmeier & Staudt 1999, Dudareva *et al.* 2013). Em algumas espécies vegetais, os COV emitidos podem atuar também como seladores de ferida. As substâncias que compõem os óleos essenciais também são consideradas orgânicas voláteis, apesar de apresentarem ponto de ebulição relativamente alto (acima de 200°C) (Maffei *et al.* 2011).

Esses voláteis são formados através de fotoassimilados do metabolismo primário que vão se complexando e originam quatro rotas bioquímicas distintas (Figura 2). São divididos conforme a natureza química das moléculas, provenientes das vias bioquímicas do chiquimato (ácido chiquímico), do Metileritritol fosfato (MEP), ácido mevalônico (MVA) e da lipoxigenase (LOX), que estão envolvidas na produção de inúmeras substâncias químicas (Maffei *et al.* 2011). Sinteticamente, a via MEP é responsável pela produção de hemiterpenos, diterpenos, monoterpenos e voláteis derivados dos carotenóides, enquanto a MVA leva a formação de compostos sesquiterpenos. A via do chiquimato produz os fenilpropanóides, benzenóides e metil salicilato, já a via LOX atua na produção de voláteis de folhas verdes e jasmonato de metila (Dudareva *et al.* 2013).



**Figura 2.** Esquema das rotas bioquímicas de formação dos compostos voláteis adaptado de Dudareva *et al.* (2013). Abreviações dos precursores: eritrose 4-fosfato (E4P), 3-deoxi-D-arabino heptulose-7-fosfato (DAHP), Fosfoenolpiruvato (PEP), Pirofosfato de Dimetilalila (DMAPP), Pirofosfato de Isopentilalila (IPP), Pirofosfato de geranylgeranilo (GG/PP), Pirofosfato de Nerilo (NPP), Pirofosfato de geranilo (GPP) e Pirofosfato de farnesila (FPP).

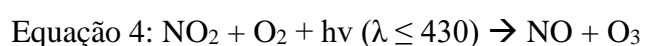
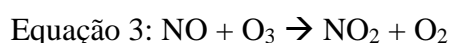
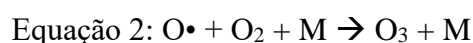
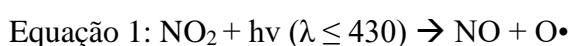
Sabe-se que as vias MVA e MEP não são dependentes, sendo a formação de sesquiterpenos provenientes da via MVA ocorrente no citosol e a formação plastidial de monoterpenos provenientes da via MEP. No entanto, estudos evidenciam um *cross-talk* entre ambas as vias, as quais podem utilizar os mesmos precursores, Pirofosfato de Dimetilalila (DMAPP) e Pirofosfato de Isopentilalila (IPP) para formação dos isoprenóides nos dois compartimentos celulares (Bick & Lange 2003). Em condições de estresse, a via MVA pode ser inibida e é a MEP que contribui de forma significativa para a biossíntese de compostos sesquiterpenos, tendo em vista que ambas utilizam os mesmos precursores (Bartram *et al.* 2006).

### 1.3. Ozônio troposférico (O<sub>3</sub>)

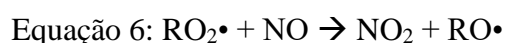
O ozônio (O<sub>3</sub>) é um gás composto por três átomos de oxigênio e apresenta um elevado potencial de oxidação quando comparado a outros agentes oxidantes. Essa composição triatômica confere alta instabilidade à sua molécula e, portanto, lhe atribui um caráter de alta reatividade (Kunz *et al.* 1999). Ele pode ser encontrado tanto na troposfera quanto na estratosfera (Krupa & Manning 1988), e ainda, na troposfera, é considerado como um dos poluentes mais importantes da atualidade (Silveira 2007, Wennberg & Dabdub 2008). Na estratosfera, o ozônio protege a biosfera através da absorção da radiação ultravioleta (Krupa & Manning 1988, Oliveira 2014). Na troposfera, camada atmosférica em que os seres vivos habitam, a principal fonte deste poluente é a interação entre seus gases precursores óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) e compostos orgânicos voláteis (COV) (Lima 2007, Alvim *et al.* 2011).

Os COV oriundos da vegetação são altamente reativos e estão envolvidos na química da troposfera, podendo afetar o balanço regional e global de metano (CH<sub>4</sub>), monóxido de carbono (CO), além de contribuir para o aumento da taxa de acidez atmosférica. Assim, os voláteis biogênicos estão diretamente relacionados às mudanças climáticas globais, pois de certa forma alteram o balanço global de carbono atmosférico (Fehsenfeld *et al.* 1992). Além disto, também estão associados à formação de poluentes secundários, como o ozônio, nitrato de peroxiacetila (PAN) e aerossóis secundários orgânicos, por serem seus precursores. Os voláteis apresentam distintos potenciais de formação de ozônio em função das diferentes reatividades apresentadas pelas características químicas de cada espécie e a concentração em que são encontrados na atmosfera (Alvim *et al.* 2011). Assim, os COV biogênicos potencializam os processos fotoquímicos da atmosfera, formando produtos que retroalimentam as espécies oxidantes, como o ozônio, que inevitavelmente alteram o equilíbrio de CH<sub>4</sub> e CO na atmosfera, levando a danos ambientais em dimensões ainda não mensuráveis (Guenther *et al.* 1995, Fehsenfeld *et al.* 1992).

A formação do ozônio pode ser descrita em atmosfera isenta de COV ou com a participação desses compostos. Para ambientes em que a concentração de voláteis orgânicos e outros compostos é baixa, a sua formação é iniciada pela decomposição do dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) que, por intermédio da luz solar, dá origem ao monóxido de nitrogênio (NO) e o oxigênio atômico (O•) (equação 1). Essa molécula de oxigênio atômico reage com a molécula de gás oxigênio (O<sub>2</sub>), presente naturalmente na atmosfera, e associada a uma outra molécula inerte (M), com função de absorção de energia, forma o ozônio (equação 2). O monóxido de nitrogênio proveniente da equação 1 reage com o ozônio formado na equação 2 e regenera o NO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (equação 3). Estas reações estão em equilíbrio fotoestacionário, uma vez que o NO pode atuar no consumo de O<sub>3</sub> e dar origem ao NO<sub>2</sub> e oxigênio atômico (equação 4). Dessa forma, o O<sub>3</sub> produzido é consumido, não ocorrendo seu acúmulo (De Assis 2014, Cassimiro 2015). Essa é uma situação em que a atmosfera é considerada limpa.



Já em locais com presença significativa de COV oriundos de fontes antrópicas e/ou biogênicas, estes, em associação a radiação solar, podem reagir com radicais hidroxila (OH•), encontrados na atmosfera, e originar o radical peróxi (RO<sub>2</sub>•) (equação 5). Este radical tem a propriedade de oxidar o NO a NO<sub>2</sub> (equação 6), desfavorecendo o consumo de O<sub>3</sub> (equação 3) e, desta forma, propicia o seu acúmulo na atmosfera (Cassimiro 2015, Fernandes 2015).



Em regiões urbanas, em que a concentração de ozônio chega a alcançar valores pontuais de 200 ppb, como na cidade de São Paulo, a contribuição dos COV antropogênicos é extremamente alta. Por apresentar fragmentos de áreas verdes em seu entorno, a contribuição dos COV biogênicos na formação de ozônio e de outros oxidantes troposféricos pode ser significativa. Ressalta-se que os COV na presença de óxidos de nitrogênio e radiação solar, atuam na formação do *smog* fotoquímico, que por meio de uma cadeia complexa de reações produz ozônio, nitrato de peroxiacetila (PAN), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), aldeídos, cetonas, entre outros (Krupa & Manning 1998). Ainda, os voláteis podem sofrer fotólise e reagir com o próprio O<sub>3</sub> e radicais (OH e NO<sub>3</sub>), reduzindo suas concentrações na atmosfera (Seinfeld & Pandis 2006). Portanto, as concentrações atmosféricas de ozônio e outros poluentes do ar são sensíveis a fluxos superficiais de COV, que ora podem levar ao acúmulo de oxidantes e ora sua redução (Ciccioli 1993).

Em relação ao ozônio troposférico e visando garantir a proteção da saúde e o bem-estar das pessoas, foram estabelecidos padrões de qualidade que definem legalmente as concentrações máximas de um componente atmosférico. No Brasil, os padrões de qualidade do ar estaduais foram estabelecidos no ano de 1976, via Decreto Estadual nº 8468/76, enquanto os padrões nacionais foram estabelecidos pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) e aprovados pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução CONAMA nº 03/90 (Schirmer 2004, Cetesb 2015).

A partir de 2008, no estado de São Paulo, esses padrões foram revisados com base nas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS), o que culminou na publicação do Decreto Estadual nº 59113 de 23/04/2013. Neste, foram estabelecidos novos padrões de qualidade do ar por meio de metas gradativas e sucessivas que visassem a redução dos poluentes atmosféricos em níveis decrescentes até atingir valores desejáveis ao longo do tempo (Cetesb 2015).

Parques urbanos e áreas de conservação presentes na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), como o Parque do Ibirapuera e o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), apresentam alta concentração de ozônio. Este, pode afetar a vegetação causando danos ao ecossistema terrestre. O ozônio troposférico, que é o poluente em foco neste trabalho, ultrapassa com frequência o nível estadual de 70 ppb ( $140 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) numa média de 8h e nacional de 80 ppb ( $160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) numa média horária, estabelecidos pelo padrão de qualidade do ar. Sendo assim, é atualmente considerado um dos poluentes que apresenta situação mais desfavorável no quesito ultrapassagens. Este grande problema da poluição na RMSP está diretamente associado à elevada atividade veicular que, de acordo com a Cetesb, as emissões provindas dessa fonte são responsáveis por mais de 90% das emissões gasosas de CO, NO<sub>x</sub> e COV (Martins 2006, Cetesb 2012, Cetesb 2015).

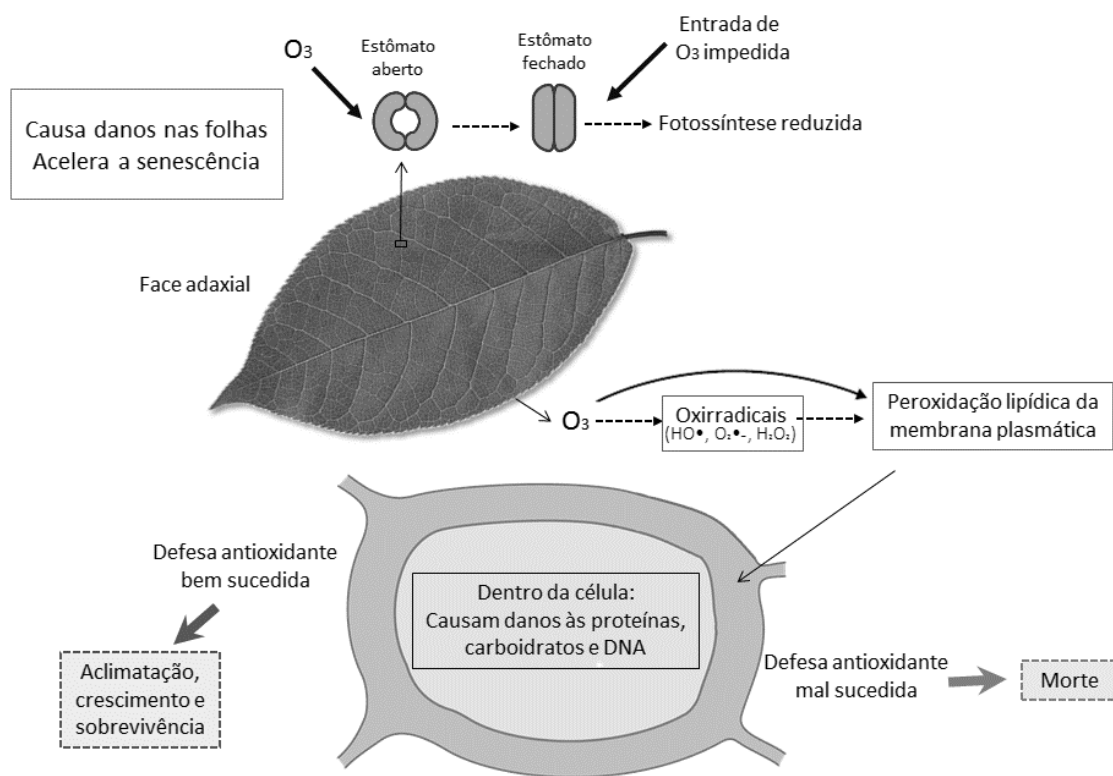
#### ***1.4. Ozônio e a vegetação***

Além de causar danos à saúde humana, o ozônio pode ser altamente prejudicial à vegetação. Os danos atribuídos ao sistema biológico dos organismos vegetais dependem da quantidade absorvida deste poluente pelo indivíduo, que enfrenta uma série de resistências ao passar pelos compartimentos e estruturas vegetais, e está sujeito à modificações provenientes da interação com os componentes celulares (Roshchina & Roshchina 2013).

O ozônio é considerado um excelente modelo de agente promotor de estresse na vegetação por apresentar exposições em condições bem definidas, pela permissividade de experimentos controlados serem realizados diversas vezes assemelhando às mesmas condições, e pela ampla e variada faixa de O<sub>3</sub>, o que permite a obtenção de respostas distintas quando as plantas são submetidas à diferentes níveis de concentração desse poluente. Esse agente também induz a emissão de compostos orgânicos voláteis como mecanismo de defesa por parte da vegetação e tem sido utilizado como teste para a morte celular programada (Pellegrini *et al.* 2012).



As principais resistências encontradas por este poluente são a superfície foliar, que pode apresentar tricomas, dificultando assim sua penetração, e a camada limítrofe encontrada no limbo. Os estômatos, bem como a cutícula, também podem ser uma via de resistência para o acesso desse poluente ao apoplasto (Fernandes 2015). Uma vez que penetra via estômatos (Figura 3), localizados nas folhas (Ashmore 2005), pode reagir dentro da célula, formando assim os oxirradicais como o radical hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2\bullet$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Roshchina & Roshchina 2013), desencadeando alterações nos processos celulares, no metabolismo e na fisiologia das espécies vegetais, principalmente causando danos na membrana dos tilacóides, presentes nos cloroplastos (Pinto *et al.* 2010, Tonial 2011).



**Figura 3.** Esquema da interação do ozônio com o meio intracelular adaptado de Buchanan *et al.* (2015). Radical hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Como mecanismo de defesa e a fim de mitigar os danos advindos do ozônio, a planta pode fechar os estômatos, impedindo a entrada do poluente. No entanto, este ato pode

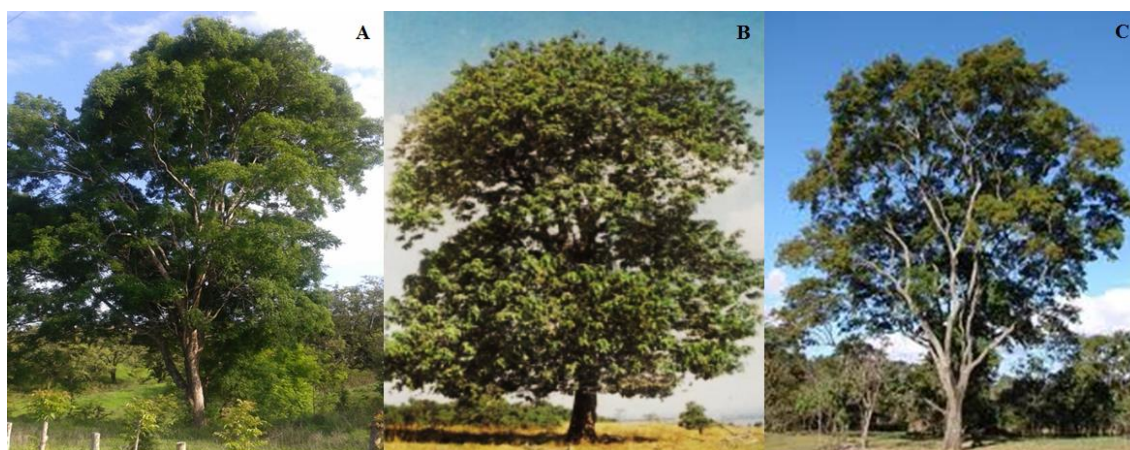
desencadear uma redução na taxa fotossintética, tendo em vista a permanência dos estômatos fechados. Ainda, além de reduzir a fotossíntese, o ozônio pode promover danos foliares, como as injúrias e o processo acelerado de senescência. Esses oxirradicais formados causam danos à membrana, alterando o transporte de íons e aumentando sua permeabilidade. Proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos também são alvos da ação dessas espécies reativas de oxigênio (ERO) (Buchanan *et al.* 2015). A exposição ao ozônio também aciona os mecanismos de defesa antioxidante dentro da célula, que se bem sucedidos promovem sua aclimatação, sobrevivência e crescimento, e se mal sucedidos ocasionam a sua morte. Todas essas respostas podem variar nos vegetais de acordo com a duração e o nível de exposição ao ozônio (Roshchina & Roshchina 2013, Buchanan *et al.* 2015, Choudhury *et al.* 2016).

Alguns estudos sobre a ação do ozônio na vegetação se preocupam em avaliar as respostas bioquímicas e morfológicas das plantas sob a óptica da degradação de comunidade e ecossistema vegetal frente ao cenário das mudanças climáticas (Orendovici *et al.* 2003, Lelieveld *et al.* 2008). Apesar de se ter o conhecimento da importância dos voláteis frente às mudanças climáticas, especialmente o seu papel na formação de ozônio e partículas (Claeys *et al.* 2004), a indução desses compostos pelo ozônio é ainda pouco estimada (Niinemets *et al.* 2004).

### ***1.5. Espécies vegetais estudadas***

As famílias Euphorbiaceae, Fabaceae e Anacardiaceae têm ocorrido em fragmentos florestais impactados por altos níveis de ozônio (Moura *et al.* 2014). A família Euphorbiaceae é uma das mais comuns nas formações naturais brasileiras e o gênero *Croton* está presente em quase todos os ecossistemas. Devido às interferências antrópicas, por exemplo pela extração de madeira, grandes clareiras são formadas ocorrendo, conseqüentemente, o surgimento de vegetação secundária que provoca modificação da composição florística (Rondon-Neto *et al.* 2000). De acordo com estudos realizados por Rondon-Neto e colaboradores (2000),

Euphorbiaceae apresentou o maior número de espécies arbustivo-arbóreas regenerando em clareiras e, dentre as espécies, *C. floribundus* (Figura 4B) se destacou apresentando maior valor de importância, regeneração natural total e posição sociológica relativa. Assim como a Euphorbiaceae, representantes da família Fabaceae e Anacardiaceae também são comumente encontrados na maioria dos ecossistemas naturais brasileiros (Souza & Lorenzi 2008). *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr (Figura 4C) e *Astronium graveolens* (Figura 4A) são representantes dessas famílias, ocorrentes no Estado de São Paulo, na floresta semidecídua, e frequentes em regiões de altitude compreendida entre 500-700 metros (Lorenzi 1992).



**Figura 4.** Indivíduos arbóreos de *Astronium graveolens* (A), *Croton floribundus* (B) e *Piptadenia gonoacantha* (C), espécies vegetais nativas estudadas.

Estudos vêm sendo realizados com *Croton floribundus*, e por serem recentes, ainda não foram traçados limites de resposta dessa espécie ao ozônio. Entretanto, os trabalhos evidenciam maior resistência desta espécie quando comparada à outras espécies vegetais nativas que apresentam o mesmo estágio sucessional. *C. floribundus* é uma planta pioneira pertencente à família Euphorbiaceae, denominada popularmente como Capixingui. Esta família tem grande plasticidade ecológica, se estendendo por todo o território nacional (Zirolto 2007), e pode ser encontrada em forma arbórea, arbustiva, de ervas e trepadeiras (Leme 1994). Espécies de *Croton* podem apresentar substâncias de suma importância econômica como óleos essenciais e constituintes ativos, que incluem os terpenóides, flavonóides e alcalóides (Costa *et al.* 2008),

além de serem apropriadas para reflorestamento de áreas degradadas por sua rápida aparição nestes locais (Augusto *et al.* 2003).

*C. floribundus* também apresenta tolerância frente ao estresse oxidativo, com capacidade de acumular elementos tóxicos como Cobre (Cu), Cádmiio (Cd), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Enxofre (S) e Zinco (Zn), que podem ser encontrados naturalmente no meio em que vivem (Domingos *et al.* 2015). Estudos realizados por Cardoso-Gustavson e colaboradores (2014), evidenciaram que o ozônio é capaz de induzir respostas anatômicas, fisiológicas e histológicas nessa espécie em questão, como a produção de compostos terpenóides que eleva com a exposição ao poluente e podem atuar na redução de espécies reativas de oxigênio (ERO). A presença de tricomas não-secretores estrelares, pode ser uma ferramenta que confere alta resistência a essa planta contra o ataque por herbívoros e os danos causados por outros agentes (Domingos *et al.* 2015). Moura e colaboradores (2013) também relataram um sistema antioxidante bem eficiente em *C. floribundus*, que pode estar associado à tolerância dessa espécie frente ao estresse oxidativo.

*Astronium graveolens*, espécie não pioneira e conhecida popularmente como Guaritá ou Gonçalo-Alves, é uma fonte de suma importância de princípios ativos com propriedade alelopática e repelente (Chen *et al.* 1984, Silva *et al.* 2010). É pertencente a família Anarcadiaceae com presença de um odor bem característico (Lorenzi 2002). Estudos apontados por Silva e colaboradores (2010), descreveram os principais compostos secundários do gênero *Astronium*, com abundância de flavonoides, proantocianidinas (profisetinidina e prorobinetinidina), e alguns polifenóis (como lignina e tanino).

Apesar de poucos estudos realizados em espécies de *Astronium*, já se tem o conhecimento da presença de óleos essenciais constituídos principalmente por p-Cimeno, Limoneno, 3-careno e biciclogermacreno, além do principal composto volátil trans-Ocimeno

encontrado em suas folhas frescas, com potencial repelente contra o inseto *Acromyrnex lundii* (Hernández *et al.* 2013). Sabe-se também que os compostos p-Cimeno e Mirceno foram os mais encontrados na composição do óleo essencial dessa espécie vegetal em indivíduos da Colômbia (Rodriguez-Burbano *et al.* 2010), corroborando amostras coletadas tanto na Venezuela quanto no Brasil. O trans- $\beta$ -ocimeno aparentemente é a substância mais comum encontrada em quase todas as espécies deste gênero de planta (Rodriguez-Burbano *et al.* 2010, Hernández *et al.* 2013). Outros estudos relacionados à *A. graveolens* em interação com o ozônio, mostraram que a exposição ao ozônio altera sua atividade fotossintética e o processo de abscisão foliar com senescência celular acelerada, ressaltando o estresse induzido por esse poluente (Moura *et al.* 2013, Fernandes 2015, Cassimiro 2015).

*Piptadenia gonoacantha* (família Fabaceae), popularmente conhecida como Pau-Jacaré, é uma árvore pioneira de rápido crescimento (Marques *et al.* 2009), apesar de Leite & Takaki (1994) conferirem a essa espécie um comportamento de secundária inicial. É considerada indispensável nos reflorestamentos mistos por ser uma espécie interessante à recomposição de áreas degradadas (Lorenzi 2002, Almeida & Cortines 2008). Espécies deste gênero são cientificamente interessantes por serem utilizadas no preparo do rapé, como por exemplo o alcaloide Indol, presente em *P. peregrina*, com ação de euforia sobre os humanos. Outros compostos como flavonoides, cumarina, triterpenos e esteroides também foram detectados em diversos estudos nas demais espécies do gênero *Piptadenia* (Carvalho *et al.* 2010).

Ainda, Carvalho e colaboradores (2010), descreveram pela primeira vez a presença do éster asperfenamato, os flavonóides e os cicloartanos em *P. gonoacantha*. Já Moura (2013) verificou que *P. gonoacantha* apresentou alta sensibilidade em decorrência da exposição ao ozônio, com aparição de sintomas visíveis, redução na taxa fotossintética e indução da senescência provinda do acúmulo de espécies reativas de oxigênio dentro das folhas, especialmente de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Os voláteis emitidos a partir de espécies vegetais de regiões florestais devem ter um papel importante no comportamento atmosférico, uma vez que nessas regiões há uma ampla diversidade de espécies de plantas e uma grande complexidade da vegetação, o que implica na liberação de compostos voláteis ainda não mensurados (Baluška & Ninkovic 2010). Várias espécies de plantas que emitem uma quantidade significativa de monoterpenos e compostos oxigenados foram estudadas em alguns países do mundo (Arey *et al.* 1991, Kesselmeier & Staudt 1999, Kegge & Pierik 2009) e alguns gêneros dessas plantas ocorrem em regiões da Mata Atlântica impactadas por poluição atmosférica (Domingos *et al.* 1998), especialmente àquelas sob alto ozônio (Moura *et al.* 2014).

Contudo, pouco se conhece sobre o efeito do ozônio na indução dos orgânicos voláteis de plantas nativas brasileiras (Kesselmeier *et al.* 2009) e, menos ainda, daquelas ocorrentes em regiões antropizadas, em que altos níveis de ozônio são detectados. Estudos de campo têm mostrado que essas três espécies vegetais apresentam respostas de defesa distintas sob ação do ozônio (Moura *et al.* 2014). *Croton floribundus* tem sido caracterizada por sua alta taxa de defesas químicas, sendo a espécie mais resistente ao ozônio, seguida pelo *A. graveolens* e *P. gonoacantha*. As defesas químicas das plantas estão diretamente relacionadas com a produção de voláteis (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014). Por isso, acredita-se que os COV emitidos por plantas expostas ao ozônio podem ser espécie-específico. Dentre os estudos relacionados às espécies vegetais, não há dados mensurados na literatura referentes aos voláteis orgânicos induzidos em *P. gonoacantha* e *A. graveolens*. Portanto, o presente trabalho visa contribuir para a compreensão dos voláteis tanto constitutivos quanto induzidos pelo ozônio na vegetação nativa. Portanto, nesse trabalho buscou-se avaliar a ação do ozônio no perfil e na taxa de emissão dos voláteis produzidos por essas espécies vegetais, visando verificar se o ozônio induz voláteis que são reconhecidamente importantes para as interações ecológicas e para os processos fotoquímicos atmosféricos, tais como monoterpenos, sesquiterpenos, hemiterpenos.

### ***1.6.Objetivos***

O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar os voláteis produzidos constitutivamente por indivíduos jovens das espécies vegetais *Croton floribundus* Spreng., *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F Macbr., e *Astronium graveolens* Jacq. E também, caracterizar os voláteis das três espécies decorrentes da exposição ao ozônio, a fim de avaliar a ação do ozônio no perfil e na taxa de emissão dos voláteis produzidos por essas espécies vegetais, visando identificar possíveis COV que fossem específicos à indução pelo ozônio, e que poderiam ser utilizados como marcadores de exposição a esse poluente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 2.1 Cultivo e material vegetal

Mudas jovens de *Croton floribundus* Spreng., *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. e *Astronium graveolens* Jacq. foram adquiridas no viveiro comercial Bioflora, (São Paulo, Brasil). Os indivíduos foram uniformizados por altura da parte aérea (aproximadamente 50 cm) e transplantados em vasos plásticos de 5L contendo substrato do tipo Eucatex Plantmax em mistura com vermiculita na proporção de 3:1, respectivamente. Posteriormente, as plantas foram acomodadas e mantidas pelo período de um mês em casa de vegetação (Figura 5A) com ar filtrado, situada no Instituto de Botânica de São Paulo-SP (Latitude 23°38'08"S/23°40'18"S, Longitude 46°36'48"W/46°38'00"W), para aclimação pós transplante.



**Figura 5.** Vista frontal da casa de vegetação (A) com plantas de *C. floribundus* acomodadas sobre caixas de polietileno pós transplante para aclimação (B).

Os vasos permaneceram sobre caixas de polietileno (Figura 5B), recobertas com grades metálicas para garantir o suporte dos vasos. As caixas foram utilizadas como reservatórios de água e em cada vaso foram inseridas duas cordas de náilon que permaneceram em contato com água de forma a promover a irrigação por capilaridade. Quinzenalmente, 100 ml de solução nutritiva do tipo Hoagland foram aplicados em cada vaso contendo macronutrientes ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e micronutrientes ( $\text{KCl}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,



ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (85% MoO<sub>3</sub>), Fe-EDTA) necessários para o seu desenvolvimento.

Para os constitutivos, quarenta indivíduos de cada espécie vegetal foram selecionados e aclimatados às condições de luminosidade (radiação média: 422  $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ), temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $67,3 \pm 5,2 \%$ ) da coleta durante dois dias antes das folhas expandidas serem introduzidas em sacos de poliéster, previamente tratados em temperatura de 100°C em um período de 24 horas, com aberturas laterais para entrada e saída de ar, permitindo assim a manutenção das trocas gasosas. Para os indivíduos expostos ao ozônio, vinte e sete plantas foram acomodadas por quatro dias às mesmas condições laboratoriais e, ainda, às condições internas das câmaras de Teflon, utilizadas para os tratamentos AF e AF+O<sub>3</sub>.

## ***2.2 Exposição ao ozônio***

As exposições foram realizadas em câmaras (Figura 6) no sistema de fumigação do Laboratório de Interação Atmosfera-Planta (LABIAP) do Núcleo de Pesquisa em Ecologia (Souza & Pagliuso 2009), com condições experimentais de temperatura, radiação, fotoperíodo e umidade controladas. Ainda, ar condicionado central e iluminação artificial fornecida por luzes metálicas de vapor (400 W) e fluorescentes (30 W TL05).



**Figura 6.** Vista lateral (A) e frontal (B) das câmaras revestidas com Teflon associadas ao sistema de fumigação do Laboratório de Interação Atmosfera-Planta no Instituto de Botânica de São Paulo.

As câmaras foram constituídas por uma estrutura de aço inoxidável coberta por uma película de Teflon, nas dimensões de 85 cm x 94 cm 85 cm (Largura x profundidade x altura). O ar foi filtrado por filtro de papel (Whatman 40), gel de sílica (150 g, Merck), carvão ativo (250 g, Merck), permanganato de potássio (500 g, Purafil Select) e outra camada de filtro de papel (Whatman QMA).

Para a exposição, foram realizados dois tratamentos: Ar filtrado (AF) para o controle isento de ozônio, e o Ar filtrado enriquecido com 80 ppb de ozônio (AF+O<sub>3</sub>) para 2 (AF+2dO<sub>3</sub>) e 4 (AF+4dO<sub>3</sub>) dias de exposição ao poluente. Nove indivíduos de cada espécie foram expostos a cada tratamento, totalizando 18 indivíduos para AF+O<sub>3</sub>, e nove ao seu controle AF, ao longo de 5 horas por dia durante 4 dias consecutivos. Três repetições para cada exposição foram feitas para as três espécies vegetais em estudo.

Após filtração, o ar foi enriquecido com 80 ppb de ozônio, gerado sob descarga elétrica pela dissociação do oxigênio contido no ar filtrado por meio de um gerador (Figura 7A) de

ozônio (Ozontechnic), do qual os níveis desse poluente foram monitorados continuamente por um monitor fotométrico Ecotech 9810B (Figura 7B).



**Figura 7.** Gerador de ozônio (A) e monitor fotométrico Ecotech (B).

### ***2.3 Coleta dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV)***

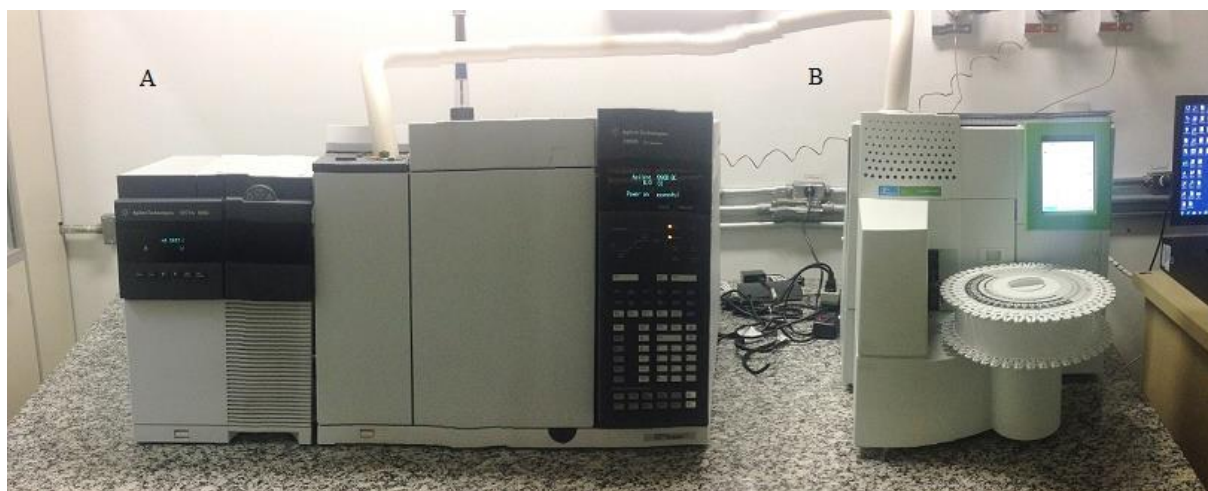
Os voláteis foram coletados (Figura 8) por meio de cartuchos, contendo 100 mg de Tenax TA mesh 60/80, acoplados à uma das aberturas e, também, associados a uma bomba de sucção com fluxo de ar amostrado de aproximadamente 0,2 L/min do total de 1,5 L/min de ar inserido. O tempo de amostragem compreendeu o período total de 90 minutos. As amostras foram armazenadas em refrigerador para posterior análise química.



**Figura 8.** Foto ilustrativa da coleta de compostos orgânicos voláteis em lâminas foliares de *C. floribundus*.

## ***2.4 Análise em cromatografia gasosa (CG-EM)***

Os voláteis amostrados foram analisados em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM Agilent 5977) e dessorvidos em nitrogênio gasoso por sistema de dessorção térmica automática ATD650 da Perkin-Elmer, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA, à 250°C durante 5 minutos, com temperatura de transferência de 200°C e taxa de aquecimento em 40°C/s com injeção de criofocagem a -30°C. O tempo total do ciclo de análise foi de 80 minutos. A separação da amostra gasosa foi realizada pela coluna capilar HP-5 (50 m x 0.2 mm i.d. x 0.5 µm de espessura do filme; Hewlett-Packard) por meio do gás de arraste Hélio (He).



**Figura 9.** Sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (A) e sistema de dessorção térmica (B).

## ***2.5 Identificação e quantificação dos compostos***

A identificação foi realizada por meio dos íons de massa a partir da comparação dos espectros de massa da amostra com os contidos na biblioteca química Wiley/NIST. A quantificação foi efetuada com base nas curvas analíticas dos padrões ( $\alpha$ -Pinene,  $\beta$ -Pinene, o-Cymene,  $\beta$ -Ocimene,  $\alpha$ -Terpinene, D-Limonene,  $\alpha$ -Copaene, Caryophyllene, 3-Carene, Humulene) desses voláteis adquiridos pela Sigma Aldrich, comercialmente disponíveis. A

curva do padrão  $\alpha$ -Pinene foi adotada para estimar as concentrações dos compostos que não tinham padrões disponíveis para a realização de suas respectivas curvas.

## **2.6 Tratamento de dados**

A taxa de emissão  $E_s$  [ $\text{ng g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] de cada um dos compostos foi calculada a partir de uma equação adaptada de Bracho-Nunez *et al.* (2013). Constituída pela diferença entre a concentração da amostra e a concentração do branco  $\Delta c$  em [ $\text{ng/L}$ ], pelo fluxo  $Q$  em [ $\text{L/h}$ ] e a massa seca [ $dw$ ] da amostra vegetal em [ $\text{g}$ ].

$$E_s = \Delta c \left( \frac{Q}{dw} \right)$$

A matriz de dados foi logaritimizada pela transformação [ $\log(x+1)$ ] no intuito de atenuar a heterogeneidade da variância. Ainda, esta conversão é altamente recomendável quando os dados tratados são muito pequenos ou próximos de zero (Zar 2007).

## **2.7 Análise estatística**

Para os voláteis constitutivos, as relações entre compostos orgânicos voláteis e espécies vegetais foram determinadas por meio da análise de coordenadas principais (ACoP). A análise de coordenadas principais é uma generalização da análise de componentes principais (ACP), que permite a redução do conjunto de dados em poucas variáveis. Difere quanto a ACP principalmente por permitir o uso de variáveis não lineares e dispensar os dados originais, utilizando-se uma matriz de similaridade (Prado *et al.* 2002).

As diferenças entre espécies foram testadas utilizando a análise de similaridade (ANOSIM) com  $\alpha$  crítico de 0.05 de significância, em que se testa o agrupamento entre as amostras dentro de um grupo em relação ao que se observa entre amostras de diferentes grupos (Anderson & Walsh 2013). Para descrever quais compostos contribuíram para a dissimilaridade

entre as espécies, foi realizada uma análise de percentual de similaridade (SIMPER). Esta análise de similaridade visa determinar a contribuição individual de cada composto dentro de cada grupo, e evidencia quais são os responsáveis pelo agrupamento das amostras e diferenças entre os grupos (Clarke & Warwick 2001, Pinto 2009).

Para os tratamentos ar filtrado (AF) e ar filtrado enriquecido com ozônio (AF+O<sub>3</sub>) (2 e 4 dias), foi calculada uma matriz de similaridade utilizando a distância semi-métrica de Bray-Curtis. O gráfico de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) foi realizado para ordenar espacialmente as amostras e mostrar a similaridade ou dissimilaridade entre tratamentos (Junior & Scarpel 2011).

Ademais, foi feita uma análise de variância multivariada de dois fatores (PERMANOVA) a fim de testar a diferença entre espécies e tratamentos, que calcula os valores de *p* a partir de permutações. Ainda, é uma ferramenta mais poderosa e versátil em relação à ANOVA, que assume distribuições normais, enquanto a PERMANOVA assume qualquer medida de distância adequada ao conjunto de dados e utiliza essas permutações para torná-la livre (Anderson 2005). E para descrever quais compostos contribuíram para a dissimilaridade das variáveis, foi também realizado o SIMPER.

Todos os testes foram realizados com o software Primer 6.0 (Plymouth Marine Laboratory, UK) (Clarke e Gorley 2006).

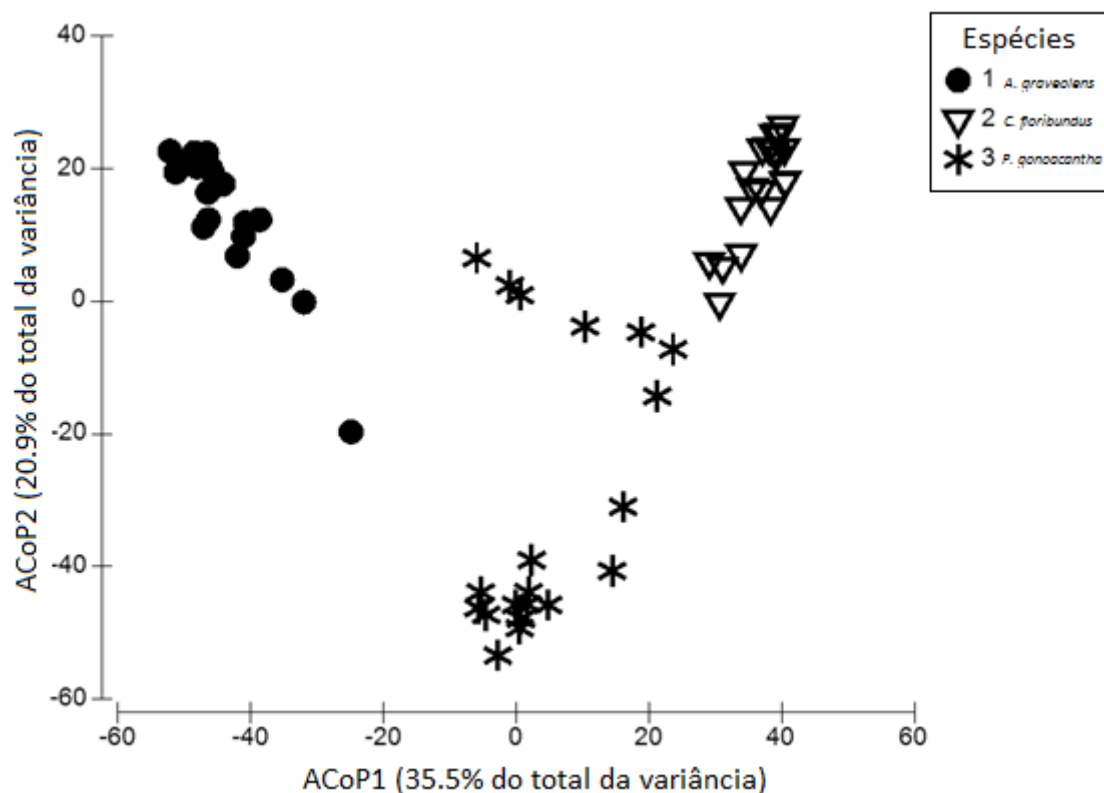
### 3. RESULTADOS

---

#### 3.1 Voláteis constitutivos

Foram identificados, ao todo, 25 compostos orgânicos voláteis emitidos, agrupados em quatro classes químicas distintas (monoterpenos, sesquiterpenos, voláteis de folhas verdes e outros), dos quais 11 foram encontrados para *Astronium graveolens*, 13 para *Croton floribundus* e 9 para *Piptadenia gonoacantha*.

A análise de coordenadas principais (Figura 10) mostra a distinção no perfil de emissão dos compostos entre as três espécies vegetais, uma vez que as amostras se ordenaram de forma bem espaçada por salientar que há presença de compostos específicos de cada espécie vegetal. O conjunto de dados para cada espécie foi agrupado nos dois eixos, que representam 35,5% e 20,9%, respectivamente, da fração da variância total. E quanto maior for a correlação entre o conjunto de dados, mais elevado será o valor da variância representada nestes eixos (Prado *et al.* 2002). Para os constitutivos, mais da metade dos dados, aproximadamente 56%, explica a variância total.



**Figura 10.** Análise de coordenadas principais (ACoP) realizada para *Astronium graveolens* (1), *Croton floribundus* (2) e *Piptadenia gonoacantha* (3).

A emissão dos voláteis distinguiu as espécies vegetais (Tabela 2) nas classes químicas, com predominância de monoterpenos para *A. graveolens* e sesquiterpenos para *C. floribundus*. Para *A. graveolens*, os monoterpenos com maior taxa de emissão foram o  $\alpha$ -Pineno e  $\beta$ -Mirceno. Os compostos mais abundantes, de modo geral, para essa espécie, além dos dois monoterpenos citados, foram o Farnesano e o Metil salicilato. Para *C. floribundus*, os sesquiterpenos mais emitidos foram  $\gamma$ -Elemeno e (-)- $\beta$ -Bourboneno. Além dos sesquiterpenos, *C. floribundus* emitiu alta taxa de  $\beta$ -Ocimeno, Geranil acetona e 3-Hexen-1-ol. No entanto, *P. gonoacantha*, apesar de não apresentar uma classe química representativa, emitiu  $\beta$ -Ocimeno, Farnesano e 3-Hexen-1-ol marjoritariamente.

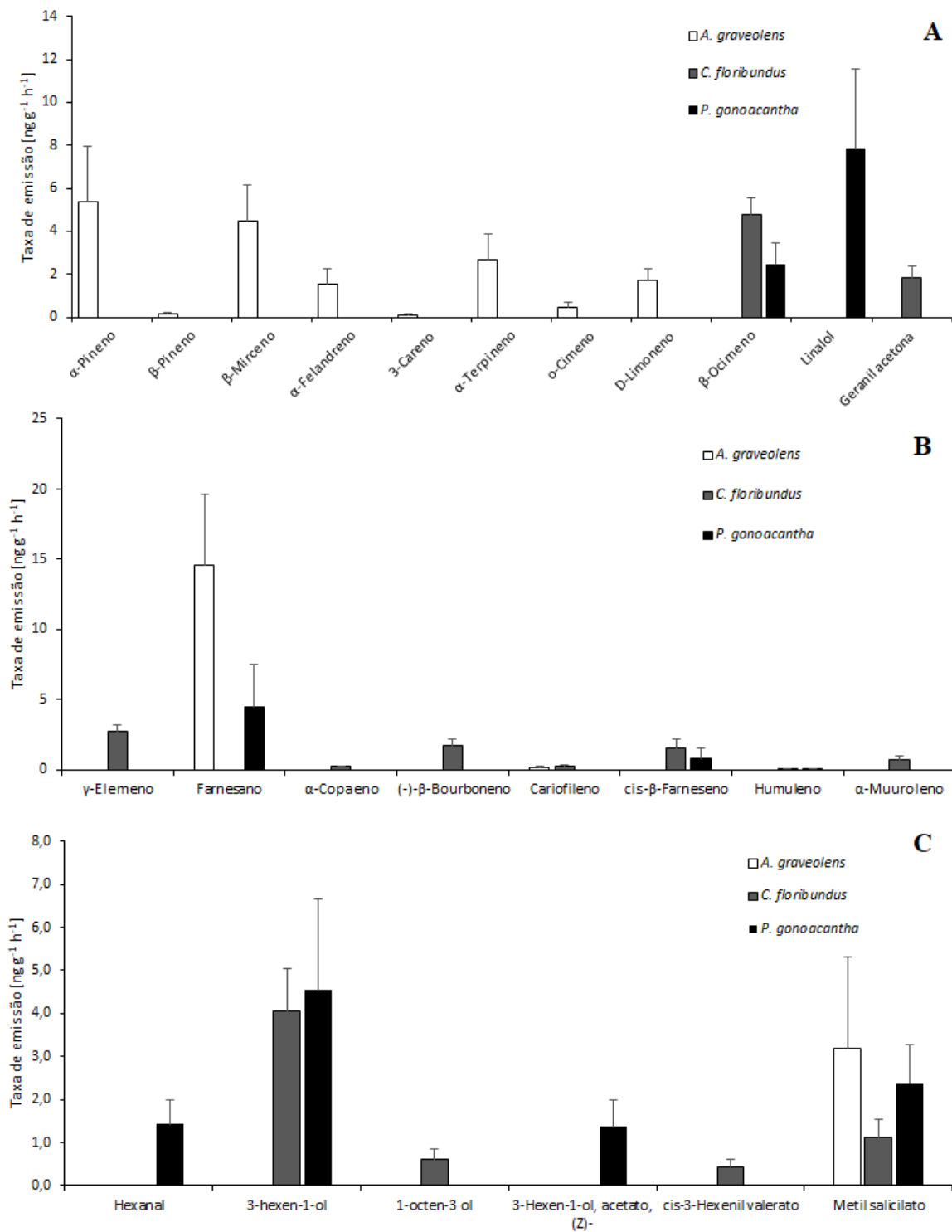


**Tabela 2.** Compostos orgânicos voláteis constitutivos emitidos pelas três espécies vegetais, detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG-EM). Valores representam a média [ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] ± erro padrão. (-) Ausência de emissão.

Compostos identificados	Espécies vegetais		
	<i>Astronium graveolens</i> [ng g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	<i>Croton floribundus</i> [ng g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	<i>Piptadenia gonoacantha</i> [ng g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
<i>Monoterpenos (C10)</i>			
α-Pineno	5,35 ± 2,61	-	-
β-Pineno	0,16 ± 0,07	-	-
β-Mirceno	4,47 ± 1,67	-	-
α-Felandreno	1,56 ± 0,69	-	-
3-Careno	0,10 ± 0,03	-	-
α-Terpineno	2,66 ± 1,24	-	-
o-Cimeno	0,43 ± 0,25	-	-
D-Limoneno	1,74 ± 0,51	-	-
β-Ocimeno	-	4,80 ± 0,75	7,85 ± 3,70
Linalol	-	-	0,42 ± 0,19
Geranyl acetona	-	1,86 ± 0,50	-
<i>Sesquiterpenos (C15)</i>			
γ-Elemeno	-	2,69 ± 0,54	-
Farnesano	14,54 ± 5,12	-	4,45 ± 3,06
α-Copaeno	-	0,22 ± 0,05	-
(-)-β-Bourboneno	-	1,73 ± 0,42	-
Cariofileno	0,16 ± 0,06	0,26 ± 0,05	-
cis-β-Farneseno	-	1,55 ± 0,67	0,80 ± 0,76
Humuleno	-	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,04
α-Muuroleno	-	0,71 ± 0,28	-
<i>Voláteis de folhas verdes</i>			
Hexanal	-	-	1,43 ± 0,54
3-hexen-1-ol	-	4,05 ± 0,98	4,54 ± 2,14
1-octen-3 ol	-	0,15 ± 0,06	-
3-Hexen-1-ol, acetato, (Z)-	-	-	1,36 ± 0,61
cis-3-Hexenil valerato	-	0,42 ± 0,18	-
<i>Outros compostos</i>			
Metil salicilato	3,18 ± 2,15	1,11 ± 0,41	2,37 ± 0,91
Soma total de COVs	34,35	19,6	23,27

Na figura 11 estão apresentadas as porcentagens dos voláteis emitidos em cada classe de compostos e para cada espécie vegetal. Essa apresentação dos resultados permite visualizar a contribuição de cada composto no *Blend* de voláteis de cada espécie estudada.

Comparando as espécies vegetais e a porcentagem dos compostos de cada classe química, os monoterpenos (Figura 11A) foram mais emitidos quantitativamente para *A. graveolens* do que para as demais espécies vegetais, dos quais  $\alpha$ -Pineno,  $\beta$ -Mirceno,  $\alpha$ -Felandreno,  $\alpha$ -Terpineno e D-Limeneno foram mais abundantes para esta espécie, enquanto  $\beta$ -Ocimeno e Geranil acetona foram para *C. floribundus* e  $\beta$ -Ocimeno e Linalol foram para *P. gonoacantha*. Ainda, o sesquiterpeno (Figura 11B) Farnesano foi mais emitido para *A. graveolens*, enquanto o  $\gamma$ -Elemeno, (-)- $\beta$ -Bourboneno, cis- $\beta$ -Farneseno,  $\alpha$ -Muroleno foram para *C. floribundus* e Farnesano e cis- $\beta$ -Farneseno para *P. gonoacantha*. Em relação aos voláteis de folhas verdes (Figura 11C), *A. graveolens* não apresentou compostos emitidos, enquanto 3-Hexen-1-ol, 1-Octen-3-ol, Cis-3-Hexenil Valerato foram abundantes para *C. floribundus* e o 3-Hexen-1-ol, Hexanal e 3-Hexen-1-ol, acetato para *P. gonoacantha*. Já a porcentagem de emissão do Metil salicilato (Figura 11C) foi maior para *A. graveolens* do que para as outras duas espécies vegetais.



**Figura 11.** Taxa de emissão [ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] dos compostos voláteis constitutivos encontrados para as três espécies vegetais para cada classe química: Monoterpenos (A), Sesquiterpenos (B), Voláteis de folhas verdes e Metil salicilato (C).

Essas diferenças também resultaram em três perfis de voláteis distintos pela ANOSIM (R global = 0,866,  $p = 0,01$ ). O valor de R é a informação mais importante desse teste, pois é a

medida de dissimilaridade entre os grupos definidos que permite saber a distância entre os grupos numa escala de 0 a 1, em que valores mais próximos de 1 ( $R > 0,75$ ) mostram que estes grupos são bem separados (Pinto 2009).

Conforme apresentados na Tabela 3, os compostos que contribuíram como marcadores para as espécies via SIMPER foram o sesquiterpeno Farnesano (49,65 %) e o monoterpene  $\beta$ -Mirceno (15,68 %) para *A. graveolens*, o monoterpene  $\beta$ -Ocimeno (23,36 %), o volátil de folhas verdes 3-Hexen-1-ol (20,90 %) e o sesquiterpeno  $\gamma$ -Elemeno (14,70 %) para *C. floribundus* e, Metil salicilato (31,26 %) e os voláteis de folhas verdes Hexanal (24,13 %) e 3-Hexen-1-ol, acetato, (Z)- (13,36 %) para *P. gonoacantha*.

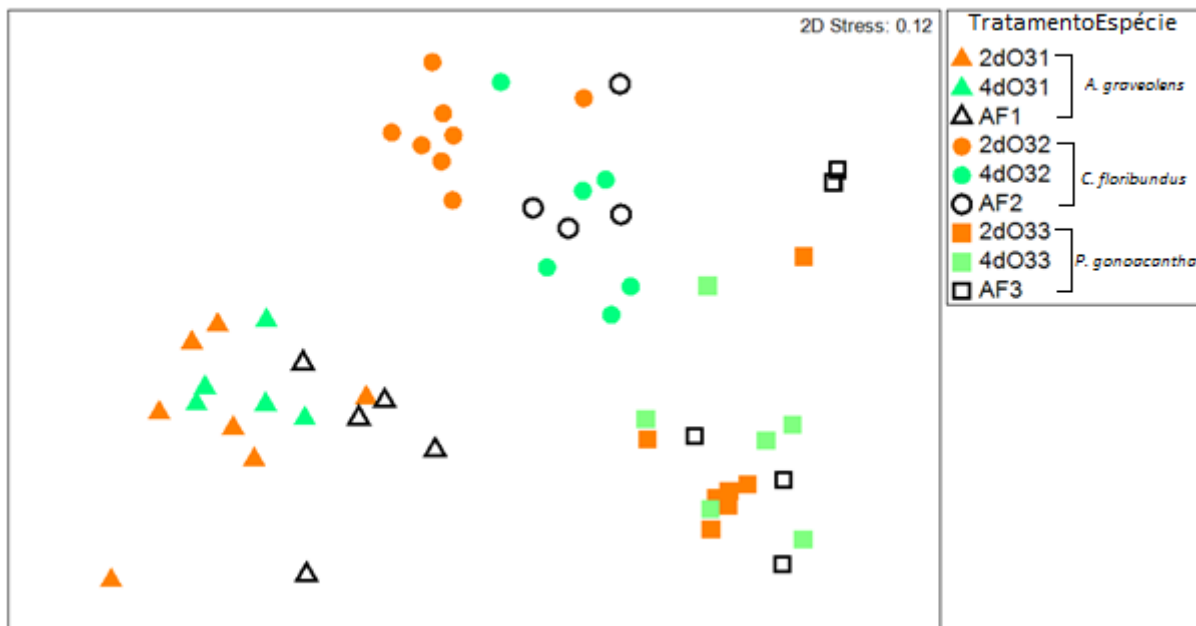
**Tabela 3.** Análise Simper indicando os compostos que mais contribuem para a similaridade das amostras pertencentes às espécies vegetais.

	Contribuição (%)	Contribuição acumulativa (%)
<i>Astronium graveolens</i>		
Farnesano	49,65	49,65
$\beta$ -Mirceno	15,68	65,33
D-Limoneno	9,61	74,93
Metil salicilato	8,64	83,57
$\alpha$ -Pinenos	5,79	89,37
$\alpha$ -Terpineno	3,34	92,71
<i>Croton floribundus</i>		
$\beta$ -Ocimeno	23,36	23,36
3-hexen-1-ol	20,90	44,26
$\gamma$ -Elemeno	14,70	58,96
(-)- $\beta$ -Bourboneno	9,68	68,64
Geranyl acetona	9,61	78,25
Metil salicilato	7,92	86,18
cis- $\beta$ -Farneseno	3,56	89,74
Cariofileno	2,33	92,07
<i>Piptadenia gonoacantha</i>		
Metil salicilato	31,26	31,26
Hexanal	24,13	55,39
3-Hexen-1-ol, acetato, (Z)-	13,36	68,75
Linalol	10,60	79,35
3-hexen-1-ol	10,20	89,55
$\beta$ -Ocimeno	8,17	97,73

### 3.2 Voláteis induzidos pela exposição ao ozônio

Foram identificados, ao todo, 49 compostos voláteis emitidos, agrupados nas mesmas classes químicas dos constitutivos (monoterpenos, sesquiterpenos, voláteis de folhas verdes e outros). Para *Astronium graveolens*, 23 compostos foram encontrados para o controle AF, 25 para o tratamento AF+O<sub>3</sub> (2 dias) e 23 para o tratamento AF+O<sub>3</sub> (4 dias). Para *Croton floribundus* foram encontrados 27 compostos para o controle AF, 30 compostos para o tratamento AF+O<sub>3</sub> (2 dias) e 28 para o tratamento AF+O<sub>3</sub> (4 dias). Já para *Piptadenia gonoacantha*, foram encontrados 14 compostos para o controle AF, 16 para o tratamento AF+O<sub>3</sub> (2 dias) e 16 para o tratamento AF+O<sub>3</sub> (4 dias).

Essa análise de coordenadas principais (nMDS) mostra a distinção no perfil de emissão dos compostos entre as três espécies vegetais (Figura 12), esboçando aglomerados distantes entre si, conforme também foi observado nas emissões constitutivas das três espécies de planta. Ainda, evidencia graficamente o resultado obtido via análise de variância multivariada permutativa (PERMANOVA), na qual a interação e os tratamentos foram testados.



**Figura 12.** Gráfico de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) realizado para *Astronium graveolens* (▲1), *Croton floribundus* (○2) e *Piptadenia gonoacantha* (□3), em seus respectivos controles de Ar filtrado (AF1, AF2, AF3) e tratamentos de dois dias de exposição ao ozônio (2dO31, 2dO32, 2dO33) e quatro dias de exposição ao ozônio (4dO31, 4dO32, 4dO33).

Constitutivamente e também nos tratamentos ar filtrado (AF), ar filtrado + 2 dias de exposição ao ozônio (AF+2dO<sub>3</sub>), e ar filtrado + 4 dias de exposição ao ozônio (AF+4dO<sub>3</sub>), as plantas apresentaram-se distintas quanto à emissão das classes químicas (Tabela 4), com predominância de compostos pertencentes à classe dos monoterpenos para *A. graveolens* e compostos sesquiterpenos para *C. floribundus*

**Tabela 4.** Compostos orgânicos voláteis emitidos pelas três espécies vegetais nos tratamentos AF, AF+O<sub>3</sub> (2 dias) AF+O<sub>3</sub> (4 dias), mensurados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Valores representam a média [ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] ± erro padrão. (-) Ausência de emissão.

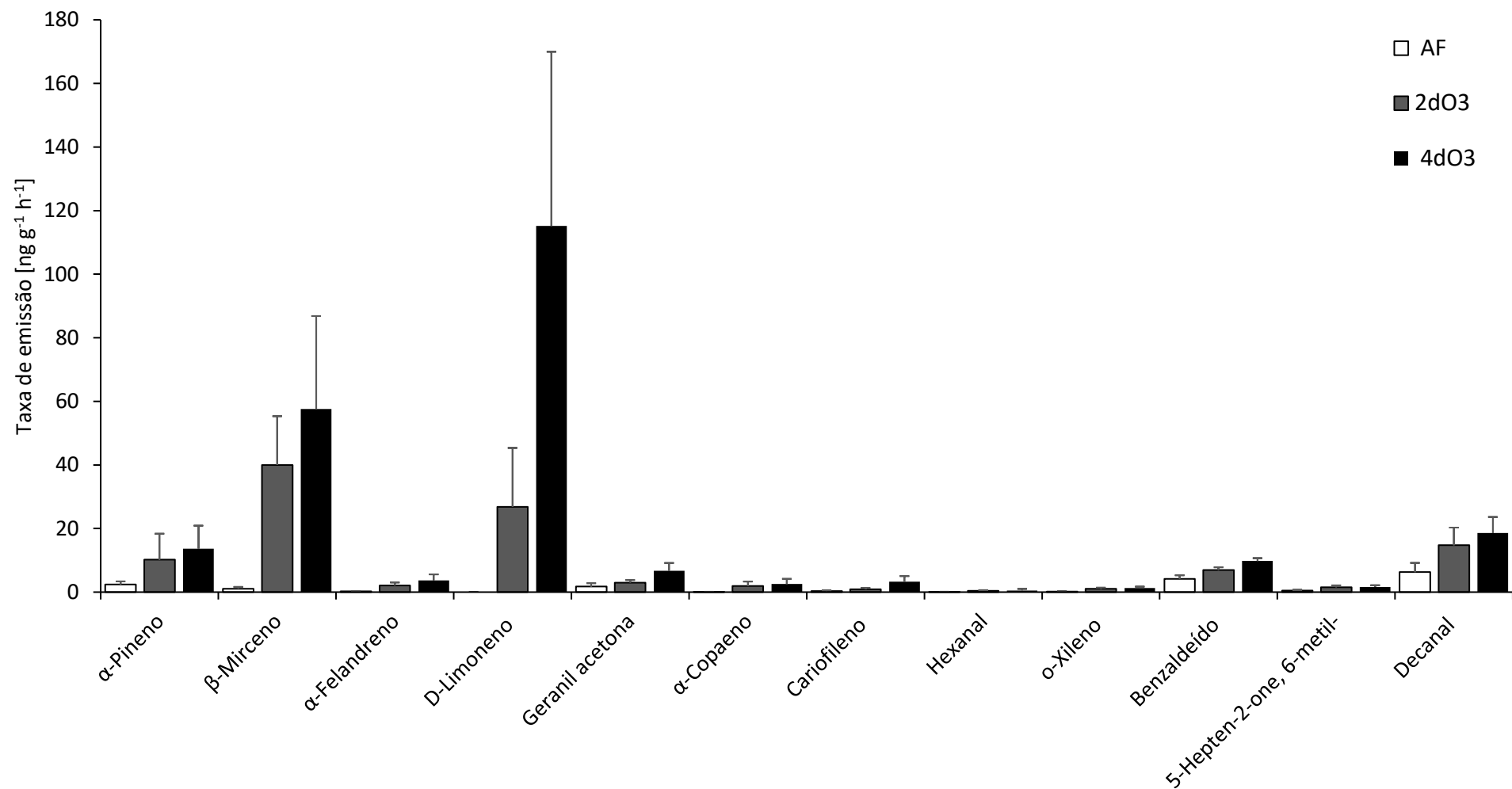
Compostos identificados	Espécies vegetais								
	<i>Astronium graveolens</i>			<i>Croton floribundus</i>			<i>Piptadenia gonoacantha</i>		
	AF	AF+2dO <sub>3</sub>	AF+4dO <sub>3</sub>	AF	AF+2dO <sub>3</sub>	AF+4dO <sub>3</sub>	AF	AF+2dO <sub>3</sub>	AF+4dO <sub>3</sub>
<i>Monoterpenos (C10)</i>									
α-Pineno	2,43 ± 0,94	10,20 ± 8,17	13,63 ± 7,27	-	-	-	-	-	-
β-Felandreno	-	-	-	0,44 ± 0,12	1,25 ± 0,55	2,69 ± 2,43	-	-	-
β-Pineno	0,20 ± 0,19	3,59 ± 1,59	1,16 ± 1,03	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,04	-	-	-
β-Mirceno	1,08 ± 0,55	39,99 ± 15,33	57,57 ± 29,26	-	-	-	-	-	-
α-Felandreno	0,22 ± 0,12	2,07 ± 0,95	3,66 ± 1,91	-	-	-	-	-	-
3-Careno	0,03 ± 0,02	0,09 ± 0,05	0,01 ± 0,01	-	-	-	-	-	-
α-Terpineno	-	25,03 ± 20,02	-	-	-	-	-	-	-
o-Cimeno	1,88 ± 1,77	0,88 ± 0,57	0,17 ± 0,12	-	-	-	-	-	-
D-Limoneno	-	26,85 ± 18,50	115,18 ± 54,76	-	-	-	-	-	-
β-Ocimeno	-	-	-	0,26 ± 0,17	0,37 ± 0,10	0,49 ± 0,41	0,17 ± 0,10	0,77 ± 0,61	0,57 ± 0,42
Linalol	-	-	-	-	-	-	6,21 ± 3,79	2,99 ± 2,69	0,71 ± 0,64
Citral	0,05 ± 0,03	1,75 ± 1,21	0,52 ± 0,46	-	-	-	-	-	-
Geranil acetona	1,73 ± 1,07	3,00 ± 0,79	6,68 ± 2,48	0,33 ± 0,16	3,06 ± 1,06	0,53 ± 0,14	-	-	-
<i>Sesquiterpenos (C15)</i>									
γ-Elemeno	-	-	-	1,55 ± 0,67	2,67 ± 1,29	1,53 ± 0,77	-	-	-
Farnesano	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Copaeno	0,07 ± 0,05	1,90 ± 1,41	2,55 ± 1,63	0,09 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,12	-	-	-
(-)-β-Bourboneno	-	-	-	1,17 ± 0,72	1,86 ± 0,94	1,61 ± 1,96	-	-	-
Cariofileno	0,33 ± 0,22	0,87 ± 0,44	3,28 ± 1,75	0,15 ± 0,05	0,29 ± 0,10	0,68 ± 0,60	-	-	-
cis-β-Farneseno	-	-	-	0,80 ± 0,47	1,75 ± 1,15	1,13 ± 0,63	-	-	-
Humuleno	0,04 ± 0,02	0,79 ± 0,42	0,43 ± 0,17	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,06	-	-	-
γ-Muuroleno	0,30 ± 0,14	18,09 ± 12,15	2,68 ± 2,52	-	-	-	-	-	-
β-copaeno	-	-	-	0,41 ± 0,18	0,49 ± 0,16	0,34 ± 0,13	-	-	-
α-Muuroleno	-	-	-	-	0,95 ± 0,47	0,05 ± 0,05	-	-	-

$\beta$ -Cadineno	0,41 $\pm$ 0,13	51,85 $\pm$ 29,14	1,29 $\pm$ 0,54	-	-	-	-	-	-
(-)-Spathulenol	-	-	-	0,23 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,43	0,69 $\pm$ 0,53	-	-	-
$\alpha$ -Farneseno	0,04 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,63	-	-	-	-	9,09 $\pm$ 5,54	0,98 $\pm$ 0,92	0,21 $\pm$ 0,11
<i>Voláteis de folhas verdes</i>									
Hexanal	0,07 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,24	0,53 $\pm$ 0,48	1,12 $\pm$ 0,64	5,63 $\pm$ 1,58	0,44 $\pm$ 0,14	2,02 $\pm$ 1,44	0,38 $\pm$ 0,18	0,65 $\pm$ 0,58
3-Hexen-1-ol, (Z)-	-	-	-	3,42 $\pm$ 2,24	4,73 $\pm$ 1,41	0,88 $\pm$ 0,44	3,34 $\pm$ 2,07	0,18 $\pm$ 0,12	1,74 $\pm$ 1,68
1-octen-3 ol	-	-	-	0,28 $\pm$ 0,20	1,63 $\pm$ 0,63	0,46 $\pm$ 0,37	-	-	-
3-Hexen-1-ol, acetato, (Z)-	-	-	-	-	-	-	0,87 $\pm$ 0,43	0,34 $\pm$ 0,13	0,24 $\pm$ 0,12
Nonanal	4,54 $\pm$ 1,41	12,46 $\pm$ 4,68	9,64 $\pm$ 3,13	0,17 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02
cis-3-Hexenil valerato	-	-	-	0,11 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,4	0,05 $\pm$ 0,05	-	-	-
<i>Outros compostos</i>									
2,4-Dimetil-1-heptene	0,05 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,03	-	-	-	-	-	-
o-Xileno	0,17 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,37	1,30 $\pm$ 0,42	-	-	-	0,22 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,10	0,38 $\pm$ 0,10
Nonane	-	-	-	-	-	-	-	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02
Heptanal	-	-	-	0,10 $\pm$ 0,10	0,48 $\pm$ 0,14	0,04 $\pm$ 0,01	-	-	-
Benzaldeído	4,19 $\pm$ 1,10	6,98 $\pm$ 0,82	9,78 $\pm$ 0,89	1,46 $\pm$ 0,36	8,84 $\pm$ 1,43	1,49 $\pm$ 0,18	0,72 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,19	1,06 $\pm$ 0,28
5-Hepten-2-one, 6-metil-	0,47 $\pm$ 0,24	1,53 $\pm$ 0,59	1,62 $\pm$ 0,54	0,14 $\pm$ 0,04	1,36 $\pm$ 0,33	0,17 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,03
Octanal	-	-	-	0,21 $\pm$ 0,20	0,71 $\pm$ 0,35	0,17 $\pm$ 0,09	0,08 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,04
1-Hexanol, 2-etil-	-	-	-	1,12 $\pm$ 0,17	3,86 $\pm$ 1,21	2,29 $\pm$ 1,32	-	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01
1-Octanol, 3,7-dimetil	-	-	-	-	-	-	0,05 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,03
Geranil benzoato	-	-	-	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	-	-	-
Menta-2,8-dien-1-ol, trans-para	0,45 $\pm$ 0,35	1,31 $\pm$ 0,87	1,13 $\pm$ 1,00	-	-	-	-	-	-
Metil salicilato	0,77 $\pm$ 0,57	12,24 $\pm$ 9,43	2,83 $\pm$ 2,62	2,19 $\pm$ 1,57	3,52 $\pm$ 0,73	0,55 $\pm$ 0,28	5,24 $\pm$ 3,05	0,43 $\pm$ 0,20	1,35 $\pm$ 0,75
Decanal	6,29 $\pm$ 2,89	14,73 $\pm$ 5,56	18,60 $\pm$ 5,02	3,63 $\pm$ 1,53	6,89 $\pm$ 1,35	2,73 $\pm$ 0,36	0,83 $\pm$ 0,27	1,18 $\pm$ 0,22	1,91 $\pm$ 0,79
$\alpha$ -Ionone	-	-	-	-	1,95 $\pm$ 0,73	-	-	-	-
trans- $\beta$ -Ionone	-	-	-	-	12,42 $\pm$ 3,97	-	-	-	-
n-Hexil salicilato	-	-	-	0,03 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,02	-	-	-
2-Etilhexil salicilato	-	-	-	1,15 $\pm$ 0,37	0,51 $\pm$ 0,27	0,12 $\pm$ 0,03	-	-	-
Soma total dos COV	25,81	124,95	254,34	20,67	68,02	19,68	28,94	10,63	7,71



Considerando a taxa de emissão dos voláteis (Tabela 4), os mais abundantes para *A. graveolens* foram Decanal, Nonanal e Benzaldeído para o controle AF;  $\beta$ -Cadineno, D-Limoneno e  $\alpha$ -Terpineno para o tratamento AF+2dO<sub>3</sub>; e D-Limoneno e  $\beta$ -Mirceno para o tratamento AF+4dO<sub>3</sub>. Para *C. floribundus*, o controle AF emitiu mais 3-Hexen-1-ol, (Z)- e Decanal; enquanto o tratamento AF+2dO<sub>3</sub> emitiu Trans- $\beta$ -Ionone, Decanal e Hexanal; e o tratamento AF+4dO<sub>3</sub> emitiu  $\beta$ -Felandreno, Decanal e 1-Hexanol, 2-etil-. Já *P. gonoacantha*, apresentou taxa de emissão mais elevada para os compostos Linalol e 3-hexen-1-ol para AF e AF+2dO<sub>3</sub>, e ainda Metil Salicilato para o AF. No entanto, apresentou emissão mais elevada de Decanal, Metil Salicilato e Benzaldeído para o tratamento AF+4dO<sub>3</sub>.

Na figura 13, estão apresentadas as taxas de emissão dos voláteis em cada classe de compostos nos tratamentos em relação ao controle. Os resultados esboçados nos gráficos evidenciam a contribuição de cada composto pertencente à uma classe química distinta para essa espécie, em decorrência da exposição ao ozônio.



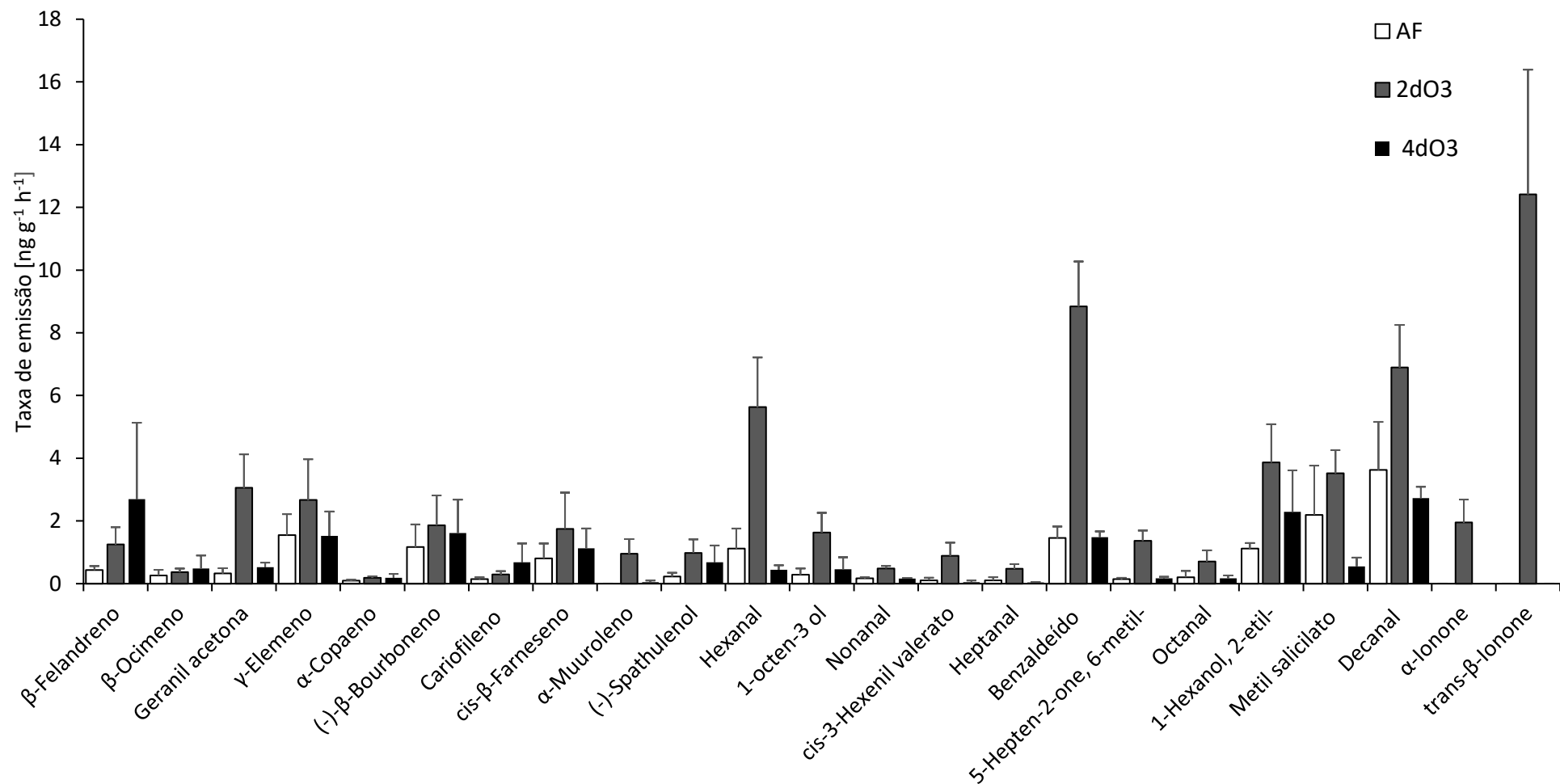
**Figura 13.** Taxa de emissão [ $\text{ng g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] dos compostos voláteis induzidos pela exposição ao ozônio encontrados para *Astronium graveolens*. Tratamentos Ar filtrado (AF), Ar filtrado + ozônio com dois dias de exposição (2dO<sub>3</sub>) e Ar filtrado + ozônio com quatro dias de exposição (4dO<sub>3</sub>).

Comparando os monoterpenos (Figura 13) emitidos por *A. graveolens* a maioria dos compostos como  $\alpha$ -Pineno,  $\beta$ -Mirceno, D-Limoneno,  $\alpha$ -Felandreno e Geranil acetona foram induzidos pela exposição ao ozônio, tendo sua taxa de emissão elevada ao decorrer dos dias. Já o  $\beta$ -Pineno, 3-Careno,  $\alpha$ -Terpineno e Citral apresentaram picos de emissão com dois dias de exposição e reduziram no quarto dia, enquanto apenas o o-Cimeno foi inibido e apresentou redução nos seus valores com a exposição.

Os sesquiterpenos induzidos que aumentaram conforme os dias de exposição foram o  $\alpha$ -Copaeno e o Cariofileno, no entanto nota-se um pico de emissão para o  $\gamma$ -Muuroleno e o  $\beta$ -Cadineno, com valores elevados com dois dias de exposição ao ozônio. Compostos como o Humuleno, e o  $\alpha$ -Farneseno aumentaram no segundo dia de exposição e decaíram com quatro dias de tratamento.

Apenas dois voláteis de folhas verdes foram emitidos para essa espécie, sendo que o Nonanal apresentou alta emissão com dois dias de exposição e o Hexanal foi induzido, havendo aumento na sua taxa com a exposição continuada. Outros compostos (Figura 13D) como 2,4-Dimetil-1-hepteno, o-Xileno, Benzaldeído e Decanal também foram induzidos pela exposição contínua ao ozônio, enquanto 5-hepten-2-one, 6-metil, menta-2,8-dien-1-ol, trans-para e metil salicilato reduziram seus valores de emissão com quatro dias de exposição.

Os monoterpenos encontrados para *Croton floribundus* não foram tão abundantes quanto em *A. graveolens*, sendo apenas o  $\beta$ -Felandreno,  $\beta$ -Pineno,  $\beta$ -Ocimeno e Geranil acetona emitidos de forma induzida em decorrência da exposição ao ozônio, aumentando suas taxas conforme os dias de exposição ao poluente, dos quais apenas Geranil acetona apresentou uma queda com quatro dias de tratamento.



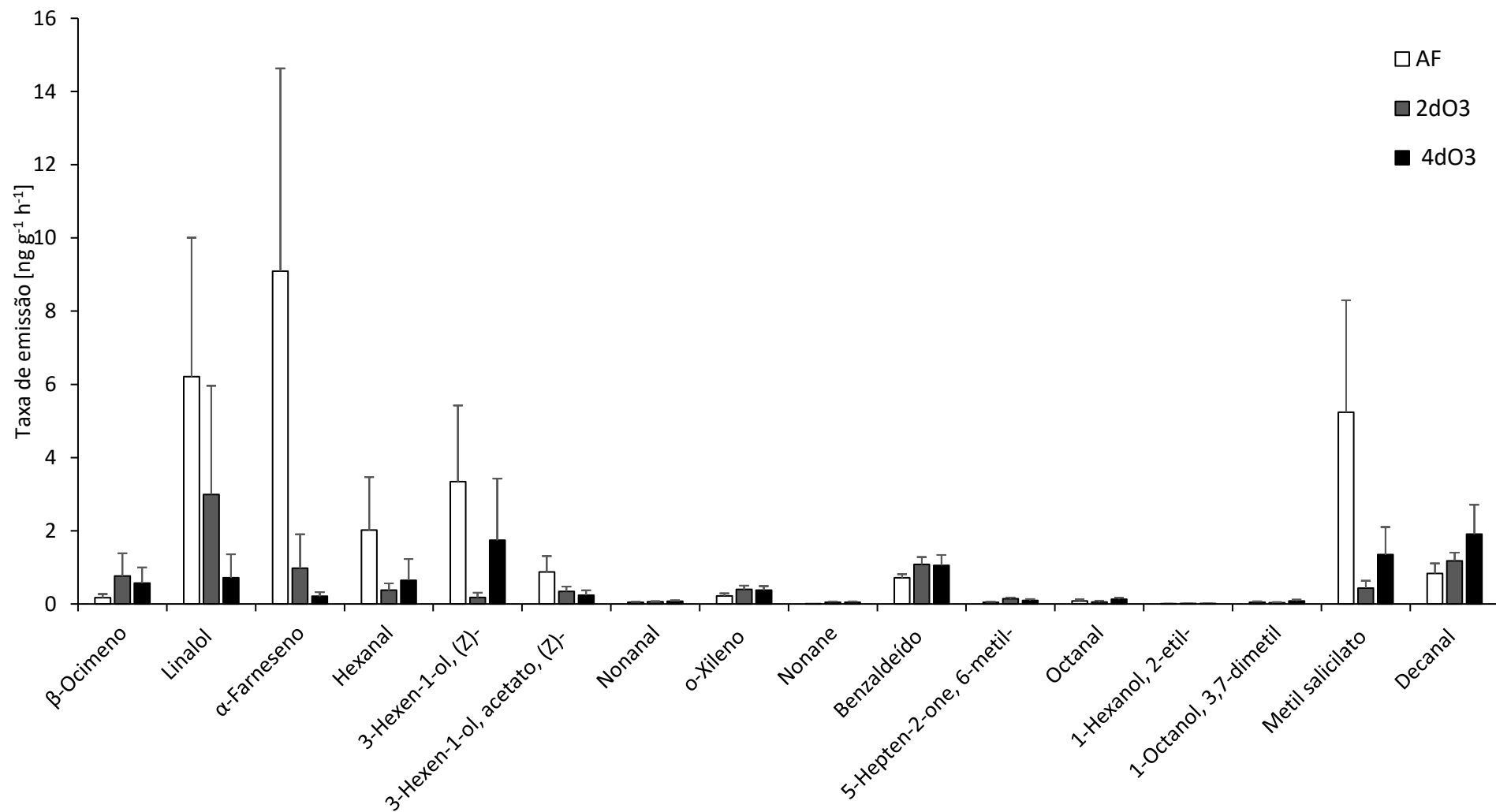
**Figura 14.** Taxa de emissão [ng g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] dos compostos voláteis induzidos pela exposição ao ozônio encontrados para *Croton floribundus*. Tratamentos Ar filtrado (AF), Ar filtrado + ozônio com dois dias de exposição (2dO<sub>3</sub>) e Ar filtrado + ozônio com quatro dias de exposição (4dO<sub>3</sub>).

Em contrapartida, os sesquiterpenos (Figura 14) foram bem abundantes para essa espécie, com emissão crescente para os compostos  $\alpha$ -Copaeno, Cariofileno e Humuleno ao longo dos dias de exposição em relação ao controle AF. No entanto, os demais compostos como  $\gamma$ -Elemeno, (-)- $\beta$ -Bourboneno, Farneseno,  $\beta$ -Copaeno,  $\alpha$ -Muuroleno e  $\alpha$ -Farneseno apresentaram picos de emissão máxima no tratamento com dois dias exposição (AF+2dO<sub>3</sub>).

Todos os voláteis de folhas verdes, como o Hexanal, 3-Hexen-1-ol (Z), 1-octen-3-ol, Nonanal e cis-3-hexenil-valerato, foram induzidos pela exposição ao ozônio com dois dias de tratamento em relação ao ar filtrado, no entanto decaíram quanto sua taxa de emissão no quarto dia de tratamento.

Outros compostos como o Heptanal, Benzaldeído, 5-hepten-2-one,6-metil, Octanal, 1-hexanol-2-etil, metil salicilato, decanal,  $\alpha$ -Ionone, trans- $\beta$ -Ionone e n-Hexil salicilato foram elevados no tratamento AF+2dO<sub>3</sub>, com picos de emissão neste segundo dia de exposição, exceto o geranyl benzoato que permaneceu inalterado no tratamento AF+2dO<sub>3</sub> em relação ao controle AF, apresentando queda no último dia de exposição (AF+4dO<sub>3</sub>), e 2-etilhexil salicilato que foi inibido pelo ozônio, apresentando queda gradativa em sua taxa de emissão ao longo da exposição.

*P. gonoacantha* emitiu apenas dois monoterpenos e um sesquiterpeno. O  $\beta$ -Ocimeno teve sua emissão elevada devido a exposição ao ozônio no tratamento de dois dias e reduziu dada a continuidade dos dias, enquanto o Linalol teve sua taxa reduzida em decorrência dos tratamentos com ozônio. Já o sesquiterpeno  $\alpha$ -Farneseno reduziu substancialmente sob a exposição em relação ao ar filtrado.



**Figura 15.** Taxa de emissão [ $\text{ng g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] dos compostos voláteis encontrados para *Piptadenia gonoacantha*. Tratamentos Ar filtrado (AF), Ar filtrado + ozônio com dois dias de exposição (2dO<sub>3</sub>) e Ar filtrado + ozônio com quatro dias de exposição (4dO<sub>3</sub>).

Os voláteis de folhas verdes (Figura 15) 3-hexen-1-ol (Z) e 3-hexen-1-ol, acetato decaíram sob ação do ozônio, reduzindo suas taxas de emissão no decorrer da exposição, enquanto o Hexanal apresentou um aumento no tratamento AF+4dO<sub>3</sub> e o Nonanal foi mais emitido conforme os dias de exposição, aumentando no quarto dia.

Para os outros compostos como o o-Xileno, benzaldeído e 5-hepten-2-one, 6-metil, apresentaram emissão máxima no segundo dia de exposição, enquanto o Nonano e o 1-hexanol-2-etil aumentaram no tratamento AF+2dO<sub>3</sub> em relação ao AF, mas mantiveram suas taxas de emissão constantes no tratamento AF+4dO<sub>3</sub>. Já o Decanal aumentou seus valores conforme a exposição ao ozônio.

A interação entre as espécies vegetais e os tratamentos foi estatisticamente significativa ( $p = 0,001$ ) conforme os resultados obtidos pela PERMANOVA. O padrão de voláteis emitido por *A. graveolens* é afetado pelo ozônio independente do tempo de exposição, em que ambos os tratamentos AF+2dO<sub>3</sub> e AF+4dO<sub>3</sub> foram diferentes do controle AF ( $p = 0.012$ ;  $p = 0.01$  respectivamente), no entanto, não diferiram entre si ( $p = 0.639$ ). Para *C. floribundus*, o tratamento AF+2dO<sub>3</sub> diferiu do tratamento AF+4dO<sub>3</sub> ( $p = 0.002$ ) e do controle AF ( $p = 0.008$ ), mas estes, AF e AF+4dO<sub>3</sub>, não foram estatisticamente distintos ( $p = 0.596$ ). Já para *P. gonoacantha*, os dois tratamentos AF+2dO<sub>3</sub> e AF+4dO<sub>3</sub> e o controle AF não apresentaram diferenças significativas ( $p = 0.252$ ;  $p = 0.599$ ;  $p = 0.682$ ).

**Tabela 5.** Análise Simper indicando os compostos que mais contribuem para a similaridade entre as amostras AF, AF+2dO<sub>3</sub>, AF+4dO<sub>3</sub> para *Astronium graveolens* e *Croton floribundus*. *Piptadenia gonoacantha* não apresentou diferença estatística entre os tratamentos.

	Contribuição (%)	Contribuição acumulativa (%)
<i>Astronium graveolens</i>		
AF		
Benzaldeído	24,68	24,68
Nonanal	23,18	47,86
Decanal	16,49	64,35
α-Pineno	10,68	75,03
Geranil acetona	5,39	80,42
β-Cadineno	3,86	84,28
β-Mirceno	3,45	87,73
5-hepten-2-one, 6-metil	3,16	90,89
AF+2dO <sub>3</sub>		
β-Mirceno	18,40	18,40
Benzaldeído	16,34	34,74
Nonanal	12,19	46,92
γ-Muroleno	10,47	57,40
Decanal	9,19	66,59
β-Cadineno	7,32	73,91
Geranil acetona	6,50	80,41
α-Pineno	3,47	83,88
Metil salicilato	2,38	86,26
o-Xileno	2,34	88,60
5-hepten-2-one, 6-metil	2,33	90,92
AF+4dO <sub>3</sub>		
β-Mirceno	19,29	19,29
Decanal	15,64	34,93
Benzaldeído	14,49	49,42
Nonanal	11,65	61,07
Geranil acetona	8,88	69,94
D-Limoneno	7,56	77,51
α-Pineno	4,02	81,53
5-hepten-2-one, 6-metil	3,72	85,25
o-Xileno	3,07	88,32
Cariofileno	2,77	91,09
<i>Croton floribundus</i>		
AF		
Decanal	16,33	16,33
Benzaldeído	11,50	27,83



1-hexanol-2-etil	10,37	38,20
3-Hexen-1-ol (Z)	9,74	47,94
$\gamma$ -Elemeno	8,33	56,27
2-Etilhexil salicilato	8,08	64,35
Metil salicilato	6,41	70,76
(-)- $\beta$ -Bourboneno	4,74	75,50
Hexanal	4,22	79,72
$\beta$ -Felandreno	3,90	83,63
$\beta$ -Copaeno	2,58	86,20
Cis- $\beta$ -Farneseno	2,18	88,38
Geranil acetona	2,02	90,40

AF+2dO<sub>3</sub>

Benzaldeído	13,14	13,14
Trans- $\beta$ -Ionone	9,85	22,99
Decanal	9,72	32,71
3-Hexen-1-ol (Z)	9,22	41,93
Hexanal	8,04	49,98
Metil salicilato	7,20	57,18
1-Hexanol-2-etil	6,27	63,45
Geranil acetona	5,06	68,51
5-hepten-2-one, 6-metil	3,70	72,20
(-)- $\beta$ -Bourboneno	3,29	75,50
$\alpha$ -Ionone	3,09	78,59
1-octen-3-ol	2,73	81,32
$\gamma$ -Elemeno	2,03	83,35
Nonanal	2,02	85,37
$\beta$ -Felandreno	1,93	87,30
(-)-Spathulenol	1,62	88,93
Cis-3-hexenil valerato	1,29	90,21

AF+4dO<sub>3</sub>

Decanal	24,02	24,02
Benzaldeído	16,78	40,80
1-Hexanol-2-etil	11,47	52,27
$\gamma$ -Elemeno	7,78	60,04
(-)- $\beta$ -Bourboneno	4,97	65,01
Hexanal	4,80	69,82
Geranil acetona	4,58	74,40
3-Hexen-1-ol (Z)	3,97	78,37
Metil salicilato	2,55	80,92
Nonanal	2,53	83,45
Cis- $\beta$ -Farneseno	2,47	85,91
$\beta$ -Copaeno	2,19	88,11
(-)-Spathulenol	2,02	90,13

Conforme apresentados na Tabela 6, os compostos que contribuíram como marcadores para *Astronium graveolens* via SIMPER foram o Benzaldeído (24,68 %), Nonanal (23,18 %) e Decanal (16,49 %) para o tratamento AF;  $\beta$ -Mirceno (18,40 %), Benzaldeído (16,34 %), Nonanal (12,19 %),  $\gamma$ -Muroleno (10,47 %) e Decanal (9,19 %) para o tratamento AF+2dO<sub>3</sub>; e  $\beta$ -Mirceno (19,29 %), Decanal (15,64 %), Benzaldeído (14,49 %), Nonanal (11,65 %) e Geranil acetona (8,88 %) para o tratamento AF+4dO<sub>3</sub>.

Já para *Croton foribundus*, os compostos marcadores foram Decanal (16,33 %), Benzaldeído (11,50 %), 1-hexanol-2-etil (10,37 %), 3-Hexen-1-ol (Z) (9,74 %),  $\gamma$ -Elemeno (8,33 %) e 2-Etilhexil salicilato (8,08 %) para o tratamento AF; Benzaldeído (13,14 %), Trans- $\beta$ -Ionone (9,85 %), Decanal (9,72 %), 3-Hexen-1-ol (Z) (9,22 %), Hexanal (8,04 %), Metil salicilato (7,20 %), 1-Hexanol-2-etil (6,27 %) e Geranil acetona (5,06 %) para o tratamento AF+2dO<sub>3</sub>; e Decanal (24,02 %), Benzaldeído (16,78 %), 1-Hexanol-2-etil (11,47 %),  $\gamma$ -Elemeno (7,78 %), (-)- $\beta$ -Bourboneno (4,97 %) e Hexanal (4,80 %) para o tratamento AF+4dO<sub>3</sub>. *Piptadenia gonoacantha* não apresentou diferença estatística entre os três tratamentos (AF, AF+2dO<sub>3</sub> e AF+4dO<sub>3</sub>).

## 4. DISCUSSÃO

---

### 4.1 Voláteis constitutivos

Compostos orgânicos voláteis biogênicos (COVB) emitidos por espécies vegetais brasileiras vem sendo amplamente investigados na região da Amazônia, que é responsável por grande parte das emissões de COVB, por exemplo os alcenos ou cicloalcenos, como os terpenos (Aquino 2006, Dos Santos 2014). Porém, estudos com espécies vegetais nativas da Mata Atlântica são escassos, dificultando o entendimento da contribuição dos voláteis biogênicos nos processos atmosféricos dessas regiões.

Em relação a Amazônia, um estudo realizado por Harley e colaboradores (2004), demonstrou que mais de 100 espécies vegetais, pertencentes à diversas famílias, são fortes emissoras de isoprenóides incluindo *Anacardium occidentale*, *Mangifera indica*, e *Spondias mombin*, representantes da família Anacardiaceae, a mesma da espécie em estudo *Astronium graveolens*, além de plantas como *Croton lanjouwensis*, *Croton matourensis*, *Hevea guianensis* e *Mabea sp*, classificadas dentro da família Euphorbiaceae, também representada pelo objeto de estudo *Croton floribundus*. Contudo, esse é o primeiro trabalho que apresenta a taxa de emissão de voláteis de lâminas foliares de indivíduos jovens de *C. floribundus*, *P. gonoacantha* e *A. graveolens*, que são espécies nativas da Mata Atlântica.

Muitos representantes da família Euphorbiaceae são considerados tóxicos e/ou medicinais devido à alta diversidade química do grupo. Várias espécies desta família de plantas, especialmente o gênero *Croton*, tem caráter aromático com presença de voláteis na composição de seus óleos como monoterpenos, sesquiterpenos e compostos derivados da via do ácido chiquímico (Oliveira *et al.* 2001). Estudos reportam a presença dos sesquiterpenos como o Cariofileno e o trans-Cariofileno em espécies de *Croton* situadas no Nordeste do Brasil (Block *et al.* 2006), enquanto as folhas de *C. zambesicus* apresentam os óleos voláteis Cariofileno e  $\alpha$ -

Copaeno (Salatino *et al.* 2007), corroborando a forte presença de sesquiterpenos nos voláteis constitutivos das lâminas foliares de *C. floribundus*. De Araújo-Neves & Da Camara (2012), classificaram os compostos Humuleno e Aromadendreno como os sesquiterpenos mais abundantes na composição de óleos do gênero *Croton*, pertencentes ao bioma da Caatinga do Estado de Pernambuco, também corroborando os voláteis de *C. floribundus*, em que o Humuleno foi identificado.

Outro estudo descrito por Bracho-Nunez e colaboradores (2013), mostrou que espécies tropicais encontradas na Amazônia emitiram quantidades consideráveis de compostos monoterpenos. Algumas das espécies estudadas são pertencentes às mesmas famílias Euphorbiaceae e Fabaceae, do *Croton floribundus* e *Piptadenia gonoacantha*, respectivamente. Dentre esses representantes, *Vatairea guianensis* Aubl., da família Fabaceae, emitiu grande quantidade de compostos isoprenos, e as espécies *Hevea spruceana* (Benth.) Mull.Arg., *Hevea brasiliensis* (Willd. ex. A.Juss.) Mull.Arg. e *Hevea guianensis* Aubl., da família Euphorbiaceae, emitiram compostos monoterpenos como  $\alpha$ -Pineno, Limoneno, Sabineno, Canfeno,  $\beta$ -Mirceno,  $\gamma$ -Terpineno e  $\alpha$ -Felandreno. Esses voláteis não foram expressivamente emitidos por *C. floribundus*, que foi representado particularmente pelo monoterpeno  $\beta$ -ocimeno e o sesquiterpeno  $\gamma$ -Elemeno, mas contribuíram significativamente para a emissão dos voláteis de *A. Graveolens*, especialmente o  $\beta$ -Mirceno que foi considerado um marcador quimiotipo dessa espécie vegetal.

Apesar da identificação de vários compostos das espécies estudadas serem comuns aos voláteis de espécies vegetais da região da Amazônia, não há relatos da discriminação das espécies na Amazônia frente à composição química dos seus voláteis como apresentado para as espécies da Mata Atlântica no presente trabalho, em que as três espécies vegetais foram classificadas em quimiotipos, com predominância do monoterpeno  $\beta$ -Mirceno e o sesquiterpeno Farnesano para *Astronium graveolens*, o monoterpeno  $\beta$ -ocimeno e o sesquiterpeno  $\gamma$ -Elemeno,

além do volátil de folhas verdes 3-Hexen-1-ol para *Croton floribundus*, e os voláteis de folhas verdes como 3-hexen-1-ol e Hexanal, ainda o Metil salicilato para *Piptadenia gonoacantha*.

*A. graveolens* emitiu vários compostos identificados em espécies da Amazônia, tais como  $\alpha$ -Pinenos,  $\beta$ -Mirceno,  $\alpha$ -Felandreno e D-Limoneno. Outros voláteis como  $\beta$ -Pinenos e 3-Careno, em menor proporção, também foram emitidos. Na literatura, tem-se o conhecimento sobre os princípios ativos dessa planta com propriedades alelopática e repelente (Chen *et al.* 1984, Silva *et al.* 2010), como no caso do composto D-Limoneno que tem papel alelopático no crescimento e germinação de sementes de plantas vizinhas (Maffei *et al.* 2011). Também é relatada a presença de óleos essenciais constituídos principalmente por p-Cimeno, Limoneno e 3-careno, além dos compostos voláteis trans-Ocimeno e Mirceno (Rodriguez-Burbano *et al.* 2010), sendo este último um dos compostos mais representativos estatisticamente obtidos nas emissões totais de compostos orgânicos voláteis para *A. graveolens* constitutivamente.

De acordo com Padhy & Varshney (2005),  $\alpha$ -Pinenos e  $\beta$ -Pinenos compreendem os compostos mais emitidos em escala global, enquanto os demais monoterpenos como Canfeno, Mirceno, Sabineno,  $\beta$ -Felandreno e o-Cimeno apresentam maior importância em escala regional e local (Geron *et al.* 2000). Nesse cenário, os voláteis de *A. graveolens* devem contribuir mais para a escala global, enquanto os emitidos por *C. floribundus* e *P. gonoacantha* para escala regional, o que ressalta a importância dessas espécies vegetais em estudo na contribuição para essas emissões de voláteis à atmosfera.

*C. floribundus* é uma espécie considerada tolerante ao estresse (Domingos *et al.* 2015) de crescimento rápido à moderado (Lorenzi 1992), que apresentou alta emissão de sesquiterpenos, indicado por voláteis característicos de defesas químicas contra os ataques expressivos de pragas (Cheng *et al.* 2007). *P. gonoacantha* é mais sensível ao estresse conforme obtido por Moura (2013), com presença de muitos voláteis de folhas verdes atuantes nas defesas

primárias entre plantas e herbívoros (Frost *et al.* 2008). Já *A. graveolens* emitiu predominantemente monoterpenos, compostos estes que apresentam atividade intermediária quando comparados aos sesquiterpenos e voláteis de folhas verdes de ação rápida frente ao estresse abiótico.

Em relação aos fatores abióticos, a oxidação de algum destes compostos, como no caso dos terpenóides encontrados em amostras de *A. graveolens* e *C. floribundus*, pode levar a produção de aerossóis secundários orgânicos (SOA) pela condensação dos produtos formados (Kesselmeier *et al.* 2000) e contribuir para a formação de partículas atmosféricas (Huff Hartz *et al.* 2005). Ainda, por este grupo químico apresentar alta reatividade com o radical hidroxila (OH), pode influenciar na química da atmosfera (Yáñez-Serrano *et al.* 2015). A emissão desses voláteis é altamente regulada pelas condições ambientais de luminosidade e temperatura, conforme salientado em estudos feitos com espécies vegetais da Amazônia, responsáveis pela emissão desses compostos (Claeys *et al.* 2004, Surratt *et al.* 2010, Jardine *et al.* 2011).

Sendo *Astronium graveolens* e *Croton floribundus* grandes emissoras de monoterpenos e sesquiterpenos, suas trocas gasosas com a atmosfera podem contribuir e alterar com potenciais precursores de oxidantes atmosféricos e até mesmo promover a formação de aerossóis secundários. Tendo em vista que essas espécies vegetais são amplamente utilizadas em reflorestamento de áreas degradadas (Lorenzi 2002, Augusto *et al.* 2003, Almeida & Cortines 2008), a tendência é a elevação dos produtos metabólicos como  $\beta$ -Ocimeno, D-Limoneno,  $\beta$ -Mirceno, emitidos constitutivamente, interagirem com a química dessa atmosfera e gerarem subprodutos tão importantes dentro do contexto ambiental, como a formação do ozônio troposférico, que também pode ser um ator na indução desses compostos, e ainda atuarem como formadores de partículas.

#### 4.2 Voláteis induzidos pela exposição ao ozônio

Ao decorrer da exposição ao ozônio, vários monoterpenos, sesquiterpenos e voláteis de folhas verdes foram induzidos, tendo suas taxas de emissão nos tratamentos AF+2dO<sub>3</sub> e AF+4dO<sub>3</sub> superiores às encontradas no controle AF para *Astronium graveolens* e *Croton floribundus*, em que este apresentou diferença apenas no tratamento de dois dias de exposição. Já as emissões de *Piptadenia gonoacantha* não apresentaram valores de diferença entre a exposição ao ozônio e seu controle AF.

A literatura reporta os terpenóides, como monoterpenos e sesquiterpenos, compostos que apresentam grande potencial antioxidante (Holopainen & Gerherzon 2010, Maffei *et al.* 2011) e alta reatividade com o ozônio devido às duplas ligações contidas na cadeia carbônica, que favorecem a ligação com o ozônio, que os decompõem e, posteriormente, leva a formação de compostos oxidados com cadeias carbônicas curtas (Roshchina & Roshchina 2013).

A ação do ozônio na indução dos voláteis foi característica para cada espécie vegetal estudada. Os compostos como  $\beta$ -Mirceno, Benzaldeído, Nonanal,  $\gamma$ -Muroleno, Decanal e Geranil acetona foram os marcadores de *A. Graveolens*. Já para *Croton foribundus*, os compostos marcadores foram Benzaldeído, Trans- $\beta$ -Ionone, Decanal, 3-Hexen-1-ol (Z), Hexanal, Metil salicilato,  $\gamma$ -Elemeno, (-)- $\beta$ -Bourboneno, enquanto nenhum composto foi identificado como marcador da ação do ozônio em *Piptadenia gonoacantha*, uma vez que não houve diferença estatística entre o controle AF e os tratamentos com ozônio. A indução e produção de novos voláteis pode ser uma resposta de defesa das plantas contra o estresse oxidativo causado pelo ozônio.

Os monoterpenos, sesquiterpenos e compostos oxigenados podem atuar na degradação do ozônio, em fase gasosa, por meio de reações químicas, como no estudo descrito por Roshchina & Roshchina (2013), em que o  $\alpha$ -Pineno e  $\beta$ -Pineno interagiram com esse poluente

na superfície da folha de *Malus pumila*. No entanto, além dessa remoção ocorrente fora do limbo foliar, os isoprenóides também podem interagir com o ozônio no mesofilo sob forma gasosa e no apoplasto sob estado líquido (Fares *et al.* 2007), corroborando a presença desses voláteis como respostas de defesa frente ao estresse abiótico nas amostras de *A. graveolens*, em que ambos os compostos foram induzidos.

Pinto e colaboradores (2007), detectaram uma redução do composto  $\alpha$ -Farneseno sob ação do herbívoro *P. xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae), corroborando o que foi obtido para *P. gonoacantha* sob estresse abiótico, em que a taxa de  $\alpha$ -Farneseno apresentou uma tendência de redução ao longo dos dias de exposição, evidenciando uma resposta de defesa similar à herbivoria. Ainda, este mesmo estudo reporta a queda na emissão do volátil de folhas verdes 3-Hexen-1-ol (Z) na presença do ozônio, que em *C. floribundus* reduziu com quatro dias de exposição em relação aos tratamentos AF e AF+2dO<sub>3</sub>.

É bem conhecido que os compostos como  $\beta$ -Ocimeno, e metil salicilato são induzidos por herbívoros (Holopainen & Gerhenzon 2010), sendo que o ozônio também é capaz de induzi-los, como foram encontrados em *C. floribundus* e *A. graveolens*, enquanto  $\beta$ -Ocimeno teve uma tendência de aumento em *P. gonoacantha*., corroborando o que foi obtido para a exposição ao ozônio por Vuorinen e colaboradores (2004).

O metil salicilato é a forma volátil do fitohormônio ácido salicílico (AS), que funciona como sinalizador (Aghdam & Bodbodak 2013) e ativa as repostas de defesa na planta após o ataque por patógenos, além de estar associado a uma resistência induzida denominada resistência sistêmica adquirida (RSA) (Pinto-Zevallos *et al.* 2013). O metil salicilato, em sua forma induzida e volátil, foi observado nos tratamentos AF+2dO<sub>3</sub> em *A. graveolens* e *C. floribundus*, enquanto que na espécie *P. gonoacantha*, este composto não apresentou alteração significativa em relação ao seu controle, sugerindo que a atuação do ozônio a nível celular deve



ser semelhante ao ocorrido com a herbivoria, para *Astronium graveolens* e *Croton floribundus*, em que a RSA é expressa para aumentar a resistência das plantas contra o estresse oxidativo.

Foi observada também a redução de D-Limoneno em algumas espécies vegetais na presença de ozônio (Shaughnessy *et al.* 2001, Pinto *et al.* 2007), no entanto, em *A. graveolens* este mesmo composto foi significativamente induzido, tendo suas taxas cada vez mais elevadas conforme os dias de exposição dos tratamentos. Este resultado pode estar associado a ação do D-Limoneno no sequestro de radicais livres gerados pela produção de ozônio visando combater o estresse, tendo em vista que este composto é um potente agente antioxidante (Peñuelas *et al.* 2005).

*P. gonoacantha* apresentou alta sensibilidade em decorrência da exposição ao ozônio nos estudos feitos por Moura (2013) e, neste trabalho, muitos compostos atuantes nas defesas químicas como o monoterpene Linalol, o sesquiterpene  $\alpha$ -Farneseno e os voláteis de folhas verdes 3-hexen-1-ol e 3-hexen-1-ol, acetato, tiveram suas taxas reduzidas nos tratamentos enriquecidos com ozônio em relação ao controle, reforçando a sensibilidade dessa planta ao poluente quanto à emissão de compostos voláteis.

Na literatura, os voláteis de folhas verdes encontrados nas amostras foram bem estudados. Segundo Li e colaboradores (2014), 3-Hexen-1-ol foi detectado em extratos voláteis de pepino, algodão, tomate, tabaco, repolho e aipo atuando na defesa contra a herbivoria. Este mesmo composto foi encontrado tanto constitutivamente quanto por indução de patógenos por Xin e colaboradores (2014), e foi encontrado tanto nas amostras constitutivas de *C. floribundus* quanto de *P. gonoacantha*. O Hexanal também é um volátil que pode ser expresso induzida ou constitutivamente, além de conferir o aroma e sabor da Nêspera (Velickovic *et al.* 2013). Este, no entanto, só foi emitido a partir de indivíduos constitutivos de *P. gonoacantha*, que quando

exposta ao ozônio apresentou uma redução de seus níveis, já *C. floribundus* e *A. graveolens* apresentaram indução na presença de ozônio.

*C. floribundus* já foi retratado na literatura como espécie tolerante devido à capacidade de acumular elementos tóxicos, apresentar tricomas não-secretoras estrelares, possível ferramenta que confere alta resistência a essa planta contra o ataque por herbívoros e os danos causados por outros agentes (Domingos *et al.* 2015), associado a um sistema antioxidante bem eficiente (Moura *et al.* 2013) e respostas anatômicas, fisiológicas e histológicas (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014). Esta espécie também apresentou pico de emissão para a maioria dos compostos sesquiterpenos e voláteis de folhas verdes no tratamento AF+2dO<sub>3</sub>, o que lhe confere e salienta um caráter de planta resistente (Pelegri *et al.* 2012).

Ainda, a síntese de um novo composto ocorreu para *C. floribundus*, como por exemplo o trans-β-Ionone. Sabe-se que os carotenoides são precursores de voláteis terpenóides que atribuem características como sabor e aroma (Simkin *et al.* 2004). Este mesmo composto, quando presente na atmosfera, pode interagir com o radical hidroxila (OH) e o próprio ozônio (Forester *et al.* 2007), como no caso deste trabalho, o seu agente indutor.

Outros compostos que não são tão atuantes nas interações tróficas, como o Decanal, Benzaldeído, 5-Hepten-2-one, 6-metil- também foram induzidos pela exposição ao ozônio e não apresentaram emissão nos voláteis constitutivos destas mesmas espécies vegetais, reforçando que este poluente é um potente indutor de voláteis. Indivíduos de *A. graveolens* induziram o-Xileno, Benzaldeído, 5-Hepten-2-one, 6-metil, Decanal, enquanto *C. floribundus* também teve a emissão de compostos como Heptanal, Benzaldeído, 5-Hepten-2-one, 6-metil, 1-Hexanol, 2-etil e α-Ionone, de forma induzida.

Muitos estudos apontam grande parte dos compostos obtidos nesse estudo, em interação com o ozônio, como potentes formadores de aerossóis secundários orgânicos (SOA) (Virkkula

*et al.* 1999, Cocker *et al.* 2001, Saathoff *et al.* 2003, VanReken *et al.* 2005, Huff Hartz *et al.* 2005). Outros voláteis como  $\beta$ -Pinenos, Humuleno e Cariofileno (Virkkula *et al.* 1999, VanReken *et al.* 2005, Huff Hartz *et al.* 2005), presentes em *A. graveolens* e *C. floribundus*, além do D-Limoneno e 3-Careno (Virkkula *et al.* 1999, VanReken *et al.* 2005, Huff Hartz *et al.* 2005) emitidos por *A. graveolens* também contribuem para a formação do SOA. Todos esses compostos foram induzidos pela exposição ao ozônio no tratamento AF+2dO<sub>3</sub>.

Tendo em vista as respostas de defesa diferenciadas sob forma de compostos orgânicos voláteis de *A. graveolens*, *C. floribundus* e *P. gonoacantha*, quando submetidas à exposição ao ozônio, essas emissões ao interagirem com a atmosfera apresentam um potencial de respostas frente às mudanças climáticas. *A. graveolens* e *C. floribundus* responderam de forma significativa aos tratamentos com ozônio, emitindo compostos induzidos pela ação desse poluente, já *P. gonocantha* não apresentou uma resposta de defesa sob a perspectiva desses compostos voláteis.

Portanto, o comportamento atmosférico desses compostos pode influenciar a formação de oxidantes como o próprio ozônio, além de favorecer a formação de aerossóis secundários orgânicos. Sendo estas espécies vegetais muito utilizadas em reflorestamento, este estudo sugere que espécies como *Piptadenia gonoacantha*, devem ter maior investimento na restauração de áreas degradadas, uma vez que seus voláteis não influenciam de forma significativa a química da atmosfera. Já *A. graveolens* e *C. floribundus*, por apresentarem respostas voláteis muito marcantes e significativas devem ser repensadas, principalmente em reflorestamentos de áreas urbanas, em que há alto índice de poluentes e oxidantes atmosféricos. Ainda, essas espécies voláteis podem retroalimentar e contribuir para sua formação, salientando que esta é uma sugestão com base nos compostos orgânicos voláteis em interação com a atmosfera.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Os compostos orgânicos voláteis (COV) desempenham papel fundamental nas interações tróficas entre plantas, herbívoros e patógenos como mecanismo de comunicação e de defesa química. Ainda, estão envolvidos nos processos atmosféricos, atuando diretamente na formação de partículas e aerossóis secundários orgânicos, podendo influenciar no estado oxidativo da atmosfera.

Os principais COV encontrados nas três espécies vegetais em estudo apresentam alta relevância ecológica em escala global e regional, além de conferirem potencial indicativo de tolerância destas espécies frente ao estresse de origem abiótica. Os constitutivos foram discriminados em quimiotipos devido à emissão de classes distintas e marcadoras para cada planta com predominância do monoterpene  $\beta$ -Miraceno e o sesquiterpene Farnesano para *Astronium graveolens*, o monoterpene  $\beta$ -ocimeno e o sesquiterpene  $\gamma$ -Elemeno, além do volátil de folhas verdes 3-Hexen-1-ol para *Croton floribundus*, e os voláteis de folhas verdes como o 3-hexen-1-ol e Hexanal, ainda o Metil salicilato para *Piptadenia gonoacantha*.

Ainda, a exposição ao ozônio, para as três espécies vegetais, induziu voláteis que são reportados e reconhecidamente emitidos pela herbivoria, o que lhe confere alta similaridade com o estresse biótico quanto ao mecanismo de ação no meio celular, com produtos do metabolismo, que tanto na forma constitutiva quanto induzida, tem potencial para atuar na formação de aerossóis e na química da atmosfera local.

*A. graveolens* e *C. floribundus* responderam de forma significativa aos tratamentos com ozônio, emitindo compostos induzidos pela ação desse poluente, como por exemplo  $\beta$ -Miraceno, Benzaldeído, Nonanal,  $\gamma$ -Muroleno, Decanal e Geranil acetona para *A. Graveolens*, e os

compostos Benzaldeído, Trans- $\beta$ -Ionone, Decanal, 3-Hexen-1-ol (Z), Hexanal, Metil salicilato,  $\gamma$ -Elemeno e (-)- $\beta$ -Bourboneno para *C. floribundus*.

Portanto, este trabalho, permite sugerir que as investigações referentes aos voláteis orgânicos de plantas em regiões antropizadas, com altos níveis de poluição atmosférica, especialmente em fragmentos da Mata Atlântica, devem ser ampliadas e reforçadas para que o conhecimento sobre os voláteis de espécies nativas em florestas tropicais e em áreas urbanas possa contribuir para os inventários locais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Adams, J. M., Constable, J. V., Guenther, A. B., & Zimmerman, P. 2001. An estimate of natural volatile organic compound emissions from vegetation since the last glacial maximum. *Chemosphere-Global Change Science*, 3(1), 73-91.
- 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.
- Aharoni, A., Jongasma, M. A., & Bouwmeester, H. J. 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in plant science*, 10(12), 594-602.
- Almeida, F. S., & Cortines, E. 2008. Estrutura populacional e distribuição espacial de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) JF Macbr. *Floresta e Ambiente*, 15(2), 18-23.
- Alvim, D. S., Gatti, L. V., Santos, M. H. D., & Yamazaki, A. 2011. Estudos dos compostos orgânicos voláteis precursores de ozônio na cidade de São Paulo. *Eng Sanit Ambient*, 16(2), 189-196.
- Anderson, M. J. 2005. Permutational multivariate analysis of variance. *Department of Statistics, University of Auckland, Auckland*.
- Anderson, M. J., & Walsh, D. C. 2013. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: what null hypothesis are you testing?. *Ecological Monographs*, 83(4), 557-574.
- Apro, P. H., Pereira, V. S., Rosal, C., Souza, L. F. M., Lamano-Ferreira, A. P. N., & Ferreira, M. L. 2012. Avaliação dos parâmetros de crescimento em plantas jovens de *Phaseolus vulgaris* L.(Feijão) expostas à poluição aérea da cidade de São Paulo. *Exacta*, 10(1), 92-100.
- Aquino, C. 2006. *Identificação de compostos Orgânicos Voláteis (COVs) emitidos por florestas na região amazônica. 2006. 89p* (Doctoral dissertation, Dissertação (Mestrado em Física e Meio Ambiente)-Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá).
- Arey J., Winer A., Atkison R., Aschmann S.M., Long W.D., Morrison C.L. 1991. The emission of (z)-3-hexen-1-ol, (z)-3-hexenylacetate and other oxygenated hydrocarbons from agricultural plant species. *Atmospheric Environment*, 25, 1063-1075.
- 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.
- Ashmore M. R. 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell & Environment*, 28 (8), 949-964.
- Atkinson R. & Arey J. 2003. Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmospheric Environment*, 37, 197-219.
- Augusto, D. C. C., Guerrini, I. A., Engel, V. L., & Rousseau, G. X. 2003. Utilização de esgotos domésticos tratados através de um sistema biológico na produção de mudas de *Croton floribundus* Spreng.(capixingui) e *Copaifera langsdorffii* Desf.(copaíba). *Revista Árvore*, 27(3), 335-342.
- Baldwin I. T., Halitschke R., Paschold A., von Dah C.C., Preston C. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking Trees" in the genomics era. *Science*, 311, 811-813.
- Baluška F. & Ninkovic V. 2010. *Plant communication from an ecological perspective*. Berlin: Springer. 252 p.
- Bartram, S., Jux, A., Gleixner, G., & Boland, W. 2006. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, 67(15), 1661-1672.
- Bennett R.N. & Wallsgrave R. M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127, 617-633.
- Bick, Julie Ann; Lange, B. 2003. Markus. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 415, n. 2, p. 146-154.
- 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.

- Block, S., Flamini, G., Brkic, D., Morelli, I., & Quetin-Leclercq, J.** 2006. Analysis of the essential oil from leaves of *Croton zambesicus* Muell. Arg. growing in Benin. *Flavour and fragrance journal*, 21(2), 222-224.
- Bracho-Nunez, A., Knothe, N., Welter, S., Staudt, M., Costa, W. R., Liberato, M. A. R., & Kesselmeier, J.** 2013. Leaf level emissions of volatile organic compounds (VOC) from some Amazonian and Mediterranean plants. *Biogeosciences*, 10(9), 5855-5873.
- Brilli, F., Ciccio, P., Frattoni, M., Prestininzi, M., Spanedda, A., & Loreto, F.** 2009. Constitutive and herbivore-induced monoterpenes emitted by *Populus× euroamericana* leaves are key volatiles that orient *Chrysomela populi* beetles. *Plant, cell & environment*, 32(5), 542-552.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L.** 2015. *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Cardoso-Gustavson P., Bolsoni V. P., Oliveira D. P., Guaratini M. T. G., Aida M. P. M., Marabesi M. A., 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(8), 1-10.
- Carvalho, M. G. D., Cardoso, M. A., Catunda Junior, F. E., & Carvalho, A. G. D.** 2010. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) JF Macbr (pau jacaré). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82(3), 561-567.
- Cassimiro, J. C.** 2015. *Avaliação de índice de proteção à vegetação baseado na dose fitotóxica de ozônio* (Doctoral dissertation, Instituto de Botânica).
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2015. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** 2012. *Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo*. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- Chen, T. K., Wiemer, D. F., & Howard, J. J.** 1984. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. *Naturwissenschaften*, 71(2), 97-98.
- Cheng, A. X., Lou, Y. G., Mao, Y. B., Lu, S., Wang, L. J., & Chen, X. Y.** 2007. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2), 179-186.
- 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.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R.** 2016. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*.
- Ciccio, P.** 1993. Chemistry and analysis of volatile organic compounds in the environment (H.J.T. Bloemen & J. Burn, eds.) Blackie Academic & Professional, London, p. 92-174.
- Clarke, K. R., & Gorley, R. N.** 2006. PRIMER v6: User manual/tutorial. Plymouth: Primer-E.
- 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.
- Close D.C. & McArthur, C.** 2002. Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photo damage not herbivores? *Oikos* 99, 166–172.
- Cocker III, D. R., Clegg, S. L., Flagan, R. C., & Seinfeld, J. H.** 2001. The effect of water on gas-particle partitioning of secondary organic aerosol. Part I:  $\alpha$ -pinene/ozone system. *Atmospheric Environment*, 35(35), 6049-6072.
- Costa, J. G., Rodrigues, F. F., Angélico, E. C., Pereira, C. K., Sousa, E. O., & Caldas, G. F.** 2008. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri*, 583-6.
- De Araújo-Neves, I., & Da Camara, C.** 2012. Volatile constituents of two croton species from caatinga biome of Pernambuco-Brazil. *Rec. Nat. Prod*, 6(2), 161-165.
- De Assis, P. I. L. S.** 2014. *Fluxo estomático de ozônio e sintomas foliares visíveis em Psidium guajava L. 'Paluma'* (Doctoral dissertation, Instituto de Botânica).
- Domingos M., Klumpp A., Klumpp G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic forest in the Cubatão region, SP, Brazil. *Atmospheric Environment*, 50(4), 230-236.
- Domingos, M., Bulbovas, P., Camargo, C. Z., Aguiar-Silva, C., Brandão, S. E., Dafré-Martinelli, M., ... & Alves, E. S.** 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.
- Dos Santos, A. C.** 2014. Compostos orgânicos voláteis e a sua importância no contexto ambiental (monografia) Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei.
- Dudareva N., Pichersky E., Gerhenson J.** 2004. Biochemistry of plant volatile. *Plant Physiology*, 135, 1893-1902.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I.** 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences*, 25(5), 417-440.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I.** 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), 16-32.
- Fares, S., Loreto, F., Kleist, E., & Wildt, J.** 2007. Stomatal uptake and stomatal deposition of ozone in isoprene and monoterpene emitting plants. *Plant Biology*, 9(S 01), e69-e78.
- Fehsenfeld, F., Calvert, J., Fall, R., Goldan, P., Guenther, A. B., Hewitt, C. N., ... & Zimmerman, P.** 1992. Emissions of volatile organic compounds from vegetation and the implications for atmospheric chemistry. *Global Biogeochemical Cycles*, 6(4), 389-430.
- Fernandes, F. F.** 2015. *Marcadores microscópicos para a validação de sintomas em espécie nativa a ser empregada no biomonitoramento do ozônio* (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo).
- Fontana, A., Held, M., Fantaye, C. A., Turlings, T. C., Degenhardt, J., & Gershenzon, J.** 2011. Attractiveness of constitutive and herbivore-induced sesquiterpene blends of maize to the parasitic wasp *Cotesia marginiventris* (Cresson). *Journal of chemical ecology*, 37(6), 582-591.
- Forester, C. D., Ham, J. E., & Wells, J. R.** 2007.  $\beta$ -Ionone reactions with ozone and OH radical: Rate constants and gas-phase products. *Atmospheric Environment*, 41(38), 8758-8771.
- 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 vascular 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 Phytologist*, 180(3), 722-734.
- Geron, C., Guenther, A., Greenberg, J., Loeschner, H. W., Clark, D., & Baker, B.** 2002. Biogenic volatile organic compound emissions from a lowland tropical wet forest in Costa Rica. *Atmospheric Environment*, 36(23), 3793-3802.
- Geron, C., Rasmussen, R., Arnts, R. R., & Guenther, A.** 2000. A review and synthesis of monoterpene speciation from forests in the United States. *Atmospheric Environment*, 34(11), 1761-1781.
- Gouinguéné, S. P., & Turlings, T. C.** 2002. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology*, 129(3), 1296-1307.
- Grote, R., Monson, R. K., & Niinemets, Ü.** 2013. Leaf-level models of constitutive and stress-driven volatile organic compound emissions. In *Biology, controls and models of tree volatile organic compound emissions* (pp. 315-355). Springer Netherlands.
- Guenther, A.** 1997. Seasonal and special variation in natural volatile organic compounds emission. *Ecological Application*, v.11, p. 221-235.
- 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.
- Harley, P., Vasconcellos, P., Vierling, L., Pinheiro, C. C. D. S., Greenberg, J., Guenther, A., ... & Phillips, O.** 2004. Variation in potential for isoprene emissions among Neotropical forest sites. *Global Change Biology*, 10(5), 630-650.
- Hassan, M. N., Zainal, Z., & Ismail, I.** 2015. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant biotechnology journal*, 13(6), 727-739.
- Hernández, V., Mora, F., Araque, M., De Montijo, S., Rojas, L., Meléndez, P., & De Tommasi, N.** 2013. Chemical composition and antibacterial activity of *Astronium graveolens* Jacq essential oil. *Revista latinoamericana de química*, 41(2), 89-94.



- Holopainen, J. K.** 2004. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in plant science*, 9(11), 529-533.
- Holopainen J.K & Gerhenson, J.** 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science*, 15, 1360- 1385.
- Huff Hartz, K. E., Rosenørn, T., Ferchak, S. R., Raymond, T. M., Bilde, M., Donahue, N. M., & Pandis, S. N.** 2005. Cloud condensation nuclei activation of monoterpene and sesquiterpene secondary organic aerosol. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 110(D14).
- Jardine, K., Yañez Serrano, A., Arneith, A., Abrell, L., Jardine, A., Van Haren, J., ...& Kesselmeier, J.** 2011. Within-canopy sesquiterpene ozonolysis in Amazonia. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 116(D19).
- Junior, M. M. C. & Scarpel, R. A.** 2011. Explorando a variabilidade interna do Escalonamento Multidimensional – MDSvarint. XLIII Simpósio Brasileiro de Pesquisa Operacional, Ubatuba-SP. 941-952 p.
- Karl, T., Guenther, A., Yokelson, R. J., Greenberg, J., Potosnak, M., Blake, D. R., & Artaxo, P.** 2007. The tropical forest and fire emissions experiment: Emission, chemistry, and transport of biogenic volatile organic compounds in the lower atmosphere over Amazonia. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 112(D18).
- Kegge W. & Pierik R.** 2009. Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends in Plant Science*, 15, 126-132.
- Kesselmeier J. & Staudt M.** 1999. Biogenic volatile compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecologic. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 33, 23-88.
- Kesselmeier, J., Guenther, A., Hoffmann, T., Piedade, M. T., & Warnke, J.** 2009. Natural volatile organic compound emissions from plants and their roles in oxidant balance and particle formation. *Amazonia and global change*, 183-206.
- Kesselmeier, J., Kuhn, U., Wolf, A., Andreae, M. O., Ciccioli, P., Brancaleoni, E., ... & de Oliva, T.** 2000. Atmospheric volatile organic compounds (VOC) at a remote tropical forest site in central Amazonia. *Atmospheric Environment*, 34(24), 4063-4072.
- Klinger, L. F., Greenburg, J., Guenther, A., Tyndall, G., Zimmerman, P., M'bangui, M., ... & Kenfack, D.** 1998. Patterns in volatile organic compound emissions along a savanna-rainforest gradient in central Africa. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 103(D1), 1443-1454.
- Köllner, T. G., Lenk, C., Schnee, C., Köpke, S., Lindemann, P., Gershenzon, J., & Degenhardt, J.** 2013. Localization of sesquiterpene formation and emission in maize leaves after herbivore damage. *BMC plant biology*, 13(1), 1.
- Krupa S.V. & Manning W.J.** 1998. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution*, 50, 101-137.
- Kunz, A., Freire, R. S., Rohwedder, J. J., Duran, N., Mansilla, H., & Rodriguez, J.** 1999. Assembly and optimization of a system for ozone utilization in laboratory scale. *Química Nova*, 22(3), 425-428.
- Laothawornkitkul, J., Taylor, J. E., Paul, N. D., & Hewitt, C. N.** 2009. Biogenic volatile organic compounds in the Earth system. *New Phytologist*, 183(1), 27-51.
- Leite, I. T. D., & Takaki, M.** 1994. Analysis of seed-germination in Piptadenia-Gonoacantha (Mart) MACBR (Leguminosae Mimosoideae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 587-595.
- 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*, 542, 737-740.
- Leme, Claudia Luizon Dias.** 1994. Anatomia Comparada do lenho do caule, raiz e ramo de algumas espécies de Euphorbiaceae da Mata Atlântica. 73f. Tese (Grau de Mestrado) - Instituto de Biociências - USP, São Paulo.
- Lerdau, M., Guenther, A., & Monson, R.** 1997. Plant production and emission of volatile organic compounds. *Bioscience*, 47(6), 373-383.
- Lima, Elizabeth de Souza.** 2007. Capacidade de Tradescantia pallida (Rose) DR Hunt cv Purpurea Boom para biomonitoramento do potencial clastogênico de ozônio. Tese (Dissertação de mestrado) - Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.

- Litvak, M. E., & Monson, R. K.** 1998. Patterns of induced and constitutive monoterpene production in conifer needles in relation to insect herbivory. *Oecologia*, 114(4), 531-540.
- Lorenzi H.** 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. v.1, 368 p.
- Loreto, F., & Schnitzler, J. P.** 2010. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in plant science*. 15(3), 154-166.
- Maffei, M. E., Gertsch, J., & Appendino, G.** 2011. Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural product reports*, 28(8), 1359-1380.
- Marques, L. S., Paiva, H. D., Neves, J. C. L., Gomes, J. M., & Souza, P. D.** 2009. Crescimento de mudas de jacaré (*Piptadenia gonoacantha* JF Macbr.) em diferentes tipos de solos e fontes e doses de nitrogênio. *Revista Árvore*, 33(1), 81-92.
- Martins, L. D.** 2006. *Sensibilidade da formação do ozônio troposférico às emissões veiculares na Região Metropolitana de São Paulo* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Moura, B.B.** 2013. Análise estruturais e ultraestruturais em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Moura B.B, Souza S.R. Alves E.S.** 2014. Response of Brazilian native trees to acute ozone dose. *Environmental Science Pollution Research* 21(6), 4220-4227.
- Niinemets U., Loreto F, Reischsten M.** 2004. Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trens in Plant Science*, 9, 180-186.
- Oliveira, A. F. D.** 2014. Relação entre poluição do ar e internações de idosos por doenças cardiovasculares em Cubatão e São Paulo entre 2000 e 2012.
- Oliveira, A. C., Leal-Cardoso, J. H., Santos, C. F., Morais, S. M., & Coelho-de-Souza, A. N.** 2001. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(11), 1471-1474.
- Orendovici T., Skelly J.M., Ferdinand J.A., Savage J.E., Sanz M.J., Smith G.C.** 2003. Response of native plants of northeastern United States and southern Spain to ozone exposures; determining exposure/response relationships. *Enviromental Pollution*, 125, 31-40.
- Otter, L., Guenther, A., Wiedinmyer, C., Fleming, G., Harley, P., & Greenberg, J.** 2003. Spatial and temporal variations in biogenic volatile organic compound emissions for Africa south of the equator. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 108(D13).
- Padhy, P. K., & Varshney, C. K.** 2005. Emission of volatile organic compounds (VOC) from tropical plant species in India. *Chemosphere*, 59(11), 1643-1653.
- Pellegrini E., Cioni P.L, 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 (7), 924-932.
- Peñuelas, J., Llusà, J., Asensio, D., & Munné-Bosch, S.** 2005. Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions. *Plant, Cell & Environment*, 28(3), 278-286.
- Pichersky, E., & Gershenzon, J.** 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 237-243.
- Pinto, V. C.** 2009. *Ecologia e qualidade ecológica de comunidades de macroinvertebrados bentônicos em zonas costeiras e estuarinas: abordagem comparativa* (Doctoral dissertation).
- 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-Zevallos, D. M., Martins, C. B., Pellegrino, A. C., & Zarbin, P. H.** 2013. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Quim Nova*, 36, 1395-1405.
- Riffel, A., & da Costa, J. G.** 2016. Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura. *Embrapa Tabuleiros Costeiros-Docmentos (Infoteca-E)*.
- Rodriguez-Burbano, D., Quijano-Celis, C. E., & Pino, J. A.** 2010. Composition of the essential oil from leaves of *Astronium graveolens* Jacq grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(6), 488-489.
- 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.

- Roshchina, V. V., & Roshchina, V. D.** 2013. *Ozone and plant cell*. Springer Science & Business Media.
- Pinto, D. M., Blande, J. D., Nykänen, R., Dong, W. X., Nerg, A. M., & Holopainen, J. K.** 2007. Ozone degrades common herbivore-induced plant volatiles: does this affect herbivore prey location by predators and parasitoids?. *Journal of chemical ecology*, 33(4), 683-694.
- Prado, P. I., Lewinsohn, T. M., Carmo, R. D., & Hogan, D. J.** 2002. Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciências ambientais. *Ambiente & sociedade*, 10, 1-15.
- Saathoff, H., Naumann, K. H., Schnaiter, M., Schöck, W., Möhler, O., Schurath, U., ... & Baltensperger, U.** 2003. Coating of soot and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> particles by ozonolysis products of  $\alpha$ -pinene. *Journal of Aerosol Science*, 34(10), 1297-1321.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F., & Negri, G.** 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1), 11-33.
- Schirmer, W. N.** 2004. Amostragem, análise e proposta de tratamento de compostos orgânicos voláteis e odorantes na estação de tratamento de efluentes de uma refinaria de petróleo.
- Schirmer, W. N., & Quadros, M. E.** 2010. Compostos orgânicos voláteis biogênicos emitidos a partir de vegetação e seu papel no ozônio troposférico urbano. *REVSBAU, Piracicaba-SP*, 5(1), 25-42.
- Seinfeld, John H.; Pandis, Spyros N.** 2006. Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change. John Wiley & Sons.
- Shaughnessy, R. J., McDaniels, T. J., & Weschler, C. J.** 2001. Indoor chemistry: ozone and volatile organic compounds found in tobacco smoke. *Environmental science & technology*, 35(13), 2758-2764.
- Silva, R. M. G., Saraiva, T. S., Silva, R. B., Gonçalves, L. A., & Silva, L. P.** 2010. Potencial alelopático de extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* e *Astronium graveolens* = Allelopathy potential of etanolic extract of *Anadenanthera macrocarpa* and *Astronium graveolens*. *Bioscience Journal*, 26(4).
- Silveira, Fernanda Schmidt.** 2007. Efeito da exposição ao ozônio em espécies nativas: resultados preliminares. In: Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: UFRGS.
- Simkin, A. J., Underwood, B. A., Auldrige, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., ... & Klee, H. J.** 2004. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiology*, 136(3), 3504-3514.
- Souza, V., & Lorenzi, H.** 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.
- 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., Vasconcellos P.C., Mantovani W., Carvalho L.** 2002. Emissão por folhas de *Ficus benjamina* L. (Moraceae) de compostos orgânicos voláteis oxigenados. *Revista Brasileira de Botânica*, 25, 413-418.
- Surratt, J. D., Chan, A. W., Eddingsaas, N. C., Chan, M., Loza, C. L., Kwan, A. J., ... & Seinfeld, J. H.** 2010. Reactive intermediates revealed in secondary organic aerosol formation from isoprene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 6640-6645.
- Tonial, Rafaela Pestana Leques.** 2011. Influência da estrutura filogenética das comunidades sobre respostas das plantas à poluição por ozônio. 27 f. Trabalho de conclusão de Curso (Ciências Biológicas: Ênfase Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto Biociências.
- VanReken, T. M., Ng, N. L., Flagan, R. C., & Seinfeld, J. H.** 2005. Cloud condensation nucleus activation properties of biogenic secondary organic aerosol. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 110(D7).
- Virkkula, A., Van Dingenen, R., Raes, F., & Hjorth, J.** 1999. Hygroscopic properties of aerosol formed by oxidation of limonene,  $\alpha$ -pinene, and  $\beta$ -pinene. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 104(D3), 3569-3579.
- Wennberg P.O. & Dabdub D.** 2008. Rethinking ozone production. *Science*, 1624-1625.

- Yáñez-Serrano, A. M., Nölscher, A. C., Williams, J., Wolff, S., Alves, E., Martins, G. A., ... & Kesselmeier, J.** 2015. Diel and seasonal changes of biogenic volatile organic compounds within and above an Amazonian rainforest. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15(6), 3359-3378.
- 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.
- Zar, J. H.** 1999. *Biostatistical analysis*. Pearson Education India. 947 p.
- Zirolto, B. D.** 2007. Estrutura genética em diferentes populações de *Cróton floribundus* Spreng. de diferentes fragmentos de mata. 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 50 p.