

Sintomas foliares visíveis induzidos por ozônio em vegetação urbana do município de Guarulhos, SP

Beatriz Barbosa de Souza^[1], Suelen Santini de Oliveira^[2], Patricia Bulbovas^[3]

[1] b.bsouza@hotmail.com. [2] santinisuelen09@gmail.com. [3] pbulbovas@hotmail.com. Universidade Guarulhos.

RESUMO

O ozônio (O_3) é um poluente que tem alto potencial oxidante e pode induzir sintomas foliares visíveis em espécies vegetais. Esses sintomas são de fácil identificação e quantificação e são utilizados em programas de monitoramento de risco à vegetação induzido pelo O_3 . O objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade da vegetação ao O_3 presente nos Campi Centro e Dutra da UNG, no Bosque Maia e na vegetação presente no Paço Municipal de Guarulhos, por meio do levantamento de sintomas foliares visíveis em diferentes espécies. Esses locais foram visitados e percorridos em sua totalidade no início da primavera de 2018 e no início do outono de 2019. As plantas ali presentes foram avaliadas quanto à presença de sintomas foliares visíveis. Os sintomas encontrados foram identificados seguindo os procedimentos encontrados no Manual do ICP-Forest. As plantas que apresentaram sintomas foram identificadas em nível de espécie, fotografadas e amostras de suas folhas foram examinadas por meio de microscopia óptica, a fim de excluir a possibilidade de o sintoma ser uma imitação daqueles sintomas causados por outros fatores bióticos ou abióticos. Os resultados obtidos nos dois períodos mostraram que as concentrações de ozônio medidas no município de Guarulhos no período estudado foram suficientes para causar injúrias foliares visíveis nas plantas de goiabeira e amoreira (as medidas da concentração de O_3 variaram entre 10 $mg.m^{-3}$ e 69 $mg.m^{-3}$ nos locais de estudo). O número de indivíduos de goiabeira que apresentaram sintomas foliares visíveis no fim do verão/início do outono, aumentou em relação ao início da primavera no Bosque Maia e Paço Municipal, possivelmente por ficarem mais tempo expostos ao poluente. Somente no fim do verão/início do outono foram observados indivíduos de amoreira com sintomas foliares visíveis. Esse foi o primeiro registro de sintomas foliares visíveis causados por ozônio em amoreira feito no Brasil.

Palavras-chave: Poluição atmosférica. Biomonitoramento. Qualidade do ar.

ABSTRACT

Ozone (O_3) is a pollutant with high oxidative potential and can induce visible foliar symptoms in plants. The injuries are easy to identify and quantify, and are used in O_3 risk of vegetation monitoring programs. The study aim was to assess the plants susceptibility to atmospheric O_3 that occur in the region of Guarulhos University (UNG) Campi Centro and Dutra, Bosque Maia, and Guarulhos Municipal Palace, through the observation of visible foliar symptoms in different species. These places were visited and crossed in totality at the beginning of spring in 2018, and the beginning of autumn in 2019. The plants present in the study sites were evaluated regarding the presence of visible foliar symptoms. The symptoms were identified as caused by O_3 according to ICP-Forest guide recommendations. Plants that showed symptoms were identified until the specie level, photographed and leaves samples were examined through optic microscopy in order to exclude the possibility of the symptoms be a mimicry of the symptoms caused by other biotic and abiotic events. The results obtained within both periods showed that O_3 concentrations measured in Guarulhos were enough to induce visible foliar symptoms in guava and mulberry plants (O_3 concentrations measured varied between 10 $mg.m^{-3}$ e 69 $mg.m^{-3}$ in the sites of study). The number of guava plants that showed visible foliar symptoms was higher at the end of summer/beginning of autumn than in spring, probably because they were exposed to O_3 for longer periods. Visible foliar symptoms were observed in mulberry only at the end of summer/beginning of autumn. It was the first record of visible foliar symptoms induced by O_3 in mulberry in Brazil.

Keywords: Atmospheric pollution. Biomonitoring. Air quality.

1 Introdução

Na atualidade, há uma preocupação mundial em relação ao aumento da poluição atmosférica e seus efeitos sobre florestas, culturas agrícolas e áreas urbanas. De fato, nas últimas décadas, não somente a concentração dos poluentes tem aumentado como também o perfil de contaminação atmosférica tem mudado, principalmente nos países considerados em desenvolvimento. Isso é consequência de um rápido e desordenado crescimento econômico, que leva ao crescimento de cidades, indústrias e frota de veículos automotores, e também a uma crescente demanda de energia (EMBERSON; KUYLENSTIERNA; ASHMORE, 2003; BULBOVAS *et al.*, 2014). Entre os poluentes, atenção especial tem sido dada ao ozônio (O_3).

O O_3 é um gás encontrado naturalmente tanto na troposfera quanto na estratosfera. Na troposfera, o O_3 é formado a partir de reações fotoquímicas e o aumento de suas concentrações está relacionado à emissão de poluentes primários, principalmente aqueles gerados por atividades humanas, como o metano (CH_4), o monóxido de carbono (CO), os óxidos de nitrogênio (NO_x) e os compostos orgânicos voláteis (COVs). Na estratosfera, o O_3 tem o papel de filtrar os raios ultravioleta, enquanto na troposfera ele exerce efeitos nocivos sobre os organismos vivos devido ao seu forte potencial oxidante (ASSIS; MORAES; NAKAZATO, 2018; BORTOLIN *et al.*, 2014).

O O_3 entra na folha das plantas através dos estômatos durante as trocas gasosas e reage com diferentes moléculas, formando espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e radicais hidroxila (OH^{\cdot}), podendo causar estresse oxidativo. Nas células vegetais, as EROs são neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante. No entanto, quando o estresse oxidativo supera a capacidade de defesa desse sistema, o O_3 induz danos em diferentes níveis de organização (BULBOVAS *et al.*, 2014; GILL; TUTEJA, 2010). Em nível bioquímico, podem ser observados danos aos processos de fotossíntese e de respiração (CAILLERET *et al.*, 2018). Em nível celular, ocorre peroxidação dos lipídios da membrana (BRANDÃO *et al.*, 2017). As folhas podem apresentar sintomas foliares visíveis (ASSIS; MORAES; NAKAZATO, 2018) e o organismo pode apresentar redução do crescimento e do acúmulo de biomassa (CAILLERET *et al.*, 2018). Considerando que as espécies apresentam respostas diversificadas, também podem ocorrer mudanças na composição e

estrutura das comunidades vegetais e ecossistemas (KARNOSKY *et al.*, 2003; SHRINER; KARNOSKY, 2003).

A suscetibilidade das plantas ao O_3 é específica para cada espécie. Ela também é influenciada pelas condições ambientais como suprimento de água, temperatura da folha e condições de luz, as quais promovem a abertura estomática e, conseqüentemente, a entrada de O_3 na planta (BUSSOTTI, 2008; CALATAYUD *et al.*, 2011; PINA; MORAES, 2007).

Espécies que, ao serem expostas a um poluente, apresentam danos em nível foliar, como os sintomas foliares visíveis, são classificadas como sensíveis (DE TEMMERMAN *et al.*, 2004). Há sintomas que indicam a presença do O_3 por meio de características específicas. Tais sintomas podem ser cloroses (manchas amareladas devido à quebra da clorofila), bronzeamento (manchas vermelho-marrons devido ao acúmulo de fenilpropanóides) e necroses (causadas por morte celular) (FERRETI *et al.*, 2007a, 2007b; KLUMPP *et al.*, 2006). De acordo com Schaub e Calatayud (2013), esses são os únicos indicadores específicos de resposta aos efeitos induzidos pelo O_3 facilmente detectáveis em espécies de plantas. Ao contrário de testes laboratoriais dispendiosos e demorados, os sintomas foliares visíveis podem ser avaliados em campo e requerem apenas treinamento em sua identificação e quantificação. Por isso, eles são adotados em programas de monitoramento de risco à vegetação induzido pelo O_3 . (FERRETI *et al.* 2007a, 2007b; KHAVANINZADEH *et al.*, 2014; KLUMPP *et al.*, 2006).

O município de Guarulhos é populoso e apresenta grande número de indústrias e tráfego de veículos automotores. Tudo isso exerce influência considerável na emissão dos poluentes precursores de O_3 para a atmosfera. Relatórios anuais da qualidade do ar da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) mostram que a cidade de Guarulhos apresenta concentrações significativas de O_3 . No ano de 2018 foram observadas médias para o período de 24h variando entre 31 mg/m^3 e 42 mg/m^3 , e valores máximos horários variando entre 148 mg/m^3 e 268 mg/m^3 (CETESB, 2019). No entanto, nada se sabe a respeito dos efeitos desse poluente sobre a vegetação das áreas urbanas do município. A avaliação dos sintomas foliares visíveis é um indicativo de estresse por O_3 . Embora não seja uma medida biologicamente tão significativa para compreender os efeitos desse

poluente sobre o crescimento e a produtividade das plantas, sua presença e extensão podem ser usadas como um substituto das avaliações dos danos biológicos às plantas que demandam testes e análises em laboratório (FENG *et al.*, 2014; HAYES *et al.*, 2007), além de ser uma técnica simples e barata. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a suscetibilidade da vegetação ao O₃ presente nos *Campi* Centro e Dutra da UNG, no Bosque Maia e na vegetação presente no Paço Municipal de Guarulhos, através do levantamento de sintomas foliares visíveis em diferentes espécies vegetais.

2 Referencial teórico

A literatura apresenta muitos trabalhos realizados em diferentes locais em que os sintomas foliares visíveis são utilizados como ferramenta para avaliar os efeitos tóxicos das concentrações de O₃ sobre a vegetação de áreas urbanas, rurais e florestais. Como exemplos de trabalhos que vêm sendo desenvolvidos na Europa, existem aqueles gerados pelos Programas de Cooperação Internacional da UE/ECE, como o da Avaliação e Monitoramento dos Efeitos da Poluição Atmosférica sobre Florestas (ICP - Forests) e sobre a Vegetação Natural e Culturas Agrícolas (ICP - Vegetation) (FENG *et al.*, 2014). Os resultados desses programas documentaram injúrias foliares visíveis em plantas de floresta (FERRETI *et al.*, 2007b; GOTTARDINI *et al.*, 2014, 2017; VLASÁKOVÁ-MATOUŠKOVÁ; IVA H NOVÁ, 2015) e de culturas agrícolas e vegetação seminatural (DÖRING *et al.*, 2014; DRAPIKOWSKA *et al.*, 2017; MILLS *et al.*, 2010). Na América do Norte, a avaliação dos sintomas foliares visíveis também foi incluída nos programas de monitoramento de Saúde Florestal. Sintomas causados por O₃ são frequentemente observados em várias plantas bioindicadoras de florestas da Califórnia (CAMPBELL; WANEK; COULSTON, 2007). Algumas das espécies avaliadas nos programas e nos trabalhos citados que apresentaram sintomas foliares visíveis podem ser encontradas no Brasil, como *Morus nigra* (amoreira) (VANDERHEYDEN *et al.*, 2001).

Além dos resultados desses programas de larga escala, há outros estudos que têm focado nos sintomas foliares visíveis e na identificação de espécies bioindicadoras em diferentes partes do mundo, como por exemplo, Feng *et al.*, 2014 e Fumagalli *et al.*, 2001.

Muito pouco se sabe sobre os efeitos do O₃ em espécies tropicais, cujas concentrações atmosféricas podem alcançar valores médios horários de até 270 mg/

m³ em regiões metropolitanas, como a de São Paulo (CETESB, 2019). Trata-se de uma questão urgente, uma vez que as regiões tropicais apresentam a maior diversidade de plantas do planeta e a concentração desse poluente nos trópicos é equivalente, ou mesmo maior que os níveis observados em países desenvolvidos (EMBERSON; KUYLENSTIERNA; ASHMORE, 2003).

No Brasil, os estudos sobre sintomas foliares visíveis causados por O₃ são bem escassos. Entre os trabalhos com espécies arbóreas nativas, destacam-se os realizados com *Psidium guajava* (FURLAN *et al.*, 2007; PINA; MORAES, 2007), *Tibouchina pulchra* (FURLAN *et al.*, 2008) e com as espécies de Floresta Estacional Semidecidual presentes na região Metropolitana de Campinas (MOURA *et al.*, 2014, 2018). Entre os estudos com plantas de interesse agrícola têm os realizados com *Abelmoschus esculentus* (quiabo) (BULBOVAS *et al.*, 2008), *Phaseolus vulgaris* (feijão) (CAREGNATO *et al.*, 2013) e cultivares de *Glycine max* plantadas na região Amazônica (soja) (BULBOVAS *et al.*, 2014). Ainda, estudos com plantas nativas da Mata Atlântica apresentaram danos visíveis nas espécies *Piptadenia gonoacantha* e *Astronium graveolens* (MOURA *et al.*, 2018).

Há também os estudos com plantas bioindicadoras, como a *Nicotina tabacum* (tabaco) e a *Psidium guajava* (goiabeira), onde o sintoma foliar visível indica concentrações fitotóxicas de O₃, detecta níveis de poluição crônica e avalia riscos potenciais para as espécies locais (ASSIS; MORAES; NAKAZATO, 2018; KLUMPP; KLUMPP; DOMINGOS, 1994; NAKAZATO *et al.*, 2018; PINA; MORAES, 2010; SANT'ANNA *et al.*, 2008).

3 Método da pesquisa

3.1 Área de estudo

O município de Guarulhos está localizado na face norte da Região Metropolitana de São Paulo – RMSP e possui 318,675 km² de extensão territorial. Guarulhos é a segunda cidade mais populosa do estado de São Paulo, com cerca de 1.324.781 habitantes (IBGE, 2015). Sua localização geográfica é privilegiada. É servida pelas rodovias BR-116 - Rodovia Presidente Dutra (Eixo São Paulo/Rio de Janeiro); BR-381 - Rodovia Fernão Dias (Eixo São Paulo/Belo Horizonte); SP-70 – Rodovia Ayrton Senna (Eixo São Paulo/Taubaté),

além de estradas pavimentadas vicinais interligando o município com a SP-65 - Rodovia D. Pedro I. Sedia o maior aeroporto internacional do país, o Aeroporto Internacional "Governador André Franco Montoro" (Cumbica), e seu complexo aduaneiro. O desenvolvimento industrial e viário é fator gerador de empregos que atrai as pessoas e provoca a expansão urbana (ANDRADE *et al.*, 2008). No entanto, esse desenvolvimento também é causador de diversos problemas ambientais. No ano de 2017, a qualidade do ar foi classificada como ruim por vários períodos e a concentração de O₃ ultrapassou vinte e uma vezes o limite de qualidade estabelecido pela CETESB (CETESB, 2017).

A região apresenta domínio climático mesotérmico brando úmido, apresentando de um a dois meses secos. A temperatura média anual está entre 18°C e 19°C, sendo a média do mês mais frio inferior a 15°C, e a média dos meses de verão variando entre 23°C e 24°C. Apresenta inverno seco e verão chuvoso, com influência de frentes frias da Antártica e de umidade proveniente do Oceano Atlântico. O índice pluviométrico está entre 1.250 mm e 1.500 mm por ano (ANDRADE *et al.*, 2008).

De acordo com o mapeamento de remanescentes florestais dos municípios realizado pelo Instituto de Pesquisas Espaciais e a Fundação SOS Mata Atlântica, divulgado em 2015, Guarulhos possui 100% do seu território originalmente inserido em área de Mata Atlântica com vegetação predominante característica de Floresta Ombrófila Densa, sendo que, atualmente, restam apenas 27% desse tipo de vegetação na região.

Para o presente estudo, foram selecionadas quatro áreas no município de Guarulhos para serem estudadas quanto à presença de sintomas foliares visíveis na vegetação:

- UNG *Campi* Centro e Dutra – nesses locais há plantas de goiabeira que apresentaram sintomas foliares visíveis causados por O₃ no ano de 2017, sinalizando para a presença desse poluente em concentração fitotóxica.

- Bosque Maia – o Bosque Maia foi escolhido por ser o maior parque urbano do município (170.000 m²). Ele é composto por campo aberto com árvores isoladas, ocasionalmente plantadas nas áreas destinadas à recreação pública e possui pequeno fragmento florestal de mata nativa.

- Paço Municipal – esse local possui edificações públicas e muitas espécies arbóreas ornamentais

espalhadas numa área de 30.000 m². Ele foi escolhido porque, além de possuir muitas árvores também possui uma estação de monitoramento da qualidade do ar da CETESB. Os dados da vegetação obtidos neste local, em conjunto com os dados das concentrações de O₃ atmosférico, auxiliam na interpretação dos resultados.

3.2 Avaliação dos sintomas foliares visíveis

As visitas aos locais para observação de sintomas foliares visíveis ocorreram em dois momentos: no início da primavera (12 e 20/9/2018) e no início do outono (27/3 e 17/4/2019). Sabe-se que nesse período, devido às condições climáticas favoráveis, há aumento da concentração de O₃ na atmosfera (CETESB, 2017). Além disso, as plantas crescem mais por causa do aumento da temperatura e umidade, ou seja, elas estão realizando mais fotossíntese e, conseqüentemente, estão em maior contato com a atmosfera, favorecendo a entrada de O₃ na folha.

Os locais de estudo UNG *Campi* Centro e Dutra, e Paço Municipal foram percorridos em sua totalidade e as plantas presentes neles foram avaliadas quanto à presença de sintomas foliares visíveis. Plantas herbáceas e arbustivas tiveram todas as suas folhas observadas. Nas plantas arbóreas foram observados seis ramos expostos ao sol. Eles tinham altura variada, dependendo do tamanho e da idade da árvore, e foram coletados com tesoura de alta poda, como recomendado por Bussotti *et al.* (2003). No Bosque Maia, que possui área maior, a avaliação dos sintomas foliares visíveis foi realizada de acordo com o modelo proposto pelo Manual do ICP-Forest (SCHAUB *et al.*, 2010). Esse modelo propõe que seja observada a vegetação presente na borda da face norte do parque, onde incide maior quantidade de radiação solar e, conseqüentemente, onde há maior interação da vegetação com a atmosfera. Assim, os mesmos procedimentos adotados para a avaliação dos sintomas foliares visíveis em plantas herbáceas e arbóreas, foram utilizados, nos outros locais de estudo, para avaliar a vegetação presente na borda da face norte do Bosque Maia.

O sintoma foliar visível causado por O₃ foi identificado seguindo-se os procedimentos para diagnóstico de sintomas de O₃ do Manual do ICP-Forest (SCHAUB *et al.*, 2010). Fotos de sintomas de O₃ em plantas, preferencialmente aquelas de espécies confirmadas experimentalmente, foram usadas como referência. Amostras de folhas que apresentaram os

sintomas típicos causados por O_3 foram examinadas por microscopia óptica (Olympus® BX51, aumento de cem vezes) a fim de excluir a possibilidade de o sintoma ser uma imitação de sintomas causados por outros fatores bióticos ou abióticos (VOLLENWEIDER; OTTIGER; GÜNTHARDT-GOERG, 2003). As plantas cujos sintomas foram confirmados como causados por O_3 foram identificadas em nível de espécies e fotografadas.

3.3 Caracterização do ambiente

Para a caracterização do ambiente durante o período de estudo foram obtidos dados meteorológicos e das concentrações de O_3 da estação de monitoramento da CETESB, situada no Paço Municipal (<https://cetesb.sp.gov.br/ar/dados-horarios>). Com os dados meteorológicos, foram determinadas as médias e os valores horários mínimos e máximos de temperatura, umidade relativa e radiação. As concentrações horárias de O_3 foram usadas para calcular as médias de 24 horas (O_3 24h), os valores horários máximos, as concentrações médias durante o período de luz solar (O_3 10h), a exposição acumulada de O_3 para a estação (EAO estação), a exposição acumulada de O_3 a cada cinco dias (EAO 5 dias) e o número de ultrapassagens do valor permitido pela legislação. Os valores médios de 24h e 10h obtidos para cada estação foram comparados estatisticamente por análise de variância não paramétrica, seguida por testes de comparações múltiplas (teste Dunn), utilizando-se o programa Sigma Plot. Além disso, em cada área de estudo foram expostos amostradores passivos de O_3 .

Os amostradores passivos foram expostos segundo metodologia descrita por Ogawa (2001). O amostrador consistiu em um corpo de teflon. Em ambas as extremidades desse corpo havia uma membrana de aço inox, um filtro de fibra de vidro (Whatman® GF) e outra membrana de aço inox. As extremidades eram tapadas com tampa de teflon vazada, para a entrada do ar. Os amostradores foram fixados em um dispositivo de plástico, cuja parte superior protegia da chuva e a inferior era aberta, permitindo a circulação do ar. Em cada local de estudo, um dispositivo, com dois amostradores, foi fixado em poste de iluminação ou alambrado, a 1,5 m de altura do solo. Para cada lote de amostradores levados ao campo, um par deles era

deixado em um frasco escuro e fechado no laboratório, utilizado como branco. Os filtros de fibra de vidro dos amostradores foram impregnados com solução aquosa contendo metanol, glicerol, nitrito de sódio e carbonato de potássio. Após o período de exposição (quinze dias), foi feita a extração dos filtros através de agitação em água deionizada. Os extratos obtidos foram filtrados e analisados por meio de cromatografia iônica. Os íons NO_3^- e NO_2^- foram determinados por cromatografia líquida de alta performance, com detector de íons, em equipamento METROHM (ALLEN *et al.*, 2010). Para a determinação dos íons foi usada a coluna aniônica Metrosep A-Supp 5 (250/4 mm). Como eluente foi utilizada a solução de Na_2CO_3 3,2 mmol/L/ $NaHCO_3$ 1,0 mmol/L, com fluxo de 0,7 ml/min, volume de amostra injetado de 20 μ L e sistema de supressão. As concentrações dos íons estudados foram determinadas por meio de curvas de calibração na faixa de 0,25 μ mol/L a 10 μ mol/L.

A exposição teve início na primavera (setembro de 2018), seguiu pelo verão e encerrou-se no início do outono (abril de 2019). Os valores médios de cada exposição, obtidos para cada local de estudo, foram comparados estatisticamente. A partir do verão não foi mais possível obter dados do local UNG *Campus* Dutra. Assim, os valores de ozônio obtidos nesse e nos outros locais de estudo, durante a primavera, foram comparados estatisticamente por meio de análise de variância não paramétrica. Os dados determinados nos outros locais foram avaliados por análise de variância com dois fatores (locais e estações), seguido por comparações múltiplas (teste Holm-Sidak). Para todas essas análises foi utilizado o programa Sigma Plot.

4 Resultados da pesquisa

Os dados meteorológicos permitiram compreender as condições ambientais às quais as plantas dos locais de estudo estavam expostas (Tabela 1). As médias de temperatura e umidade relativas, e seus respectivos valores máximos, mostram que o clima estava propício para o crescimento das plantas e, conseqüentemente, para uma maior abertura estomática e entrada de poluentes. Nessas condições, é favorável, também, a formação de O_3 , uma vez que temperatura elevada indica alta incidência de luz, condição importante para a formação desse poluente (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias de temperatura (T, °C), umidade relativa (UR, %) e radiação (RAD, W/m²), e seus respectivos valores horários máximos e mínimos (entre parêntesis), durante a primavera/2018, verão/2019 e início do outono/2019 (27/3-25/4/2019)

	Primavera	Verão	Outono
T	23 (34–12)	23 (33–17)	22 (29–18)
UR	72 (96–30)	84 (100–20)	79 (100–40)
RAD	205 (1115–0)	194 (1113–0)	144 (964–0)

Fonte: Cetesb (www.cetesb.sp.org.br).

As médias horárias de O₃ para os períodos de 24h e 10h foram significativamente maiores na primavera. O maior valor de concentração máxima horária foi observado no verão, com exposição acumulada de O₃ (EAO) na primavera (Tabela 2). A EAO é um índice de qualidade do ar relativo à exposição acumulada de O₃ acima de 78,4 µg/m³. Chega-se a este índice, para um determinado período, por meio da soma de todas as concentrações horárias de O₃ acima de 78,4 ppb, após a subtração dessa concentração limite. É uma abordagem bastante usada na Europa e indica níveis críticos de O₃ que podem gerar perda de produtividade agrícola (FUHRER; SKARBY; ASHMORE, 1997; UNECE, 2000/2001) e danos à vegetação. A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica a EAO de 6000 µg/m³.h de O₃, acumulados durante o período de três meses, como valor de referência para proteção da produtividade agrícola (VRPP) e 400 µg/m³.h acumulados durante o período de cinco dias, como valor de referência para o aparecimento de injúrias visíveis em plantas sensíveis (CETESB, 2009). No período de estudo, o valor de EAO para as estações de primavera e verão estiveram acima do valor de referência estabelecido pela OMS (Tabela 2). Além disso, durante a primavera, foi observado, por seis vezes, valores de EAO acima de 400 µg/m³.h acumulados para um período de cinco dias, sendo que o primeiro deles foi observado no início da estação. Altos valores de EAO ocorrem devido à alta concentração de O₃, às altas temperaturas e à radiação global (RESENDE; FURLAN, 2003).

O número de médias horárias que ultrapassaram o valor permitido para a qualidade do ar, média de até 140 µg/m³ para um período de 8h (CETESB, 2019), foi maior no verão (Tabela 2).

Tabela 2 – Média das concentrações de O₃ para o período de 24 horas (O₃ 24h, µg/m³), média das concentrações de O₃ para o período de 10 horas (O₃ 10h: 7h00 às 17h00, µg/m³), concentração máxima horária de O₃, valor da exposição acumulada de O₃ (EAO estação, µg/m³/h), número de vezes que a EAO ultrapassou o valor de 400 µg/m³/h no período de cinco dias (EAO 5 dias), e número de ultrapassagens do valor permitido pela legislação, durante a primavera/2018, verão/2019 e início do outono/2019 (27/3-25/4/2019). Letras na mesma linha comparam médias entre as estações (p<0,05)

	Primavera	Verão	Outono
Média 24h	42,19 ^a	36,99 ^b	32,37 ^c
Média 10h	42,12 ^a	36,77 ^b	32,50 ^c
Máxima	198	254	216
EAO (estação)	8165	6956	2887
EAO (5 dias)	6	5	3
Nº de Ultrapassagens	14	32	7

Fonte: Cetesb (www.cetesb.sp.org.br).

No período de setembro de 2018 a abril de 2019 foram realizadas 13 exposições dos amostradores passivos, sendo seis na primavera, cinco no verão e duas no início do outono. Em alguns locais e períodos, a amostragem não aconteceu devido a fatores como falta de autorização do local para a exposição dos amostradores, ventos que derrubaram os amostradores e vandalismo. A média obtida da concentração de O₃ foi significativamente menor na primavera quando comparada à média do verão e do início do outono. Não houve diferenças significativas entre as concentrações de O₃ medidas nos diferentes locais de estudo. Apenas tendências foram observadas. De um modo geral, os amostradores expostos na UNG *Campus* Centro tenderam a apresentar os menores valores de concentração de O₃ (menor média nas exposições A, B, F, G, K e M). No período em que foi possível realizar a amostragem no *Campus* Dutra, houve uma tendência a altas concentrações desse poluente (maior média nas exposições A, C e D). Os amostradores mantidos no Bosque Maia também apresentaram tendência a maiores valores de O₃ (maior média nas exposições B, K, L e M) (Tabela 3).

A média de O₃ durante todo o período de exposição mostrou que a concentração deste poluente no *Campus*

Centro tendeu a ser menor quando comparada à média da concentração obtida no Bosque Maia e Paço Municipal (27,78 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 36,49 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 34,48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente) (Tabela 3). As médias calculadas por estações mostraram que, durante a primavera, período em que ocorreu maior número de exposições, o local com tendência a maior concentração de O_3 foi o Paço Municipal (32,77 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). No verão, tendências para maiores concentrações foram observadas no Paço Municipal e no Bosque Maia (47,11 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 38,60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente). Nas últimas amostragens, obtidas no início do outono, o local que tendeu à maior concentração de O_3 foi o Bosque Maia (55,79 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) (Tabela 3).

As condições meteorológicas apresentadas no período de estudo contribuíram para a formação de O_3 e suas concentrações medidas nos locais de estudo foram fitotóxicas, uma vez que plantas apresentaram sintomas foliares visíveis típicos de O_3 nesses locais. A suscetibilidade das plantas ao O_3 é específica para cada espécie. Ela também é influenciada pelas condições meteorológicas, que determinam o suprimento de água, a temperatura da folha e as condições de luz. Isso ocasiona a abertura estomática e a consequente entrada de O_3 na planta (BUSSOTTI, 2008; CALATAYUD *et al.*, 2011; PINA; MORAES, 2007).

As espécies que apresentaram sintomas foliares visíveis induzidos por O_3 nos *Campi* Centro e Dutra da UNG, Bosque Maia e Paço Municipal de Guarulhos foram *Psidium guajava* L. Mirtaceae (goiabeira) e *Morus nigra* L., Moraceae (amoreira) (Figura 1).

Os sintomas das goiabeiras foram como os descritos por Furlan e colaboradores (2007): manchas escuras avermelhadas apenas na parte superior da folha e entre as nervuras (Figura 1A). Os autores observaram esse tipo de sintoma após cinco dias de fumigação com O_3 . Assim, pode-se afirmar que os resultados obtidos no presente estudo são uma resposta das plantas de goiabeira ao aumento das concentrações de O_3 observado na primavera e no verão (Tabela 2), como também uma resposta às condições meteorológicas favoráveis à absorção desse poluente (Tabela 1). Ainda, essas manchas escuras avermelhadas são acúmulo de antocianina, um composto secundário que, entre outras funções na célula vegetal, também é um antioxidante, ou seja, tem a capacidade de neutralizar o estresse oxidativo causado pelo O_3 (REZENDE; FURLAN, 2009).

Tabela 3 – Média da concentração de O_3 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) obtida por meio de amostragem passiva em cada local de estudo, durante a primavera/2018, verão/2019 e início do outono/2019 (27/3-25/4/2019).

Letras maiúsculas na mesma coluna comparam estações e letras minúsculas na mesma linha comparam locais. Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores médios ($p < 0,05$)

Exposições	UNG Centro	UNG Dutra	Bosque Maia	Paço Municipal
Primavera				
A	16,46	26,62	22,27	20,54
B	13,20	14,75	14,77	*
C	15,90	17,75	16,57	14,13
D	11,21	12,54	10,83	11,38
E	69,79	36,04	69,07	37,92
F	14,27	*	26,60	48,34
Verão				
G	31,32	*	50,40	52,09
H	26,50	*	19,10	47,84
I	54,72	*	41,00	49,03
J	23,90	*	*	*
K	23,81	*	55,71	44,46
Outono				
L	40,88	*	63,74	20,25
M	27,50	*	47,83	43,26
Média estação				
Primavera	23,47Ba	21,54a	26,68Ba	26,46Ba
Verão	32,05Aa	-	41,55Aa	48,35Aa
Outono	34,19Aa	-	55,79Aa	31,75Aa
Média período				
	29,90a	21,54a	41,34a	35,58a

A - 20/09-04/10/18; B - 04/10-19/10/18; C - 19/10-01/11/18; D - 01/11-14/11/18; E - 14/11-29/11/18; F - 29/11-20/12/18; G - 20/12-24/01/19; H - 24/01-07/02/19; I - 07/02-21/02/19; J - 21/02-12/03/19; K - 12/03-27/03/19; L - 27/03-11/04/19; M - 11/04-25/04/19.

Fonte: Dados da pesquisa. *Dados não disponíveis.

O número de indivíduos de goiabeira com sintomas variou entre os locais de estudo e entre as estações, ou seja, a resposta dessa espécie ao O_3 mostrou variação espacial e temporal (Tabela 4). No início da primavera, sabe-se que as concentrações de O_3 passam a aumentar devido às boas condições climáticas para sua formação, como dias mais longos, quentes e úmidos (CETESB, 2019), como demonstrado na caracterização do ambiente. Geralmente, no fim do verão/início do outono, é comum um maior número de indivíduos apresentarem sintomas foliares visíveis em relação ao início da primavera, uma vez que estão a mais tempo expostos ao poluente. Essa resposta tardia de alguns indivíduos, que levou à variação do número de plantas com sintomas entre primavera e verão/início do outono, ocorre devido às características intrínsecas de cada indivíduo, bem como às condições de exposição ao poluente (BUSSOTTI, 2008; CALATAYUD *et al.*, 2011; PINA; MORAES, 2007).

Tabela 4 – Número de indivíduos de goiabeira (*Psidium guajava*) com sintoma foliar visível causado por O_3 , encontrado nos locais de estudo, nos dois períodos de observação (primavera e fim do verão/início do outono)

	UNG Centro	UNG Dutra	Bosque Maia	Paço Municipal
Primavera	3	4	3	5
Verão/início do outono	2	1	7	10

Fonte: Dados da pesquisa.

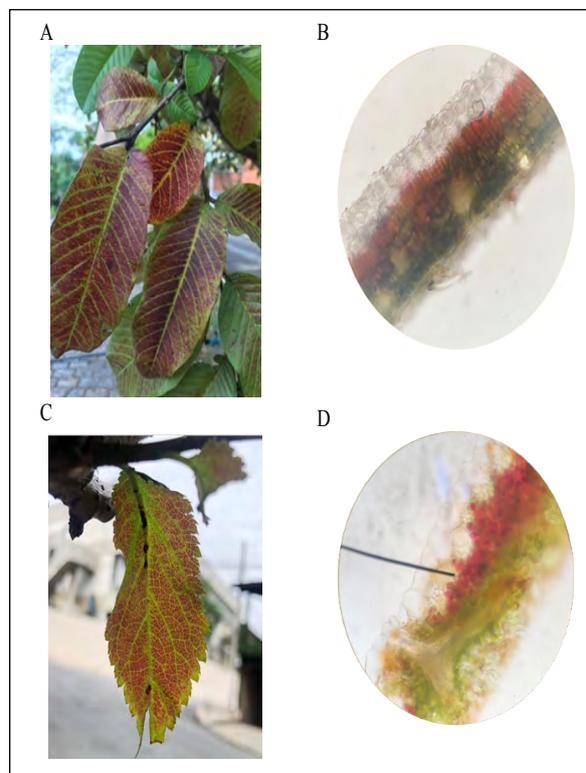
Folhas de goiabeira que apresentaram sintomas foliares visíveis foram coletadas para avaliação e validação da lesão foliar visível causada por O_3 (MOURA *et al.*, 2014; PAOLETTI *et al.*, 2009). Para tanto, foram feitos cortes transversais dessas folhas, os quais foram observados por meio de microscopia óptica. Os cortes mostraram que o sintoma se apresentava nas células do tecido paliçádico do mesofilo e estavam abaixo da epiderme (Figura 1B), confirmando, assim, ser um sintoma foliar visível causado por O_3 (PAOLETTI *et al.*, 2009).

Na segunda avaliação da vegetação (fim do verão/início do outono), no Bosque Maia, além das goiabeiras, também foram encontrados indivíduos de amoreira (*Morus nigra*) com sintomas foliares visíveis (Figura 1C). Estudos realizados na Suíça mostram que a *Morus nigra* apresenta sensibilidade ao O_3

(VANDERHEYDEN *et al.*, 2001). A amoreira é uma espécie introduzida no Brasil, de origem asiática, muito cultivada na região sul e sudeste (GUIZZO *et al.*, 2005). Segundo o Manual ICP-Forest, o gênero *Morus* tem duas espécies bioindicadoras que mostraram danos foliares visíveis na região Sul da Suíça, *Morus alba* e *Morus nigra*.

Os indivíduos de amoreira que apresentaram os sintomas foliares visíveis foram duas árvores. Elas tiveram suas folhas coletadas para avaliação em microscopia óptica. Os cortes realizados mostraram que os sintomas, assim como ocorreu nos indivíduos de goiabeira, apresentavam-se nas células do tecido paliçádico do mesofilo e estavam abaixo da epiderme (Figura 1D), confirmando, assim, ser resultado da ação do O_3 (PAOLETTI *et al.*, 2009). Esse foi o primeiro relatado de sintoma foliar visível causado por O_3 para *Morus nigra* no Brasil, o que abre novas possibilidades de estudo, não só com a espécie, mas também com a área de biomonitoramento da qualidade do ar no Brasil.

Figura 1 – Sintomas foliares visíveis causados por O_3 : A - goiabeira (*Psidium guajava*) – Campus Dutra; B - goiabeira (*Psidium guajava*) – Microscopia óptica; C – amoreira (*Morus nigra*) – Bosque Maia; D – amoreira (*Morus nigra*) – Microscopia óptica



Fonte: Dados da pesquisa.

5 Conclusão

A concentração de O₃ medida variou entre os períodos de medição do poluente (primavera/2018, verão/2019 e início do outono/2019). As concentrações observadas nos diferentes locais de estudo do município de Guarulhos (*Campi Centro* e *Dutra da UNG*, *Bosque Maia* e *Paço Municipal de Guarulhos*) foram fitotóxicas. Plantas com sintomas foliares visíveis foram encontradas em todos os locais e períodos de estudo. As espécies vegetais que apresentaram esses sintomas foram *Psidium guajava* (goiabeira) e *Morus nigra* (amoreira). Esse foi o primeiro relatado de sintoma foliar visível causado por O₃ para *Morus nigra* no Brasil.

A partir dos resultados obtidos, entendemos que o trabalho realizado poderia ser estendido para outros locais do município de Guarulhos, contribuindo para o biomonitoramento da qualidade do ar.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, A. G. *et al.* Influence of intensive agriculture on dry deposition of aerosol nutrients. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 87-97, 2010.
- ANDRADE, M. R. M. *et al.* Aspectos Fisiográficos da Paisagem Guarulhense. In: OMAR, E. E. H. **Guarulhos tem História. Questões sobre história natural social e cultural**. São Paulo: Ananda Gráfica e Editora. 200 p. 2008.
- ASSIS, P. I. L. S.; MORAES, R. M.; NAKAZATO, R. K. Will the shift from crude oil to natural gas burning for power generation at an oil refinery increase ozone concentrations in the region of Cubatão (SE Brazil)? **Ecological Indicators**, v. 85, p. 921–931. 2018.
- BORTOLIN, R. C. *et al.* Effects of chronic elevated ozone concentration on the redox state and fruit yield of red pepper plant *Capsicum baccatum*. **Science of the Total Environment**, v. 100, p. 114–121. 2014.
- BRANDÃO, S. E. *et al.* Biochemical leaf traits as indicators of tolerance potential in tree species from the Brazilian Atlantic Forest against oxidative environmental stressors. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 406–417. 2017.
- BULBOVAS, P. *et al.* Avaliação da sensibilidade de plantas jovens de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. e Malvaceae) ao ozônio. **Hoehnea**, v. 35, p. 359-366. 2008.
- BULBOVAS, P. *et al.* Assessment of the ozone tolerance of two soybean cultivars (*Glycine max* cv. Sambaíba and Tracajá) cultivated in Amazonian Areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 10514–10524. 2014.
- BUSSOTTI, F. Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. **Global Change Biology**, v. 14, p. 2727-2739. 2008.
- BUSSOTTI, F. *et al.* Assessment of ozone visible symptoms in the field: perspectives of quality control. **Environmental Pollution**, v. 125, p. 81-89. 2003.
- CAILLERET, M. *et al.* Ozone effects on European forest growth-Towards an integrative approach. **Journal of Ecology**, v. 16, p. 1377-1389. 2018.
- CALATAYUD, V. *et al.* Responses of evergreen and deciduous Quercus species to enhanced ozone levels. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 55-63. 2011.
- CAMPBELL, S. J.; WANEK, R.; COULSTON, J. W. 2007. Ozone Injury. In: Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-722. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Portland, OR, 53 pp.
- CAREGNATO, F. F.; BORTOLIN, R. C.; DIVAN JUNIOR, A. M.; MOREIRA, J. C. F. Exposure to elevated ozone levels differentially affects the antioxidant capacity and the redox homeostasis of two subtropical *Phaseolus vulgaris* L. varieties. **Chemosphere**, v. 93, p. 320–330. 2013.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental)**, 2009. Qualidade do ar no Estado de São Paulo: série relatórios 2007. CETESB, São Paulo. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.aspS.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental)**, 2017. Qualidade do ar no Estado de São Paulo: série relatórios 2007. CETESB, São Paulo. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.aspS.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental)**, 2019. Qualidade do ar no Estado de São Paulo: série relatórios 2007. CETESB, São Paulo. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.aspS.
- DE TEMMERMAN, L. *et al.* Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: Klumpp,

A., Ansel, W., Klumpp, G. (Eds.), **Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness**. Göttingen. CurvillierVerlag, 2004. p. 337–373.

DÖRING, A. S. *et al.* How sensitive is *Melissa officinalis* to realistic ozone concentrations? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 156-164. 2014.

DRAPIKOWSKA, M. *et al.* Application of novel image base estimation of invisible leaf injuries in relation to morphological and photosynthetic changes of *Phaseolus vulgaris* L. exposed to tropospheric ozone. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 186-195. 2017.

EMBERSON, L.; KUYLENSTIERNA, J.; ASHMORE, M. Assessing the extent of air pollution impacts in developing country regions. *In*: Emberson, L.; Ashmore, M.; Murray, F. (Eds.), **Air Pollution Impacts on Crops and Forests: A Global Assessment**. London IPC, p. 309–335. 2003.

FENG, Z. *et al.* Evidence of widespread ozone-induced visible injury on plants in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 193, p. 296-301. 2014.

FERRETTI, M. *et al.* Ozone and forests in South-Western Europe e What have we learned? **Environmental Pollution** v. 145, p. 652-655. 2007a.

FERRETTI, M.; CALDERISI, M.; BUSSOTTI, F. Ozone exposure, defoliation of beech (*Fagus sylvatica* L.) and visible foliar symptoms on native plants in selected plots of South-Western Europe. **Environmental Pollution**, v. 145, p. 644-651. 2007b.

FUHRER, J.; SKARBY, L.; ASHMORE, M. R. 1997. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. **Environmental Pollution**, v. 97: p. 91-106.

FUMAGALLI, I. *et al.* Evidence of ozone-induced adverse effects on crops in the Mediterranean region. **Atmospheric Environmental**, v. 35, p. 2583-2587. 2001.

FURLAN, C. M. *et al.* *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., a native Atlantic Forest species, as a bio-indicator of ozone: Visible injury. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 361-365. 2008.

FURLAN, C. M. *et al.* *Psidium guajava* 'Paluma' (the guava plant) as a new bio-indicator of ozone in the tropics. **Environmental Pollution**, v. 147, p. 691–695. 2007.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress

tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 12, p. 909–930. 2010.

GOTTARDINI, E. *et al.* Ozone risk and foliar injury on *Viburnum lantana* L.: A meso-scale epidemiological study. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 954–960. 2014.

GOTTARDINI, E.; CRISTOFOLINI, F.; FERRETTI, M. Foliar symptoms on *Viburnum lantana* reflect annual changes in summer ozone concentration in Trentino (northern Italy). **Ecological Indicators**, v. 78, p. 26–30. 2017.

GUIZZO, P. L. *et al.* Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 259-256, 2005.

HAYES, F. *et al.* Evidence of Widespread Ozone Damage to Vegetation in Europe (1990 e 2006). Programme **Coordination Centre for the ICP Vegetation**, Centre for Ecology and Hydrology, Bangor, UK, 2007.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Dados. Censo Guarulhos 2010**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidades/guarulhos>. Acesso em: 2 de maio de 2015.

KARNOSKY, D. F. *et al.* Air pollution and global change: a double challenge to forest ecosystems. *In*: KARNOSKY, D. F. *et al.* (Eds.). **Air Pollution, Global Change and Forests in the New Millennium**. Amsterdam. Elsevier Press, 2003. p. 1–41.

KHAVANINZADEHA, A. R. *et al.* Leaf injury symptoms of *Tilia* sp. As an indicator of urban habitat quality. **Ecological Indicators**, v. 41, p. 58–64. 2014.

KLUMPP, A. *et al.* Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. **Atmospheric Environment**, v. 40, p. 7437–7448. 2006.

KLUMPP, A.; KLUMPP, G.; DOMINGOS, M. Plants as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. **Environmental Pollution**, v. 85, p. 109–116. 1994.

MILLS, G. *et al.* Evidence of widespread effects of ozone on crops and (semi-)natural vegetation in Europe (1990–2006) in relation to AOT40- and flux-based risk maps. **Global Change Biology**, v. 17, p. 592–613. 2010.

- MOURA, B. B. *et al.* Ozone affects leaf physiology and causes injury to foliage of native tree species from the tropical Atlantic Forest of southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 610–611, p. 912–925. 2018.
- MOURA, B. B. *et al.* Ozone phytotoxic potential with regard to fragments of the Atlantic Semi-deciduous Forest downwind of Sao Paulo, Brazil. **Environmental Pollution**, v. 192, p. 65–73. 2014.
- NAKAZATO, R. K. *et al.* Efficiency of biomonitoring methods applying tropical bioindicator plants for assessing the phytotoxicity of the air pollutants in SE, Brazil. **Environmental Science Pollution Research**, v. 25, p. 19323–19337. 2018.
- OGAWA & Co. 2001. Protocol for ozone measurement using the ozone passive sampler badge Disponível em: <http://ogawausa.com/wpcontent/uploads/2014/04/proozone.pdf>.
- PAOLETTI, E. *et al.* Deciduous shrubs for ozone bioindication: *Hibiscus syriacus* as an example. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 865–870, 2009.
- PINA, J. M.; MORAES, R. M. Gas exchange, antioxidants and foliar injuries in saplings of a tropical woody species exposed to ozone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 685–691. 2010.
- PINA, J. M.; MORAES, R. M. Ozone-induced foliar injury in saplings of *Psidium guajava* 'Paluma'. **Chemosphere**, v. 66, p. 1310–1314. 2007.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M.; Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**. 2003.
- REZENDE, F. M.; FURLAN, C. M. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees *Chemosphere*, v. 76, p. 1445–1450, 2009.
- SANT'ANNA, S. M. *et al.* Suitability of *Nicotiana tabacum* Bel-W3 for biomonitoring phytochemical compounds in São Paulo, southeast Brazil. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 389–394. 2008.
- SCHAUB, M.; CALATAYUD, V. Assessment of visible foliar injury induced by ozone. *In*: Ferretti, M., Fischer, R. (Eds.). **Forest Monitoring: Methods for Terrestrial Investigations in Europe with an Overview of North America and Asia**, Dens, UK, Elsevier, 2013. vol. 12, p. 205–221.
- SCHAUB, M. *et al.* 2010. Assessment of Ozone Injury. Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests. 1e22. **UNECE ICP Forests Programme Co-ordinating Centre, Hamburg**. Available at: <http://icp-forests.net/>.
- SHRINER, D. S.; KARNOSKY, D. F. What is the role of demographic factors in air pollution and forests? *In*: Karnosky, D.F.; Percy, K.; Chappelka, A. H.; Simpson, C.; Pikkarainen, J. M. (Eds.). **Air Pollution, Global Change and Forests in the New Millennium**. Amsterdam. Elsevier Press, 2003. p. 43–55.
- UNECE.2001. Air pollution and vegetation. **Annual report. 2000/2001**.
- VANDERHEYDEN, D. *et al.* Ozone exposure thresholds and foliar injury on forest plants in Switzerland. **Environmental Pollution**, v. 111, p. 321–331, 2001.
- VLASÁKOVÁ-MATOUŠKOVÁ, L.; HŮNOVÁ, I. Stomatal ozone flux and visible leaf injury in native juvenile trees of *Fagus sylvatica* L.: a field study from the Jizerske hory Mts., the Czech Republic. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, p. 10034–10046. 2015.
- VOLLENWEIDER, P.; OTTIGER, M.; GÜNTHARDT-GOERG, M. S. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. **Environmental Pollution**, v. 124, p. 101–118. 2003.