

BÁRBARA BAÊSSO MOURA

**Respostas estruturais em *Ipomoea nil* (L.) Roth cv. Scarlet O'Hara
(Convolvulaceae) exposta ao ozônio**

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

SÃO PAULO

2007

BÁRBARA BAÊSSO MOURA

**Respostas estruturais em *Ipomoea nil* (L.) Roth cv. Scarlet O'Hara
(Convolvulaceae) exposta ao ozônio**

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

ORIENTADORA: DRA. EDENISE SEGALA ALVES

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Moura, Bárbara Baêso

M929r Respostas estruturais em *Ipomea nil* (L.) Roth cv. Scarlet O'Hara (Convolvulaceae) exposta ao ozônio / Bárbara Baêso Moura -- São Paulo, 2008.
66 p.il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2008
Bibliografia.

1. Convolvulaceae. 2. Bioindicador. 3. Sintomas foliares. I. Título

CDU : 582.942

A meus pais com pelo amor, paciência e dedicação.

“É preciso aprender a navegar em um oceano de incertezas
em meio a arquipélagos de certezas”

(Edgar Morin)

Agradecimentos

À Dra. Edenise Segala Alves, pela atenciosa orientação, pela confiança e por todo o incentivo.

Meus pais Vivaldo Moura e Eliana Baêso Moura e meus irmãos Ana Cândida, Rodolfo e Maria Paula que me ajudaram durante todo o processo de produção da dissertação, me ouvindo e me apoiando, mesmo nas horas mais complicadas.

Ao meu namorado Fábio pelas conversas e discussões construtivas.

À minha amiga Thaís Costa dos Santos, pelas diversas tardes juntas, em que passávamos digitando minhas traduções, e por todo entusiasmo em discutir os mais diversos temas relacionados ao meu trabalho.

Aos meus amigos da Seção de Anatomia: Andrea, Beleta, Érica, Eduardo, Fernanda e Mariana.

Ao Ms Maurício Lamano Ferreira e a Jessica Nobre, pelos vários dias de trabalho juntos, e pela dedicação de ambos no planejamento e execução do desenho experimental do projeto.

Às Dras. Solange Mazzoni-Viveiros, por sua dedicação ao programa de pós graduação do IBt, Agnes Elisete Luchi, pelos ensinamentos e Adriana Hissae Hayashi, pela simpatia.

À Dra. Marisa Domingos por ser a pioneira nos trabalhos de biomonitoramento no Brasil e pelo privilégio de fazer parte de sua equipe.

À Dra. Regina Maria de Moraes e todos os professores que ministraram disciplinas das quais participei, por todo o conhecimento transmitido, que faz com que cada vez mais eu queira me dedicar aos meus estudos, aprendendo e dividindo meus conhecimentos.

Ao Instituto de Botânica por ter propiciado as condições necessárias para o desenvolvimento de meu trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Índice

1. Introdução.....	6
1.1 O ozônio troposférico.....	7
1.2 A entrada do ozônio na planta e seus efeitos.....	8
1.3 Sintomas microscópicos.....	9
1.4 Sintomas visíveis.....	10
1.5 O monitoramento do ar com plantas.....	11
1.6 Aplicabilidade do biomonitoramento.....	13
1.7 Justificativa.....	14
1.8 Objetivos.....	15
2. Material e Métodos.....	16
2.1 Cultivo.....	16
2.2 Exposição das plantas.....	17
2.3 Coleta e processamento.....	18
2.4 Análise anatômica.....	18
2.5 Análises estatísticas.....	19
3. Resultados.....	24
3.1 Caracterização do ambiente de exposição em que a planta foi exposta.....	24
3.2 Avaliação qualitativa.....	24
3.3 Análise quantitativa.....	25
3.3.1 Análise comparativa das folhas 5, 6 e 7.....	25
3.3.2 Análise individualizada das folhas 5, 6 e 7 ao longo do tempo (inverno e primavera).....	26
3.3.3 Análise comparativa das plantas do Parque do Ibirapuera e da Casa de vegetação no inverno e na primavera.....	27
4. Discussão.....	41
5. Conclusões.....	48
6. Resumo.....	49
7. Abstract.....	50
8. Referências.....	51
Anexo 1.....	59
Anexo 2.....	65

1. Introdução

O crescimento da população humana e, conseqüentemente, o uso cada vez mais intenso dos recursos naturais do planeta, são a causa central da crise ambiental ocorrente nos dias de hoje (Mayer 1999). O impacto antropogênico acumulativo na biosfera é uma função de dois fatores: o tamanho da população humana e o impacto ambiental por pessoa, o qual varia muito entre países, dependendo da natureza, grau de industrialização, gerenciamento não apropriado e super exploração dos recursos, que pode ter conseqüências irreversíveis (Freedman 1995, Fenger 1999).

O efeito ecológico do estresse provocado pelo homem no meio ambiente é definido por Freedman (1995) como “influências no ecossistema que causam mudanças ecológicas mensuráveis ou que limitam o desenvolvimento ecológico”. Dentre os estresses ambientais destaca-se a poluição, que ocorre quando um agente químico está presente no ambiente em concentração suficiente para induzir respostas fisiológicas em organismos vivos, causando mudanças ecológicas (Freedman, 1995).

Embora a poluição do ar possa ser decorrente de fontes naturais como vulcões, queimadas naturais e desprendimento de gases de pântanos anaeróbicos que, em alguns casos, podem exceder as emissões produzidas pelo homem, as fontes antropogênicas são muito importantes, principalmente quando se leva em conta o local onde o poluente está sendo emitido (Freedman 1995).

O homem vem gerando poluição aérea desde os tempos pré-históricos: as fogueiras acesas dentro das cavernas já prejudicavam a qualidade do ar dentro destas (Cançado *et al.* 2006). Milênios depois, com a revolução industrial e a queima intensa do carvão, a poluição aérea se tornou muito expressiva em cidades da Europa, principalmente pela presença de dióxido de enxofre e fuligem. Este problema se tornou crítico no século XIX, quando concentrações elevadas de poluentes atmosféricos foram então vinculadas a problemas de saúde humana (Croce *et al.* 1998, Kan *et al.* 2004, Abrantes *et al.* 2005). Hoje se sabe que os poluentes também trazem danos à flora e à fauna,

além da destruição de monumentos históricos e outras construções. Tais efeitos ocorrem com alta frequência em aglomerações urbanas, uma vez que uma grande quantidade dos mais diversos poluentes está sendo emitida em uma área relativamente limitada (Klumpp *et al.* 2001).

Os principais poluentes aéreos ligados às atividades humanas são gases como o monóxido de nitrogênio (NO), dióxido de nitrogênio (NO₂), ozônio (O₃), monóxido de carbono (CO) e metano (CH₄) (Cox 2003). O NO e o NO₂ formam os óxidos de nitrogênio (NO_x). O NO é um gás incolor, inodoro e insípido enquanto que o NO₂ tem coloração marrom, e sua principal fonte de emissão antropogênica está associada à queima de combustíveis fósseis, que produzem NO_x pela oxidação do nitrogênio orgânico, durante a combustão e pela oxidação do N₂ atmosférico em NO_x. O NO é o primeiro gás a ser produzido neste sistema, enquanto que o NO₂ é produzido secundariamente na atmosfera pela oxidação do NO (Freedman 1995). A maior importância dos NO_x está associada com a síntese fotoquímica do O₃. Tanto os NO_x quanto o O₃ formam plumas que são facilmente misturadas com o ar ambiente e podem ser transportadas a longas distâncias das fontes emissoras, para regiões rurais e áreas florestais (Krupa *et al.* 2001, Wenig *et al.* 2002, Boian & Kirchhorff 2005).

Além do ozônio, o nitrato de peroxiacetil (PAN), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e aldeídos são poluentes secundários, ou seja, poluentes que reagem entre si ou com componentes existentes naturalmente na atmosfera (Freedman 1995).

1.1. O ozônio troposférico

Diferentemente do O₃ encontrado na estratosfera, que protege biologicamente a Terra da radiação ultravioleta (UV), evitando que esta alcance a superfície terrestre, o O₃ troposférico é um poluente secundário fitotóxico de fácil disseminação, sendo de longe o mais importante, danoso e oxidante dentre os poluentes fotoquímicos (Krupa & Manning 1988, Klumpp *et al.* 2001, Krupa *et al.* 2001, Ryerson *et al.* 2001, Lawson *et al.* 2002).

Os primeiros registros relativos ao O_3 são de 1840, quando o cientista alemão C.F. Schönben (apud Krupa *et al.* 2001) sugeriu a existência de um constituinte atmosférico com odor, notado em dias de tempestades com raios. Ele propôs o nome ozônio para esta substância, que foi quimicamente provada por Houzeau em 1858 (apud Krupa *et al.* 2001). Somente em 1958, Richard e colaboradores mostraram que o O_3 era um constituinte do *smog* (*smoke* + *fog* = fumaça + neblina) e causava injúrias foliares em uvas, na Califórnia (apud Krupa *et al.* 2001).

O O_3 é um gás azulado 1,6 vezes mais pesado que o ar e muito reativo como oxidante. O mais importante mecanismo de formação do O_3 na superfície terrestre é decorrente do ciclo fotoquímico. As suas substâncias precursoras, hidrocarbonetos voláteis (HCs) e NO_x provêm de processos naturais e biológicos mas, principalmente, da queima de combustíveis fósseis (Seinfeld 1989, Sawyer *et al.* 2000, Krupa *et al.* 2001).

Sabe-se que o O_3 segue um ciclo diário de concentrações variadas. Emissões de NO_x e HCs são altas no começo da manhã, como resultado do pesado tráfego durante o horário de pico. Essas emissões veiculares destroem parte do O_3 presente no momento, levando à conversão de NO a NO_2 . As concentrações de NO_2 atingem valores máximos quando a atmosfera desenvolve suficiente capacidade de oxidar o NO sem consumir totalmente o O_3 , este processo envolve o segundo precursor, os HCs e seus produtos de oxidação. Na presença dos raios solares, o NO_2 quebra-se em NO e oxigênio atômico (O) e, a combinação posterior com uma molécula de oxigênio molecular (O_2) produz então o O_3 . Em uma típica atmosfera urbana, as concentrações de O_3 aumentam rapidamente entre o período das 12 e 15 horas, quando a intensidade dos raios solares entra no máximo e a razão NO_2 : NO é alta. A taxa de formação de O_3 deve então decair, alcançando uma estabilidade durante o fim da tarde e começo da noite (Krupa *et al.* 2001, Azevedo 2003).

1.2. A entrada do ozônio na planta e seus efeitos

A entrada do O_3 na folha se dá quando uma molécula desse gás é carregada por difusão para as proximidades da superfície foliar, onde encontra uma provável camada laminar que age como

uma primeira barreira; vencida tal barreira, o O_3 se difunde pela superfície foliar e entra pelo complexo estomático, alcançando a cavidade subestomática (Parkhurst 1994) onde, sendo solúvel em matriz aquosa (Ljubešić & Britvec 2006), migra por difusão molecular pelos complexos espaços intercelulares do mesofilo (Gerosa *et al.* 2003). Devido a seu alto potencial oxidativo, o O_3 , ao entrar na folha, causa a formação de diferentes espécies ativas de oxigênio (EAOs) incluindo H_2O_2 , superóxidos desmutase (O_2^-), radicais hidroxila (OH^*) e oxigênio livre (Ljubešić & Britvec 2006), que reagem com as membranas lipídicas (Schraudner *et al.* 1998) causando um estresse oxidativo inicial, danificando proteínas e levando a uma deficiência fisiológica, que pode provocar a morte celular (Krupa *et al.* 2001, Vollenweider *et al.* 2003).

Processos fisiológicos e bioquímicos, incluindo sistemas de desintoxicação, demonstram uma boa correlação entre tolerância ao O_3 e altos níveis endógenos de antioxidantes (Saitanis & Karandinos 2002), tais como peróxido desmutase, glutathione peroxidase, substâncias fenólicas (taninos, flavanóides) e antocianinas. A habilidade das plantas em sintetizar tais substâncias confere à estas mecanismos de defesa contra a expansão das injúrias induzidas pelo O_3 , até mesmo impedindo a formação destas (Kolb *et al.* 1997, Gravano *et al.* 2004, Iriti *et al.* 2003, Pell *et al.* 1997).

1.3. Sintomas microscópicos

O acúmulo maciço das EAOs ativa o processo de resposta de hipersensibilidade, que se caracteriza por uma reação localizada de defesa, que ocorre em estruturas específicas e grupos distintos de células (Vollenweider *et al.* 2003). Nas células, se observa a degradação incompleta dos seus componentes, que causa uma súbita perda da integridade das membranas (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007) e a rápida morte celular. Tal resposta ocorre preferencialmente no parênquima paliçádico (Evans *et al.* 1996, Gerosa *et al.* 2004).

São também características do efeito do estresse oxidativo, protrusões pécticas nas paredes celulares como “verrugas”, que ocorrem normalmente nas paredes das células do parênquima

lacunoso (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007, Reig-Armiñana *et al.* 2004) e são decorrentes de um processo oxidativo intercelular lento e, também, de processos de desintoxicação (Günthardt-Goerg *et al.* 1997), indicando mudanças no metabolismo secundário da planta (Günthardt-Goerg *et al.* 2000).

1.4. Sintomas visíveis

Plantas a serem empregadas em programas biomonitoramento, devem apresentar sintomas facilmente observáveis, que indiquem, de uma maneira clara, a presença do poluente. Portanto, é de fundamental importância estabelecer se os sintomas presentes nas folhas são causados realmente por estressores abióticos, no caso poluentes, uma vez que existem diversos sintomas decorrentes de fatores bióticos, como a ocorrência de pontos isolados ou lineares nas folhas, sintomas sobre nervuras, entre outros. A presença de corpos de frutificação e vestígios de insetos são também indicativos de sintomas causados pela ação de organismos vivos. Já os sintomas visíveis provocados por fatores abióticos apresentam características importantes que os diferenciam dos causados por agentes bióticos. Estes sintomas normalmente apresentam-se distribuídos uniformemente ou em gradientes na folha, ocorrendo tanto em folhas expostas ao sol como naquelas expostas à sombra, sendo oriundos de fatores estressantes provindos tanto do ar quanto do solo; necroses em direção às bordas das folhas são relacionados a secas, geadas ou até déficit de nutrientes e ondulações nas folhas podem estar vinculadas ao estresse hídrico; já pontos entre nervuras, manchas difusas e coloração bronzeada estão relacionados a sintomas provocados pelo O₃, mas podem ainda ter relação com metais pesados e patógenos (Vollenweider *et al.* 2006). Portanto, existe a dificuldade em se definir, dentre os sintomas causados por fatores abióticos, quais são aqueles causados realmente pelo O₃.

Novak *et al.* (2003) apresenta as diferenças entre os sintomas provocados pelo O₃ e outros decorrentes de outros fatores, evidenciando que os causados pelo O₃ ocorrem exclusivamente entre as nervuras e caracterizam-se, normalmente, como uma descoloração geral, com a presença inicial

de pontos menores que 1 mm; estes sintomas são mais comuns em folhas totalmente expandidas do que naquelas que estão em processo de expansão. Muitos estudos confirmam que o estágio de desenvolvimento da folha é determinante no aparecimento de sintomas causados pelo O₃ (Kolb *et al.* 1997, Vollenweider *et al.* 2003, Bassin *et al.* 2004) e tais respostas variam segundo Krupa *et al.* (2001) de acordo com gênero, espécie, cultivar, variedade ou genótipo, entre outros fatores ambientais como as características de exposição que a planta foi submetida.

Sintomas visíveis decorrentes do ozônio aparecem quando as defesas metabólicas da planta não são suficientes para impedir a progressão destes. Nas angiospermas, esses sintomas ocorrem normalmente na superfície adaxial da folha e em lados expostos à luz, incluindo: cloroses, como manchas verdes claras ou amareladas, e, normalmente entre as nervuras secundárias; pontos avermelhados distribuídos aleatoriamente na folha, decorrente do acúmulo de antocianinas, que muitas vezes podem recobrir toda folha exceto as regiões das nervuras; as folhas podem ainda apresentar um tipo de bronzeamento ou, ainda, mostrar pontuações prateadas (Krupa *et al.* 2001, Evans *et al.* 1996, Vollenweider *et al.* 2003). Igualmente no que se refere ao ozônio, de uma maneira geral, folhas adultas, totalmente expandidas, são mais sensíveis, uma vez que não sofrem aclimação, ao contrário do que se observa em folhas jovens, que se expandem no ambiente poluído (Pääkkönen *et al.* 1995b, Vollenweider *et al.* 2003).

1.5. O monitoramento do ar com plantas

O monitoramento do ar com plantas complementa medidas físico-químicas das concentrações dos poluentes realizadas por redes de monitoramento, uma vez que estas não permitem avaliar os efeitos reais e visíveis dos poluentes sobre os seres vivos (De Temmerman *et al.* 2004). O uso de plantas possibilita mostrar visualmente as respostas de indivíduos vivos, evidenciando o estresse de forma eficaz e até mesmo didática.

Todo sistema biológico, organismo, população ou comunidade, aclimatou-se a um complexo de fatores ambientais ao longo de sua evolução, conquistando um espaço e um nicho ecológico,

onde encontra as condições necessárias e favoráveis à sua manutenção e reprodução. Entretanto, alterações dos fatores ambientais sob influência do estresse antrópico levam a outros estados de estabilidade. Os organismos reagem, alguns se aclimatam, porém quando sua capacidade de aclimação é ultrapassada, eles podem apresentar sintomas (Lima 2001). São estes sintomas que, de acordo com Arndt *et al.* (1991), definem os bioindicadores como “organismos ou comunidades de organismos que reagem a alterações ambientais com a modificação de suas funções vitais normais e/ou da sua composição química, permitindo assim conclusões a respeito das condições ambientais”.

Dentro do conceito de biomonitoramento com plantas Garrec & Van Haluwyn e Falla e colaboradores sintetizaram a terminologia de maneira a diferenciaram os organismos biomonitores como apresentado por De Temmerman *et al.* (2004):

- Bioindicadores: plantas que apresentam sintomas visíveis, como necroses, cloroses, distúrbios fisiológicos como não produção de flores e frutos e redução de crescimento.
- Biosensores ou biomarcadores: plantas que reagem à presença de poluição aérea através de mudanças não visíveis, sendo a detecção dos efeitos feita por meio de equipamentos específicos ou técnicas em fisiologia e bioquímica.
- Bioacumuladores: plantas que em geral são menos sensíveis à poluição, porém são capazes de acumular em seus tecidos partículas aereotransportadas.
- Indicadores ecológicos: populações de plantas ou comunidades com mudanças na composição e densidade de espécies.

O biomonitoramento é classificado por diversos autores como passivo, quando envolve as plantas que crescem em seu ecossistema natural; estas são influenciadas diretamente ou indiretamente pela poluição aérea durante um longo período de tempo, mostrando qualitativamente e quantitativamente o impacto da poluição ambiental. No biomonitoramento ativo, as plantas são introduzidas de forma padronizada no ambiente e o monitoramento é realizado ao longo de uma série temporal. Normalmente, espécies ou cultivares específicos são usados e, dependendo do

objetivo, podem ser utilizadas plantas sensíveis para avaliação de injúrias ou, ainda, outras espécies mais resistentes para avaliação do acúmulo de substâncias. Este método é bastante útil para redes de monitoramento, uma vez que variáveis como tipo de solo e disponibilidade de nutrientes e água, podem ser padronizadas. (De Temmerman *et al.* 2004, Klumpp *et al.* 2001, Lima 2001).

1.6. Aplicabilidade do biomonitoramento

Como já se viu, o biomonitoramento da poluição aérea feito com plantas oferece a possibilidade de se obter uma resposta integrada, mesmo quando há uma complexa mistura de poluentes ocorrendo simultaneamente. Reagindo especificamente em diferentes níveis de organização, desde os que abrangem uma única planta (folhas ou até células), até os que abrangem a associação de plantas e o ecossistema, o biomonitoramento ainda permite a delimitação de populações de risco, viabilizando a avaliação de efeitos sinérgicos e aditivos (Klumpp *et al.* 2001), além de propiciar a criação de redes de monitoramento em áreas urbanas e industriais, importantes no monitoramento de áreas remotas e úteis em estudos de impacto ambiental (EIA) (Iriti *et al.* 2006).

Muitos destes atributos fazem com que o biomonitoramento seja apropriado em países em desenvolvimento, onde geralmente existem limitadas redes de monitoramento, oferecendo a oportunidade de determinar em larga escala o padrão de distribuição dos poluentes (De Temmerman *et al.* 2004).

Para que o uso de bioindicadores siga uma metodologia adequada, é necessária a coleta sistemática de dados, permitindo a criação de um inventário de respostas à poluição. A padronização das técnicas, desde o cultivo e exposição das plantas, até a medição de efeitos e avaliação dos resultados, é um requisito fundamental para a validade e a aplicabilidade dos dados obtidos (Klumpp *et al.* 2001).

Dentre as espécies bioindicadoras de ozônio, tradicionalmente se empregam cultivares de *Nicotiana tabacum* L., especialmente a cultivar sensível Bel-W3 (Heggestad 1991, Saitanis &

Karandinos 2002, Vergé *et al.* 2002). Em estudos realizados no Brasil o tabaco, não respondeu de forma linear em relação à concentração de O₃ no ambiente (Sant'Anna 2007), portanto outras espécies devem ser testadas, levando-se em conta também variáveis qualitativas,

1.7. Justificativa

Muito do que conhece sobre os efeitos do O₃ em plantas derivam de estudos realizados em ambientes controlados, como câmaras de fumigação; estes estudos são muito importantes, uma vez que permitem avaliar os efeitos dos poluentes sem a interferência de fatores ambientais, que podem ser controlados, porém os resultados de tais estudos não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente, que impõe às plantas múltiplas interferências (Krupa *et al.* 2001).

Considerando que as observações microscópicas ocorrem simultaneamente ou mesmo antecedem os primeiros sintomas visíveis (Vollenweider *et al.* 2003), estas representam uma importante ferramenta para a detecção precoce dos sintomas provocados pelo O₃ e são necessárias quando se pretende avaliar o potencial bioindicador de uma espécie.

O estudo aqui desenvolvido, no qual se empregou a cultivar Scarlet O'Hara de *Ipomoea nil* L. (Convolvulaceae), foi proposto visando investigar, ao nível celular, os efeitos oxidativos provocados pelo O₃ nessa cultivar, contribuindo para a viabilização do seu uso em programas de biomonitoramento da qualidade do ar em locais submetidos ao O₃, na cidade de São Paulo-SP.

Ipomoea nil L. cv. Scarlet O'Hara foi escolhida uma vez que, sob fumigação com O₃, apresenta sintomas foliares típicos, como pontos cloróticos e necroses intervenais (Nouchi & Aoki 1979). Em exposições *in situ*, realizadas na região de Cubatão-SP (Domingos *et al.* 1998), a cultivar apresentou pigmentações, cloroses ou necroses em ambiente submetido ao O₃. Além dos sintomas característicos, e da inexistência de estudos estruturais com a planta submetida ao O₃, a espécie apresenta diversos aspectos positivos no que diz respeito à sua utilização em programas de biomonitoramento: cresce com facilidade; produz muitas folhas durante todo seu ciclo de vida;

produz folhas novas mesmo quando apresenta danos acentuados em folhas mais velhas e é muito sensível a oxidantes fotoquímicos.

1.8. *Objetivos*

Considerando as altas concentrações de O₃ presentes na cidade de São Paulo, o estudo teve como objetivo ampliar análises em *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara e validar os sintomas presentes nesta como decorrentes do estresse oxidativo provocado pelo O₃, observáveis em microscopia fotônica, além de contribuir com dados que possam auxiliar no estabelecimento da viabilidade de se empregar a cultivar como bioindicador de O₃, na cidade de São Paulo.

1. Material e métodos

1.1. Cultivo

Um lote de sementes de plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara foi adquirido de fornecedor comercial (*CN Seeds LTD*, www.cnseeds.co.uk). Estas foram colocadas para germinar em caixa plástica transparente (gerbox) com 100 cm² (figura 1).

Como substrato para germinação, utilizou-se uma mistura de produto comercial produzido a base de casca de *Pinus* (Plantimax-Eucatex) e de vermiculita fina, na proporção de 3:1, respectivamente. As plântulas se desenvolveram nessas caixas até o surgimento da segunda folha cotiledonar, sendo, então, transplantadas para 24 vasos plásticos com uma planta em cada vaso, contendo o mesmo substrato. Nesse momento, fincou-se uma pequena estaca de madeira para suportar as plantas durante o seu crescimento.

Desde a germinação até as exposições *in situ*, as plantas foram mantidas em casa de vegetação instalada no Instituto de Botânica, localizado na região sudeste da cidade de São Paulo, entre as coordenadas 23°38'08"-23°40'18"S e 46°36'48"-46°38'00"W (Fernandes *et al.* 2002) figura 4 A e B). A casa de vegetação possui sistema de filtros para poluentes particulados e gasosos e equipamento de ar condicionado para controle de temperatura, que foi regulada para acompanhar as variações ao longo das estações do ano, simulando, dessa forma, aquelas do ambiente externo. Nesse local, a temperatura e a umidade do ar foram monitoradas continuamente por meio de termohigrógrafo e o ar foi avaliado periodicamente, empregando-se equipamentos que medem material particulado (High-Vol 10 µL) e gases (Trigas), ambos da marca Energética, confirmando sua boa qualidade.

Para garantir o suprimento hídrico adequado às plantas, estas foram irrigadas por capilaridade, por intermédio de cordões de náilon inseridos na base dos vasos, sendo que uma de suas extremidades permaneceu em contato com as raízes e a outra extremidade esteve mergulhada em água de torneira contida na caixa plástica coberta com tela de arame galvanizado (figura 2),

seguindo modelo proposto por VDI (2003).

Semanalmente, a partir do transplante até o término do experimento, todas as plantas receberam 100 ml de solução nutritiva de Hoagland descrita em Epstein (1975). Quinze dias após o transplante, a quarta folha mais velha do ramo principal de cada vaso foi marcada com barbante para servir como referência. No estudo foram analisadas a quinta, sexta e sétima folhas do ramo principal da planta, de acordo com a metodologia sugerida pelo VDI (2003) para *Nicotiana tabacum* (figura 3).

1.2. Exposição das plantas

Ipomoea nil cv. Scarlet O'Hara foi exposta no Parque do Ibirapuera (23°34'55"S e 46°39'25"W), junto à Estação Ibirapuera da Companhia Estadual de Saneamento Ambiental (CETESB) (figura 4 A-C), local submetido a altas concentrações de ozônio e que é monitorado continuamente pela mesma estação, que disponibiliza, não apenas a concentração de poluentes mas, também, dados meteorológicos.

Doze vasos foram expostos sobre caixas plásticas preenchidas com água de torneira e cobertas com arame galvanizado. Estas foram colocadas em suportes de ferro galvanizado, cobertos com tela para sombreamento de 50% e irrigação garantida por capilaridade, enquanto os outros doze vasos permaneceram na casa de vegetação como referência para as análises posteriores (figura 4 B).

Foram realizadas duas exposições, uma delas no inverno (25/08 a 22/09/2006) e outra na primavera (14/11 a 11/12/2006). A duração da exposição (28 dias) foi determinada com base em estudos preliminares sobre o crescimento da planta realizados por M.L. Ferreira (comunicação pessoal).

1.3. Coleta e processamento

Foram feitas coletas semanais da 5^a, 6^a e 7^a folhas em três indivíduos. Para se obter uma amostragem significativa, foram retirados, de cada folha, seis fragmentos com cerca de 2 cm², selecionados de modo aleatório, de acordo com a metodologia sugerida por Kubinová (1994). As amostras foram fixadas, sob vácuo, em FGAA (Lersten & Curtis 1988 *apud* Kraus & Arduin 1997), permanecendo no fixador por 48 horas, para serem posteriormente estocadas em álcool a 70%.

Parte do material foi incluído, após hidratação, em polietileno glicol 2000 (Richter 1981, modificado) e seccionado transversalmente em micrótomo rotativo marca Olympus (Cut 4055) com 5 µm de espessura; as secções foram coradas com azul de astra e safranina 1% (9:1) e montadas em glicerina a 66%.

Parte do material foi incluído em glicol-metacrilato (GMA) (historresina marca Leica), de acordo com recomendações do fabricante. As secções, com 5 µm de espessura obtidas com o mesmo micrótomo, foram coradas com azul de toluidina 0,05%, preparado em tampão acetato 0,1M, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1965 *apud* Kraus & Arduin 1997).

Para a análise da superfície paradérmica, parte do material foi diafanizado de acordo com Strittmatter (1973), onde o material é aquecido em álcool 95% por 1 minuto sendo transferido para o hidróxido de sódio 5% e aquecido novamente por mais 1 minuto sendo, posteriormente, colocado em hipoclorito de sódio 20% para clarificação; após o procedimento de diafanização, as amostras foram coradas com azul de astra e safranina 1% (9:1), desidratadas em etanol e montadas em resina Permout®.

1.4. Análise anatômica

As observações das secções foliares foram realizadas em microscópio Olympus BX41-BFIII equipado com sistema para captura de imagens e sistema semi-automático de medições, software Pro-Express versão 4.0.1, Media Cybernetics.

Foram realizadas, nas secções transversais das folhas, análises qualitativas com o intuito de

se observar danos microscópicos relacionados ao estresse oxidativo descritos na literatura.

Além das análises qualitativas, foram avaliadas quantitativamente, em secções transversais da folha, as variáveis: espessura do limbo, espessura das células epidérmicas em ambas as superfícies, espessura do parênquima paliçádico e lacunoso (figura 5), tendo sido realizada uma medida em cada um dos seis fragmentos de cada folha amostrada, sendo feita posteriormente a média por folha. O mesmo procedimento amostral foi realizado para os demais parâmetros quantitativos descritos a seguir.

Ainda nas secções transversais, foi determinada a porcentagem relativa dos tecidos foliares utilizando-se técnica estereológica de contagem de pontos de acordo com Parkhurst (1982). Com o auxílio do software Pro-Express versão 4.0.1, projetou-se, sobre a imagem da folha, uma máscara com 100 pontos espalhados aleatoriamente e contou-se o número de pontos que caiu em cada um dos tecidos foliares (epiderme, parênquima paliçádico e parênquima lacunoso) ou nos espaços intercelulares. A razão entre o número de pontos posicionados sobre cada tecido e o número de pontos posicionados sobre toda a imagem da folha forneceu a porcentagem relativa de cada tecido, além da proporção de espaços intercelulares, permitindo, assim, uma estimativa da fração volumétrica de cada componente (figura 6).

Nas secções paradérmicas foram determinados a densidade e o índice estomático (IE) projetando-se, sobre as imagens das folhas, um quadrado de $200\mu\text{m}^2$ e determinando-se nessa área o número de estômatos e o número de células estomáticas (figura 7). O índice estomático (IE) foi estabelecido por meio da fórmula $\text{IE} = \text{Et} \times 100 / \text{Ep} + \text{Et}$ (Salisbury 1927 *apud* Wilkinson 1979), onde Et corresponde ao número de estômatos por unidade de área e Ep ao número de células epidérmicas na mesma área.

1.5. Análises estatísticas

Para os dados quantitativos, inicialmente, procuraram-se diferenças significativas nos aspectos estruturais nas folhas 5, 6 e 7, em cada amostragem e em cada estação do ano. Para tanto,

aplicou-se a análise de variância com um fator. Em seguida, foram realizadas análises de variância com dois fatores com todo o conjunto de dados, de modo a identificar diferenças entre as estações (fator 1) e ao longo do tempo em cada estação (fator 2). Em todos os casos, as análises de variância, quando indicaram diferenças significativas, foram seguidas por testes de comparação múltipla (Student-Newman Keuls). Igualmente, em todos os casos, verificou-se a normalidade e a igualdade de variâncias dos dados.

Em seguida, foram realizadas análises de componentes principais (ACP) a fim de avaliar a variabilidade conjunta dos aspectos estruturais em folhas de *Ipomoea nil*, ao longo das duas estações do ano, procurando evidenciar se houve sazonalidade marcante.

Realizaram-se, também, correlações de Pearson para determinar as relações entre os fatores estruturais e as diferentes estações do ano.



Figura 1. Plântulas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara se desenvolvendo em gerbox com substrato padronizado. Fonte: Ferreira 2007.

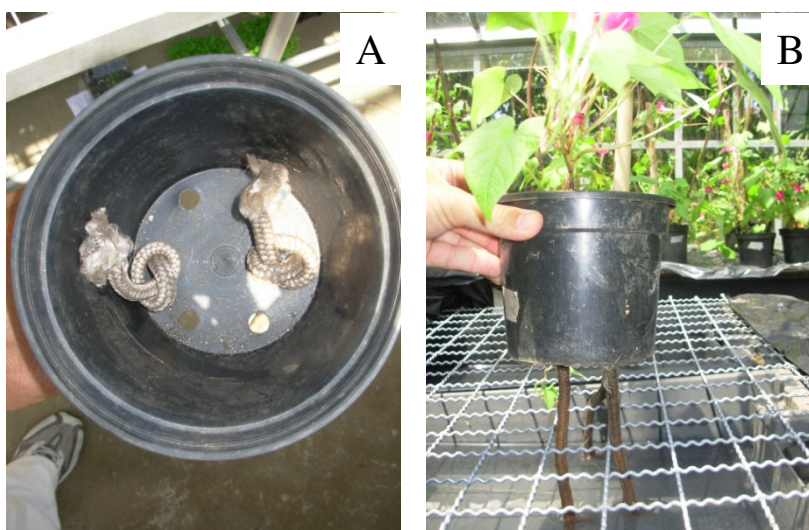


Figura 2. Plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara se desenvolvendo em casa de vegetação. A. Vasos plásticos com cordões de náilon; B. Irrigação das plantas garantida por capilaridade. Fonte: Ferreira 2007.

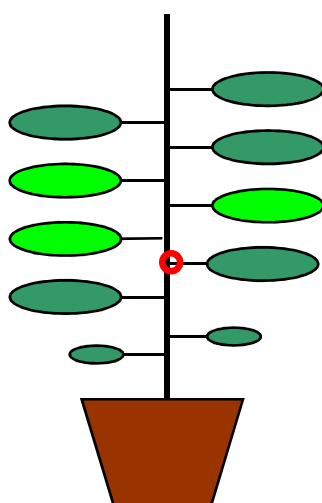


Figura 3. Ilustração referente à marcação da quarta folha mais velha do ramo principal, ponto de referência para a quinta, sexta e sétima folhas analisadas neste estudo. Fonte: Ferreira 2007.

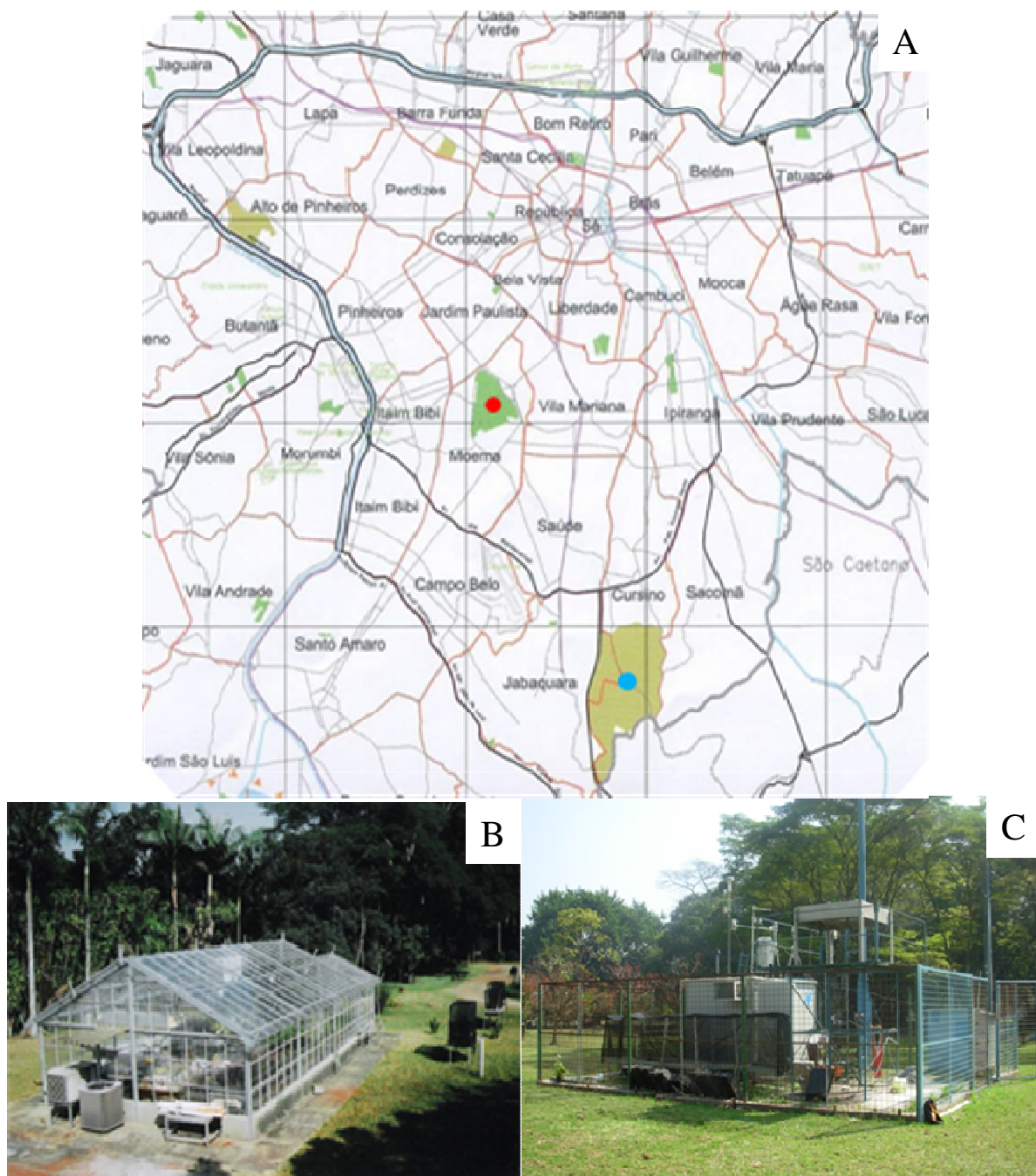


Figura. 4. Locais de exposição. A. Mapa da região centro-sul da cidade de São Paulo. Casa de vegetação (●), Parque do Ibirapuera (●). B. Casa de vegetação instalada no Instituto de Botânica (São Paulo) com filtros para poluentes particulados e gasosos e sistema de ar condicionado para controle da temperatura C. Estação de monitoramento da CETESB no Parque do Ibirapuera, onde foram mantidos os suportes para as plantas de *Ipomoea nil*. Fonte: Ferreira (2007).

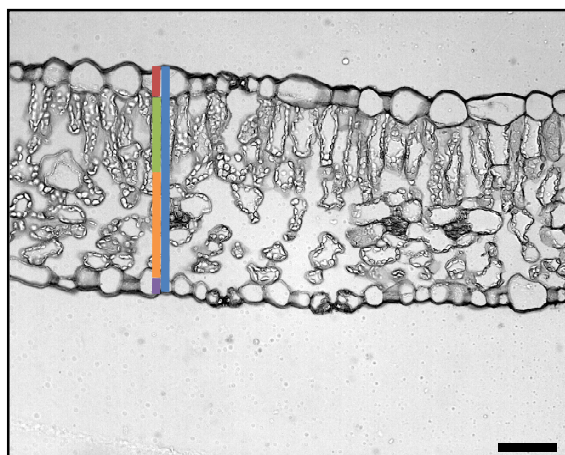


Figura 5. Secção transversal da folha de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara, exemplificando como foram realizadas as medidas de espessura dos tecidos. ■ = espessura do limbo, ■ = espessura da célula epidérmica da superfície adaxial, ■ = espessura do parênquima paliçádico, ■ = espessura do parênquima lacunoso, ■ = espessura da célula epidérmica da superfície abaxial. Escala = 50µm

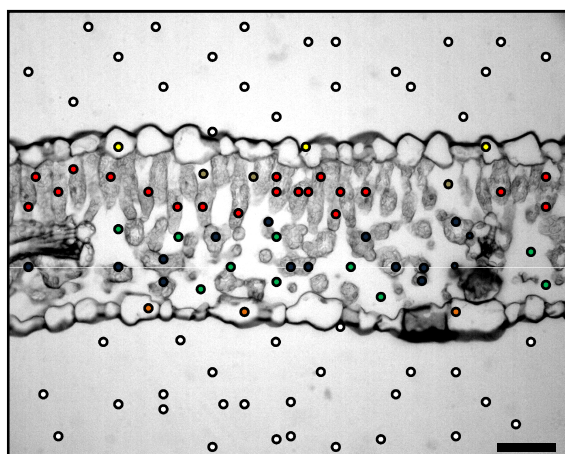


Figura 6. Secção transversal da folha de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara, exemplificando como foi calculada a proporção dos tecidos foliares. ● = % de células epidérmicas da superfície adaxial, ● = % de parênquima paliçádico, ● = % de parênquima lacunoso, ● = % de células epidérmicas da superfície abaxial, ● = % de espaço intercelular no parênquima paliçádico, ● = % de espaço intercelular no parênquima lacunoso, ○ = pontos posicionados fora da área de contagem. Escala = 50µm

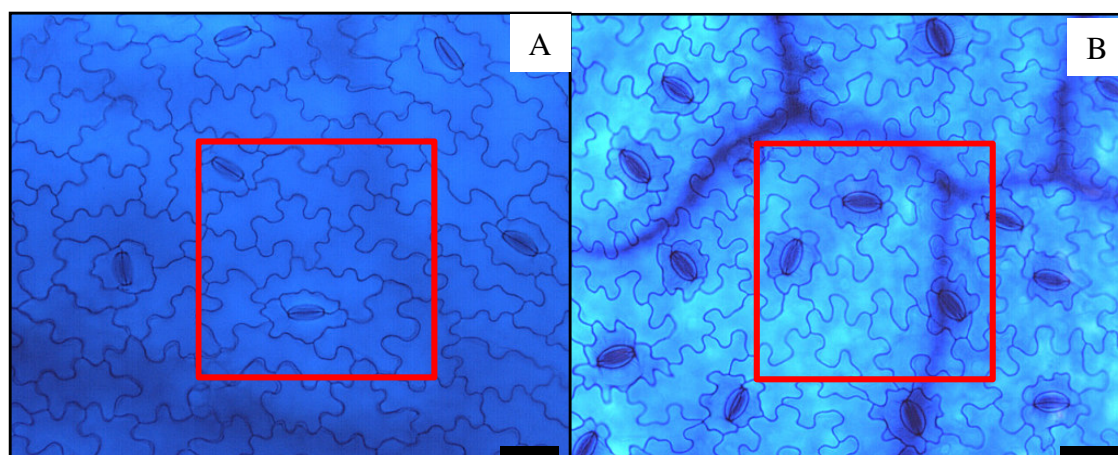


Figura 7. Secções paradérmicas da folha de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara, exemplificando como foram calculados a densidade e o índice estomático. A. superfície adaxial, B. superfície abaxial. Escala = 50µm

3. Resultados

3.1. Caracterização do ambiente de exposição em que a planta foi exposta

Na tabela 1 são apresentadas as concentrações médias de O_3 e seus precursores (NO e NO_2) e valores médios de variáveis climáticas como umidade, temperatura e radiação global, nas estações do ano nas quais ocorreram as exposições de *Ipomoea nil* em São Paulo: inverno (25/08 a 22/09/2006) e primavera (14/11 a 11/12/2006). Observa-se que as variáveis climáticas não apresentaram diferenças marcantes entre as duas estações, porém nota-se que o inverno, quando comparado à primavera, apresentou maior concentração média de O_3 e maiores concentrações dos seus precursores. (melhorar tabela e texto)

Nas figuras 8-10 são indicadas as variações diárias médias de parâmetros climáticos (umidade relativa do ar, temperatura e radiação global) nos períodos de exposição: 25/08 a 22/09/2006 (inverno) e 14/11 a 11/12/2006 (primavera). Na figura 11, registra-se a média horária de NO_2 ($\mu g\ m^{-3}$) NO ($\mu g\ m^{-3}$) e O_3 ($\mu g\ m^{-3}$) no Parque do Ibirapuera durante os mesmos períodos (CETESB 2007). Como se vê, ao longo de 24 horas, o NO e o NO_2 apresentam concentrações elevadas no período da manhã, diminuindo no período da tarde, quando, devido à alta radiação, formou-se grande quantidade de O_3 .

Na casa de vegetação, nos mesmos períodos, os valores médios de temperatura e umidade indicam que as plantas foram submetidas a faixas toleráveis desses parâmetros meteorológicos nos dois períodos de exposição (tabela 2).

3.2. Análise qualitativa

Em nível celular, nas plantas expostas no Parque do Ibirapuera, foram observadas alterações indicativas do estresse oxidativo gerado pelo ozônio. Tais alterações foram observadas indiferentemente nas folhas 5, 6 e 7 (figura 12 E-H) e não foram encontradas nas plantas mantidas em casa de vegetação, sob ar filtrado (figura 12 A-D). As alterações foram observadas no mesófilo,

enquanto que a estrutura do tecido vascular permaneceu intacta. Em tecidos sem sintomas visíveis, tanto nas plantas expostas no inverno quanto na primavera, foi observada plasmólise em células isoladas do parênquima paliçádico, o que representa uma clássica resposta de hipersensibilidade, típica do ozônio. A morte celular aparentemente ocorreu de forma rápida, uma vez que foi possível notar a permanência de cloroplastos mesmo em células necrosadas (figura 12 H), tais sintomas foram encontrados somente nas plantas que permaneceram no Parque do Ibirapuera. Na parede celular foram observadas protrusões, principalmente nas células do parênquima lacunoso, evidenciadas pela coloração intensa (figura 13 C-F). As protrusões apresentaram-se distribuídas por todo tecido fotossintético nas plantas expostas ao ozônio, enquanto que naquelas que permaneceram na Casa de vegetação, as mesmas não foram evidenciadas (figura 13 A-B).

Em amostras coletadas em áreas da folha com sintomas visíveis (necroses), foram observados: o colapso da parede celular, o rompimento das células epidérmicas e parenquimáticas, bem como o desarranjo dos cloroplastos. Tais sintomas foram observados em grupos maiores de células, porém apresentaram-se isoladamente no tecido (figura 14 A-B).

3.3. *Avaliação quantitativa*

A análise quantitativa das folhas 5, 6 e 7, ao longo do tempo e nos dois locais de exposição, foi realizada buscando explicar, com base na estrutura, resultados obtidos por Ferreira (2007), que evidenciou, nas mesmas plantas, maior quantidade de necroses naquelas expostas durante o inverno. Para tanto foram avaliados, como apresentado no item Material e Métodos, os seguintes parâmetros foliares: espessura dos tecidos: limbo, células epidérmicas das superfícies adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e lacunoso; porcentagem dos tecidos; densidade e índice estomático.

3.3.1. *Análise comparativa das folhas 5, 6 e 7*

Quando se comparou, por meio análise de variância (ANOVA), a espessura média dos tecidos foliares da quinta, sexta e sétima folhas que se desenvolveram durante o inverno (25/08 a

22/09/2006), observaram-se poucas diferenças entre as folhas 5 e 7 e nenhuma diferença entre as folhas 5 e 6 e 6 e 7. Esta última (folha 7) apresentou limbo menos espesso, tanto nas plantas expostas no Parque do Ibirapuera quanto naquelas que permaneceram na Casa de vegetação (figura 15A-B). Nas plantas do Parque do Ibirapuera foi possível relacionar tal redução com a menor espessura do parênquima paliçádico (figura 15A). Quanto aos demais parâmetros avaliados, as folhas 5, 6 e 7 não apresentaram diferenças (figura 15 C-E), exceto quanto à densidade estomática da superfície abaxial da folha 7, nas plantas mantidas em Casa de vegetação, que se apresentou maior, embora o índice estomático não tenha variado entre as diferentes folhas (figura 15F).

Na exposição da primavera (14/11 a 11/12/2006), as folhas 5, 6 e 7 também apresentaram poucas diferenças, tanto nas plantas mantidas no Parque Ibirapuera quanto na Casa de vegetação (figura 16A-F). No Parque do Ibirapuera, a folha 5 apresentou menor porcentagem de parênquima lacunoso (figura 16C) e na Casa de vegetação a folha 7 apresentou menor espessura do limbo e do parênquima paliçádico (figura 16B), além de maior densidade estomática, quando comparada à folha 5 (figura 16F).

As diferenças constatadas entre as folhas 5, 6 e 7 não foram acentuadas, porém a folha 7 apresentou-se mais delgada e com maior densidade de estômatos na superfície abaxial em relação à folha mais velha.

3.3.2. *Análise individualizada das folhas 5, 6 e 7 ao longo do tempo (inverno e primavera)*

Foi feita separadamente, ao longo dos dois períodos de exposição, a comparação dos parâmetros quantitativos das folhas 5, 6 ou 7, tanto nas plantas do Parque do Ibirapuera como naquelas da Casa de vegetação. Empregou-se, para tanto, análise de variância (ANOVA).

Os resultados mostraram apenas diferenças individuais entre as 24 plantas analisadas e nenhuma tendência quanto a um padrão de desenvolvimento das folhas 5, 6 e 7 – (resultados apresentados no Anexo 1). Dessa forma optou-se por reunir, nas análises subseqüentes, os dados conjuntos dessas folhas.

Foi feita então a análise ao longo do tempo, considerando a média das três folhas, não sendo encontrada, da mesma forma, nenhuma tendência (Anexo 2).

3.3.3. *Análise comparativa das plantas do Parque Ibirapuera e da Casa de vegetação no inverno e na primavera*

Considerando os valores médios conjuntos das folhas 5, 6 e 7 das plantas de *I. nil* analisadas, numa mesma estação do ano, não houve diferenças estatisticamente significativas quanto aos parâmetros avaliados, tanto nas plantas mantidas no Parque do Ibirapuera como nas Casa de vegetação (ANOVA fatorial) (figuras 17, 18 e tabela 3). Contudo tais diferenças foram observadas quando se compararam as plantas das duas estações (figuras 17-19 e tabela 3).

As folhas que se desenvolveram no inverno apresentaram menor espessura do limbo, das células epidérmicas das duas superfícies e dos parênquimas paliçádico e lacunoso, quando comparadas àquelas expostas na primavera (figura 17).

Além disso, as plantas expostas durante o inverno apresentaram maior porcentagem de células epidérmicas, menor proporção de tecidos fotossintetizantes, tanto no que diz respeito ao parênquima paliçádico quanto ao lacunoso, além de maior proporção de espaços intercelulares, em relação às que cresceram na primavera (figura 19).

Ao se comparar as plantas expostas no inverno e na primavera, notou-se, nestas últimas, maior densidade estomática e maior índice estomático, em ambas as superfícies (figura 18).

A análise de componentes principais (ACP) realizada para a espessura dos tecidos, explicou 84,08% da variabilidade dos dados nos eixos um e dois, sendo que o eixo um explicou 70,82% desta variabilidade e o eixo dois 13,26%. A espessura do limbo, do parênquima paliçádico e do parênquima lacunoso apresentou uma forte relação com o eixo um, enquanto a espessura das células epidérmicas, tanto na superfície adaxial quanto na abaxial mostrou maior relação com o eixo 2 (tabela 4).

A análise dos componentes principais (figura 20) mostra que existe uma sazonalidade

marcante para todas as variáveis. As unidades amostrais da primavera estiveram associadas a valores mais altos de todas as variáveis analisadas, enquanto que as do inverno estiveram associadas aos baixos valores destas. Nota-se uma distinção clara entre o grupo de valores da primavera e do inverno, podendo-se separar claramente as duas estações.

Para a porcentagem de tecidos foliares, a ACP explicou 74,72% da variabilidade dos dados nos eixos um e dois, sendo que o eixo um explicou 52,36% desta variabilidade e o eixo dois 22,36%. Os valores de espaço intercelular do parênquima paliçádico apresentaram uma forte relação com o eixo um, enquanto que outros valores apresentaram relação variada entre os eixos um e dois (tabela 5).

A análise dos componentes principais mostrou que existe uma sazonalidade marcante para todas as variáveis. As unidades amostrais da primavera estiveram associadas a altos valores quanto as proporções de parênquima paliçádico e lacunoso, enquanto que as do inverno estiveram associadas a valores mais altos dentre as outras variáveis analisadas. Nota-se novamente uma distinção clara entre o grupo de valores da primavera e do inverno, podendo-se separar claramente as duas estações (figura 21).

A análise de componentes principais (ACP) realizada para a densidade estomática e o índice estomático explicou 96,24% da variabilidade dos dados nos eixos um e dois, sendo que o eixo um explicou 75,72% desta variabilidade e o eixo dois 20,52%. Os valores de densidade estomática e índice estomático na superfície adaxial apresentaram uma forte relação com o eixo um, enquanto que densidade estomática e índice estomático na superfície abaxial apresentaram forte relação com o eixo dois (tabela 6).

A análise dos componentes principais mostrou a existência de uma sazonalidade para todas as variáveis. As unidades amostrais da primavera estiveram associadas a altos valores de todas as variáveis analisadas, enquanto que as do inverno estiveram associadas aos baixos valores destas. Nota-se uma distinção entre o grupo de valores da primavera e do inverno, podendo-se separar duas estações (figura 22).

Tabela 1. Valores médios (mínimo – máximo) de O_3 ($\mu g\ m^{-3}$), NO_2 ($\mu g\ m^{-3}$) NO ($\mu g\ m^{-3}$), umidade relativa do ar (%), temperatura ($^{\circ}C$) e radiação global ($W\ m^{-2}$) no Parque do Ibirapuera durante as campanhas realizadas: inverno (25/08 a 22/09/2006) e primavera (14/11 a 11/12/2006). Fonte CETESB (2007).

	Inverno	Primavera
O_3	39,3 (0 – 192)	30,2 (0 – 221)
NO_2	63,7 (8 – 248)	49,3 (12 – 164)
NO	29,1 (0 – 714)	12,3 (0 – 154)
Umidade relativa do ar	75,2 (26,6 – 98,3)	83,0 (41,1 – 99)
Temperatura	21,1 (9,7 – 32,2)	21,3 (12,7 – 30,9)
Radiação Global	172,7 (1 – 958)	186,8 (1 – 1074)

Tabela 2. Valores médios (mínimo – máximo) de umidade relativa do ar (%) e temperatura ($^{\circ}C$) na Casa de vegetação durante o inverno (25/08 a 22/09/2006) e a primavera (14/11 a 11/12/2006). Fonte: Ferreira (2007).

	Inverno	Primavera
Umidade relativa do ar	66 (18 - 87)	72 (28 - 87)
Temperatura	23,4 (16,1 - 34,5)	27,9 (19,2 - 34,0)

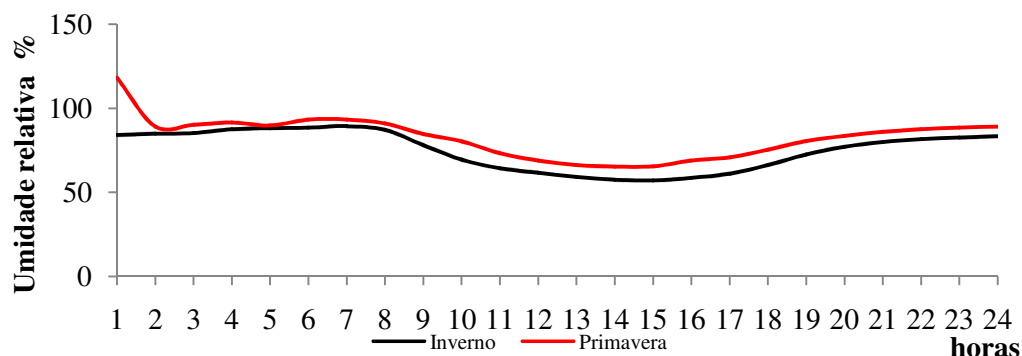


Figura 8. Média horária da umidade relativa do ar (%) no Parque do Ibirapuera durante os períodos de 25/08 a 22/09/2006 (inverno) e 14/11 a 11/12/2006 (primavera). Fonte CETESB (2007)

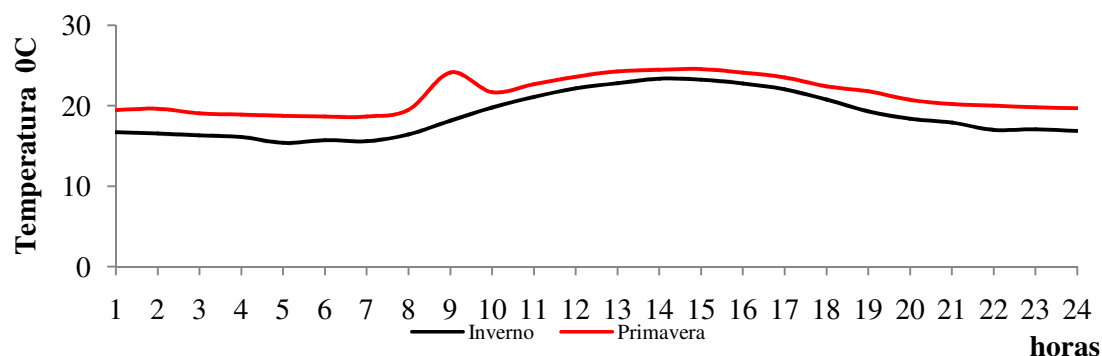


Figura 9. Média horária de temperatura (°C) no Parque do Ibirapuera durante os períodos de 25/08 a 22/09/2006 (inverno) e 14/11 a 11/12/2006 (primavera). Fonte CETESB (2007)

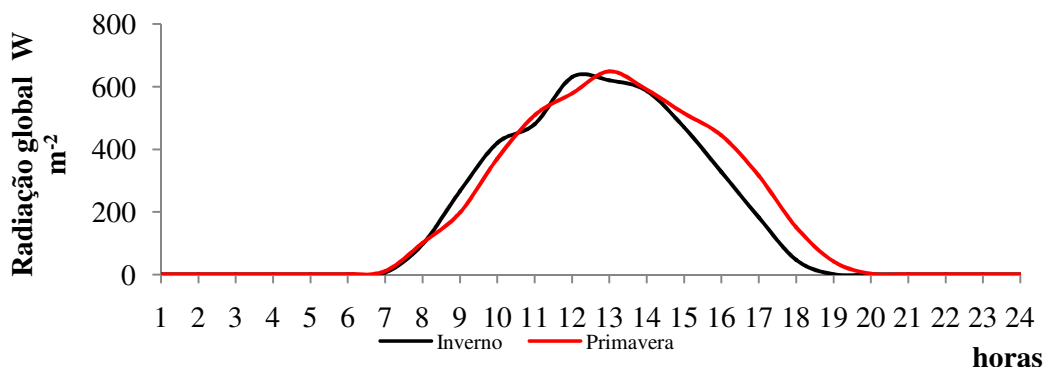


Figura 10. Média horária de radiação global (W m^{-2}) no Parque do Ibirapuera durante os períodos de 25/08 a 22/09/2006 (inverno) e 14/11 a 11/12/2006 (primavera). Fonte CETESB (2007)

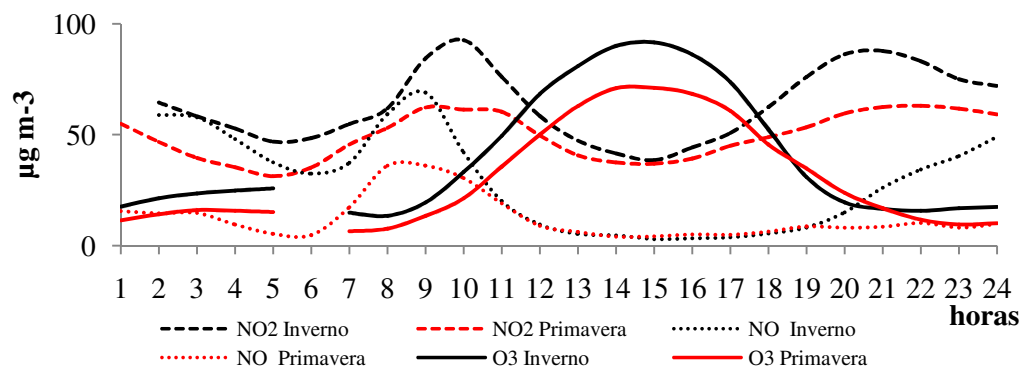


Figura 11. Média horária de NO_2 ($\mu\text{g m}^{-3}$) NO ($\mu\text{g m}^{-3}$) e O_3 ($\mu\text{g m}^{-3}$) no Parque do Ibirapuera durante os períodos de 25/08 a 22/09/2006 (inverno) e 14/11 a 11/12/2006 (primavera). Fonte CETESB (2007)

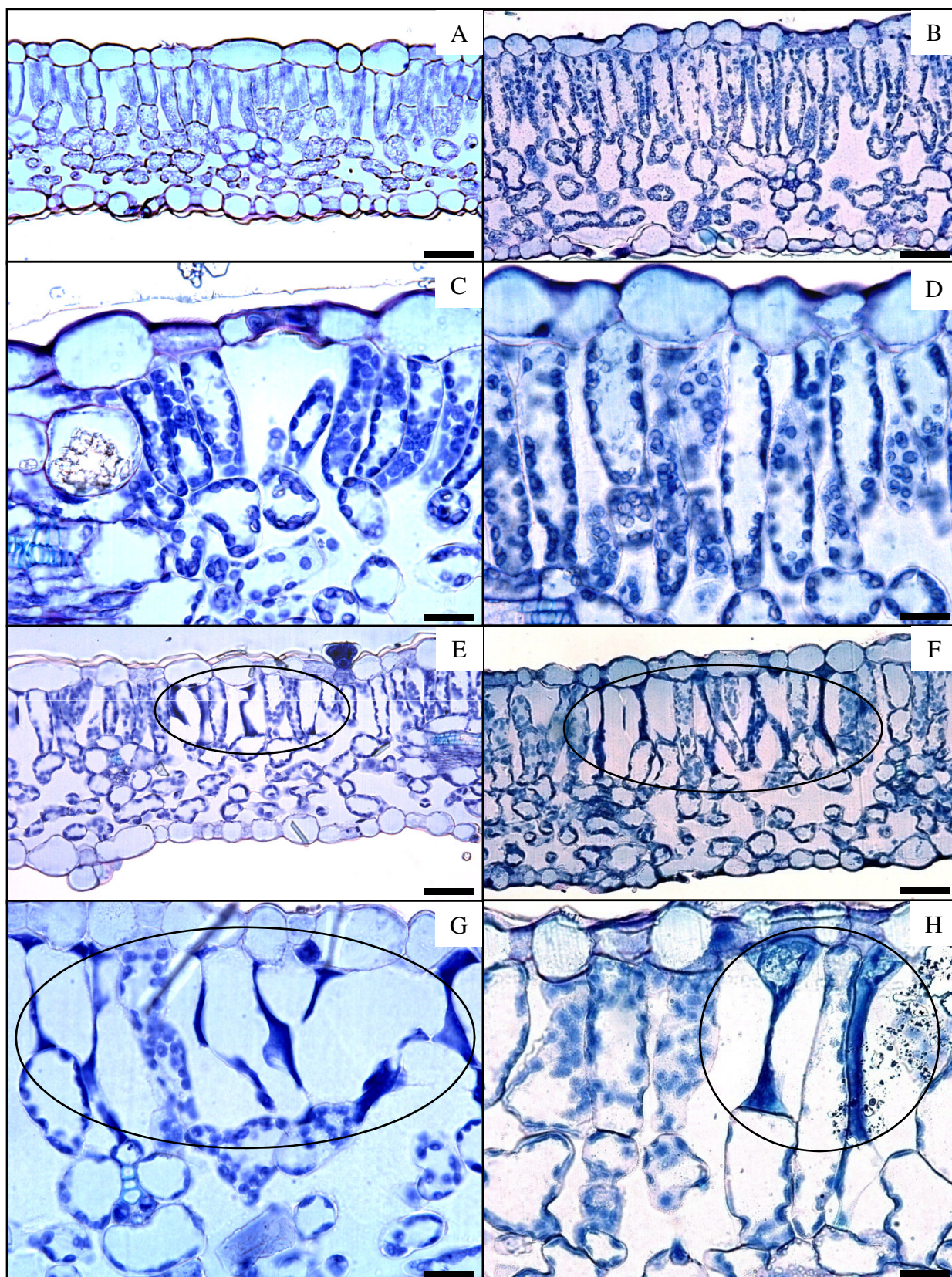


Figura 12. Secção transversal da folha de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara. A-D. folhas de plantas que permaneceram em Casa de vegetação com células do parênquima paliçádico sem sintomas de estresse oxidativo (A e C inverno, B e D primavera), E-H. folhas de plantas que permaneceram no Parque do Ibirapuera evidenciando resposta de hipersensibilidade decorrente de estresse oxidativo (elipses) (E e G inverno, e F e H primavera). A, B, e E, F. Escala = 50 µm. C, D, G, H Escala = 20 µm.

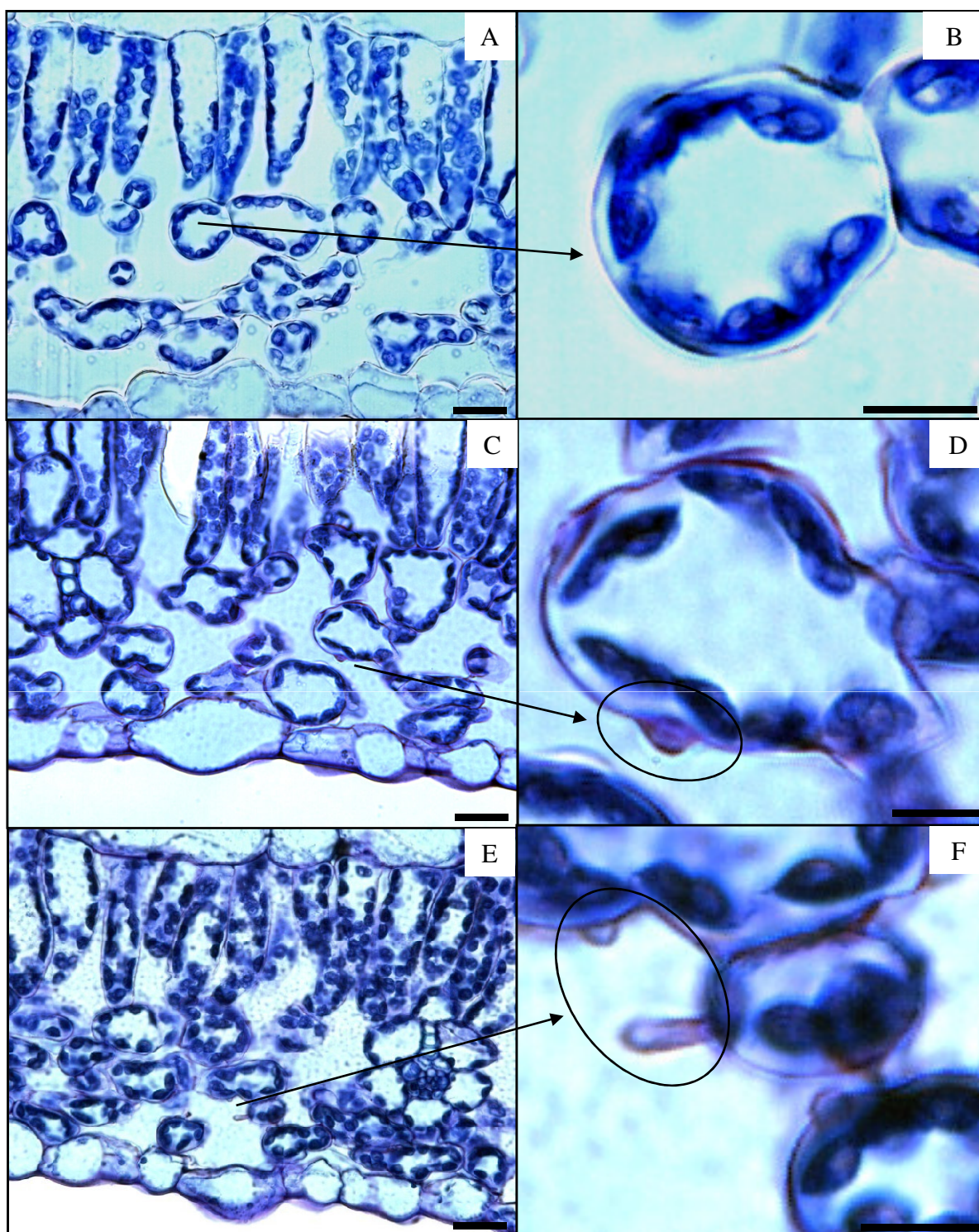


Figura 13. Secção transversal da folha de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara. A. folhas de plantas que permaneceram em Casa de vegetação com células do parênquima lacunoso sem protrusões nas paredes, em B. seta evidenciando a parede celular. C-E. folhas de plantas que permaneceram no Parque do Ibirapuera, em D e F, detalhes das protrusões nas paredes celulares como resposta decorrentes de estresse oxidativo. A, C e E Escala = 20 μm B, D e F Escala = 10 μm

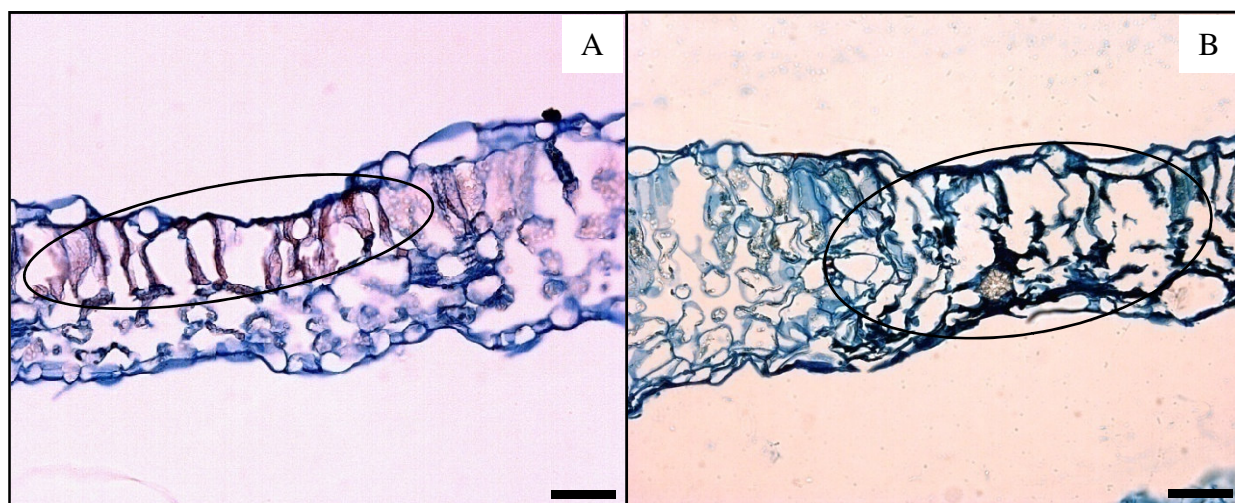


Figura 14. Secção transversal da folha de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara evidenciando necroses decorrentes de estresse oxidativo (elipses) em plantas mantidas no Parque do Ibirapuera. A. inverno e B. primavera. Escala = 50µm

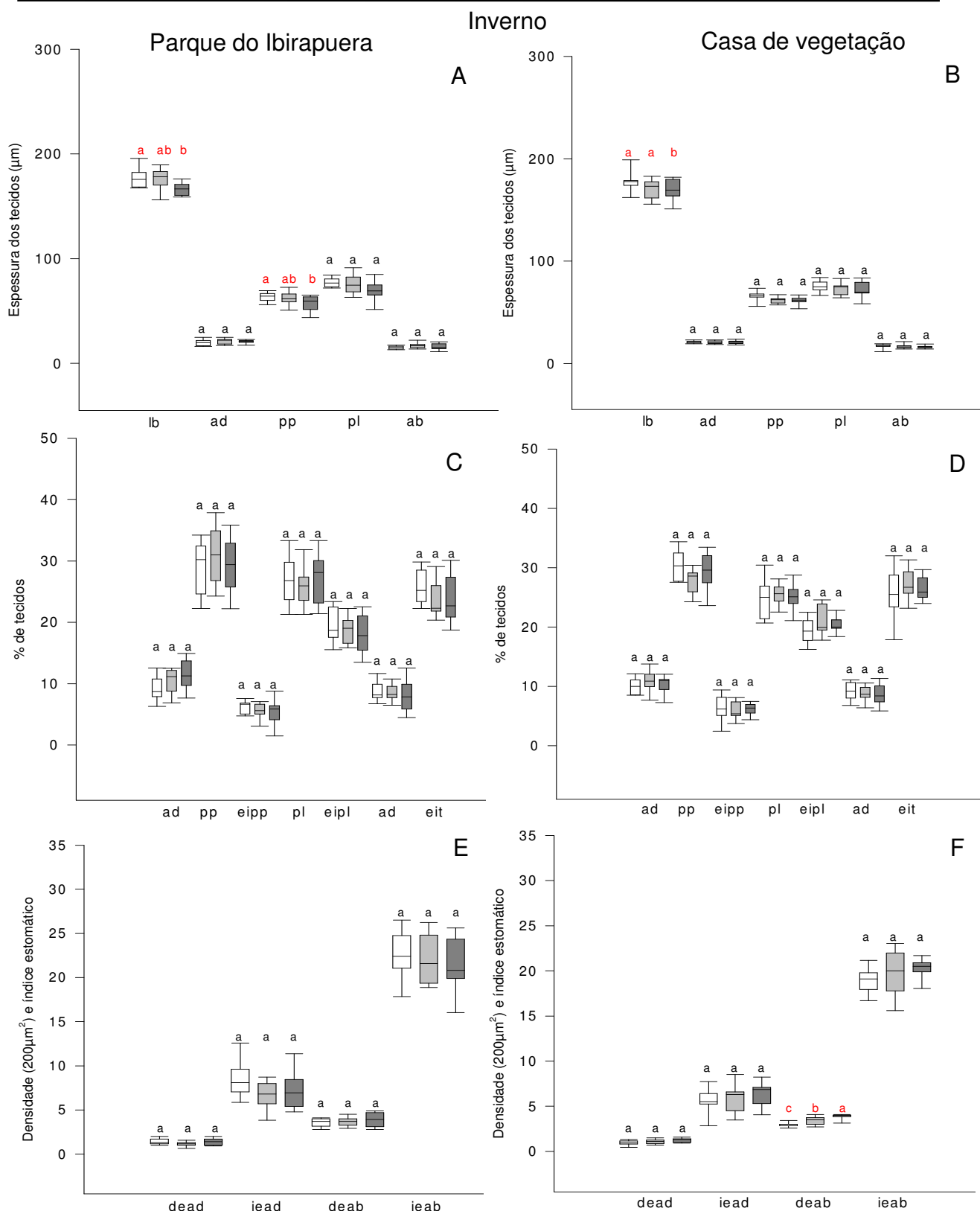


Figura 15. Diferença entre as 5^a (□) 6^a (■) e 7^a (■) folhas amostradas no inverno. A – B. espessura dos tecidos. C – D. % de tecidos. E – F. densidade e índice estomático. Legendas: lb = limbo; ad = superfície adaxial; pp = parênquima paliçádico; eipp = espaço intercelular do parênquima paliçádico; pl = parênquima lacunoso; eipl = espaço intercelular do parênquima lacunoso; ab = superfície abaxial; eit = espaço intercelular total; deab = densidade estomática na superfície adaxial; dead = densidade estomática na superfície adaxial; iead = índice estomático na superfície adaxial; ieab = índice estomático na superfície abaxial. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

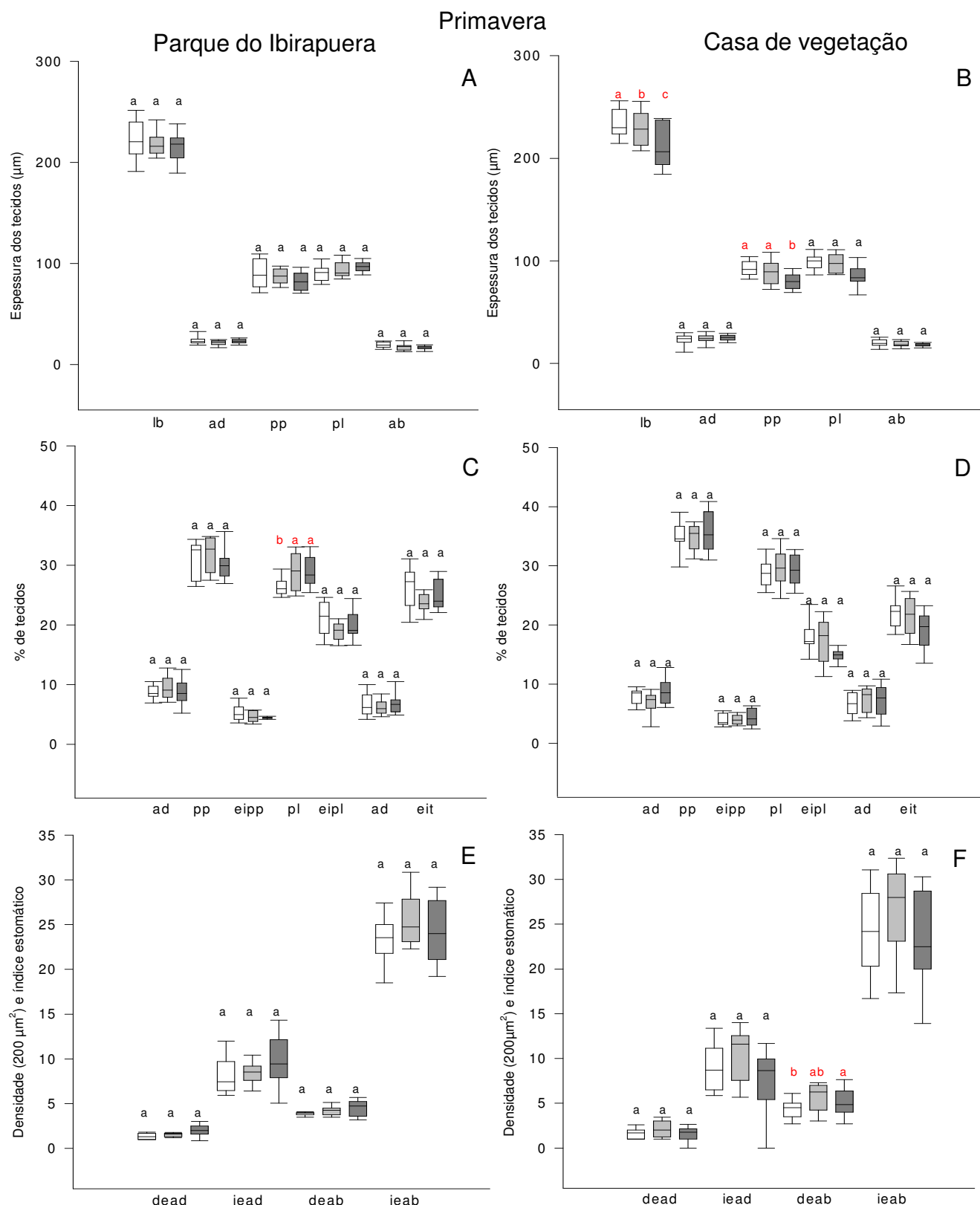


Figura 16. Diferença entre as 5^a (□) 6^a (■) e 7^a (■) folhas amostradas no inverno. A – B. espessura dos tecidos. C – D. % de tecidos. E – F. densidade e índice estomático. Legendas: lb = limbo; ad = superfície adaxial; pp = parênquima paliçádico; eipp = espaço intercelular do parênquima paliçádico; pl = parênquima lacunoso; eipl = espaço intercelular do parênquima lacunoso; ab = superfície abaxial; eit = espaço intercelular total; deab = densidade estomática na superfície adaxial; dead = densidade estomática na superfície adaxial; iead = índice estomático na superfície adaxial; ieab = índice estomático na superfície abaxial. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

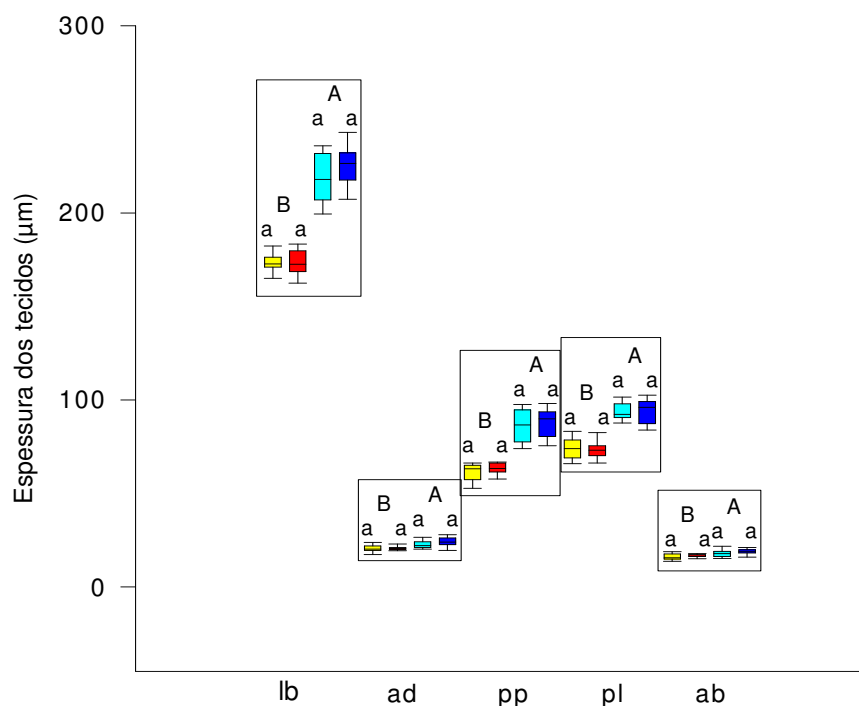


Figura 17. Espessura dos tecidos das plantas amostradas nas diferentes estações do ano. ■ Parque do Ibirapuera – inverno, ■ Casa de Vegetação – inverno, ■ Parque do Ibirapuera - primavera, ■ Casa de vegetação – primavera. Legendas: lb = limbo; ad = superfície adaxial; pp = parênquima paliádico; pl = parênquima lacunoso; ab = superfície abaxial. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas, minúsculas comparam os diferentes locais de exposição e maiúsculas as estações do ano ($P < 0,05$).

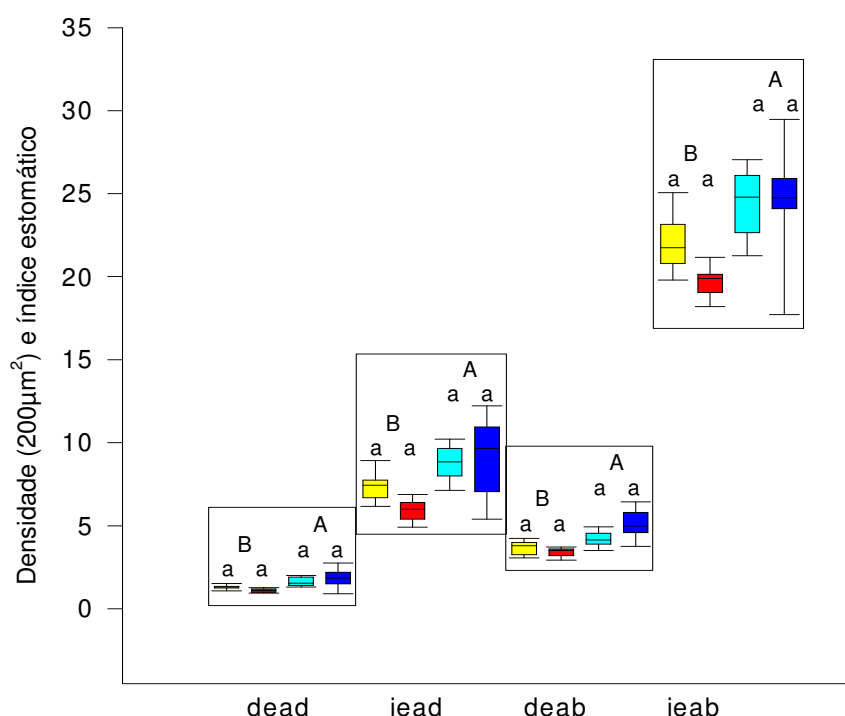


Figura 18. Densidade e índice estomático das plantas amostradas nas diferentes estações do ano. ■ Parque do Ibirapuera – inverno, ■ Casa de Vegetação – inverno, ■ Parque do Ibirapuera - primavera, ■ Casa de vegetação – primavera. Legendas: deab = densidade estomática na superfície adaxial; dead = densidade estomática na superfície adaxial; iead = índice estomático na superfície adaxial; ieab = índice estomático na superfície abaxial. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas, minúsculas comparam os diferentes locais de exposição e maiúsculas as estações do ano ($P < 0,05$).

Tabela 3. Proporção de tecidos das plantas amostradas nos diferentes locais de exposição. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

	% de tecidos	
	Parque do Ibirapuera	Casa de vegetação
	Inverno	
ad	10.4 ± 1.3 a	10.7 ± 0.7 a
pp	29.2 ± 3.7 a	29.2 ± 1.5 a
eipp	5.7 ± 1.1 a	5.8 ± 1.2 a
pl	26.4 ± 2.9 a	25.4 ± 1.2 a
eipl	19.9 ± 1.8 a	19.7 ± 1.1 a
ab	8.4 ± 0.5 a	8.6 ± 0.4 a
eit	25.5 ± 1.8 a	25.6 ± 2.1 a
	Primavera	
	Parque do Ibirapuera	Casa de vegetação
ad	6.6 ± 1.5 a	7.0 ± 0.7 a
pp	31.1 ± 1.0 a	35.1 ± 1.0 a
eipp	4.8 ± 0.6 a	4.1 ± 0.5 a
pl	28.1 ± 2.2 a	29.2 ± 1.2 a
eipl	20.0 ± 1.4 a	16.8 ± 1.0 a
ab	9.0 ± 0.4 a	7.9 ± 0.8 a
eit	24.9 ± 1.8 a	20.8 ± 0.7 a

ad = superfície adaxial; pp = parênquima paliçádico; eipp = espaço intercelular do parênquima paliçádico; pl = parênquima lacunoso; eipl = espaço intercelular do parênquima lacunoso; ab = superfície abaxial; eit = espaço intercelular total.

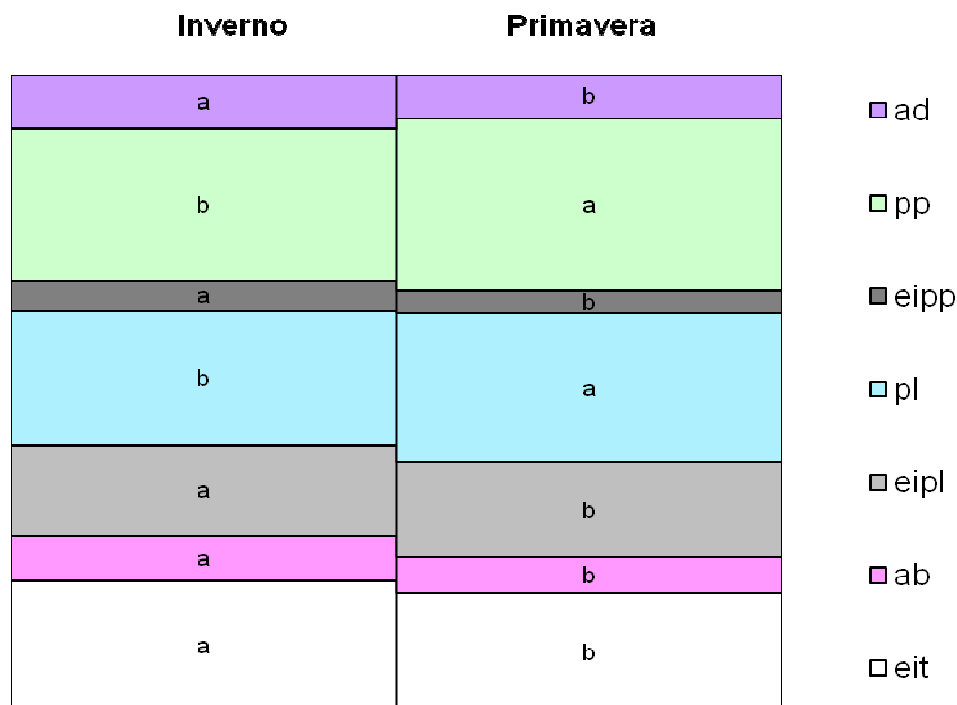


Figura 19. Proporção de tecidos das plantas amostradas nas diferentes estações do ano. ■ ad = superfície adaxial; ■ pp = parênquima paliçádico; ■ eipp = espaço intercelular no parênquima paliçádico; ■ pl = parênquima lacunoso; ■ eipl = espaço intercelular no parênquima lacunoso; ■ ab = superfície abaxial; □ eit = espaço intercelular total. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Tabela 4. Relação dos valores médios da espessura dos tecido com os eixos um e dois da análise de componentes principais.

	Eixo 1	Eixo 2
ms	0.4883	-0.0282
pp	0.6699	-0.3281
pl	0.4775	-0.0756
ad	0.2384	0.8539
ab	0.1671	0.3959

ms = mesofilo; ad = superfície adaxial; pp = parênquima paliçádico; pl = parênquima lacunoso; ab. superfície abaxial

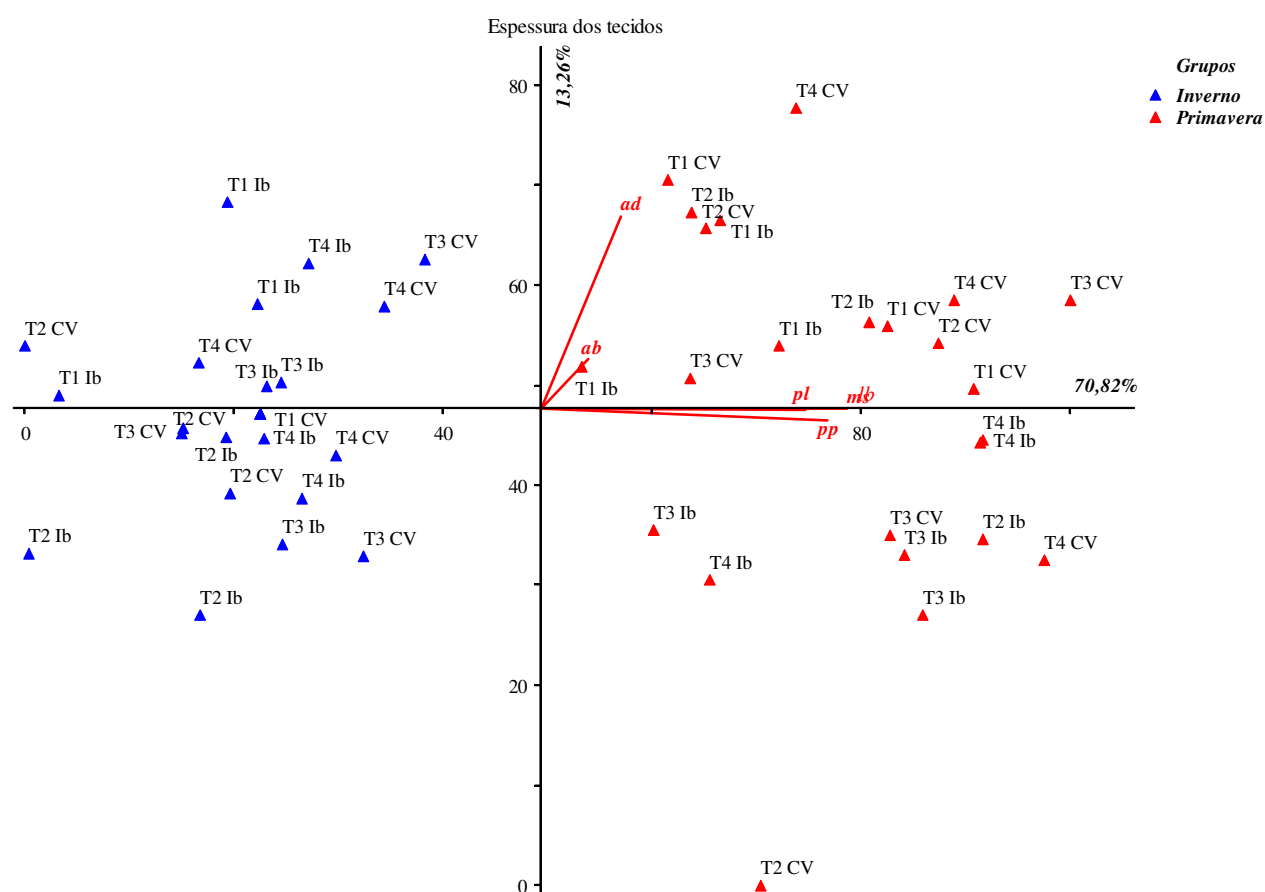


Figura 20. Análise de componentes principais para espessura dos tecidos em folhas de plantas de *Ipomoea nil* 'Scarlat O'Hara em quatro coletas (T1 – T4). Ib = Ibirapuera; CV = Casa de vegetação. ms = mesofilo; ad = superfície adaxial; pp = parênquima paliçádico; pl = parênquima lacunoso; ab = superfície abaxial.

Tabela 5. Relação dos valores médios da porcentagem de tecidos com os eixos um e dois da análise de componentes.

	Eixo 1	Eixo 2
ad	-0.3866	0.0966
pp	0.3106	0.1026
eipp	-0.6703	-0.3812
pl	0.1970	-0.1438
eipl	-0.1356	-0.2521
ab	-0.4182	0.8185
eit	-0.2891	-0.2841

ad = superfície adaxial; pp = parênquima paliçádico; eipp = espaço intercelular do parênquima paliçádico; pl = parênquima lacunoso; eiopl = espaço intercelular do parênquima lacunoso; ab = superfície abaxial; eit = espaço intercelular total.

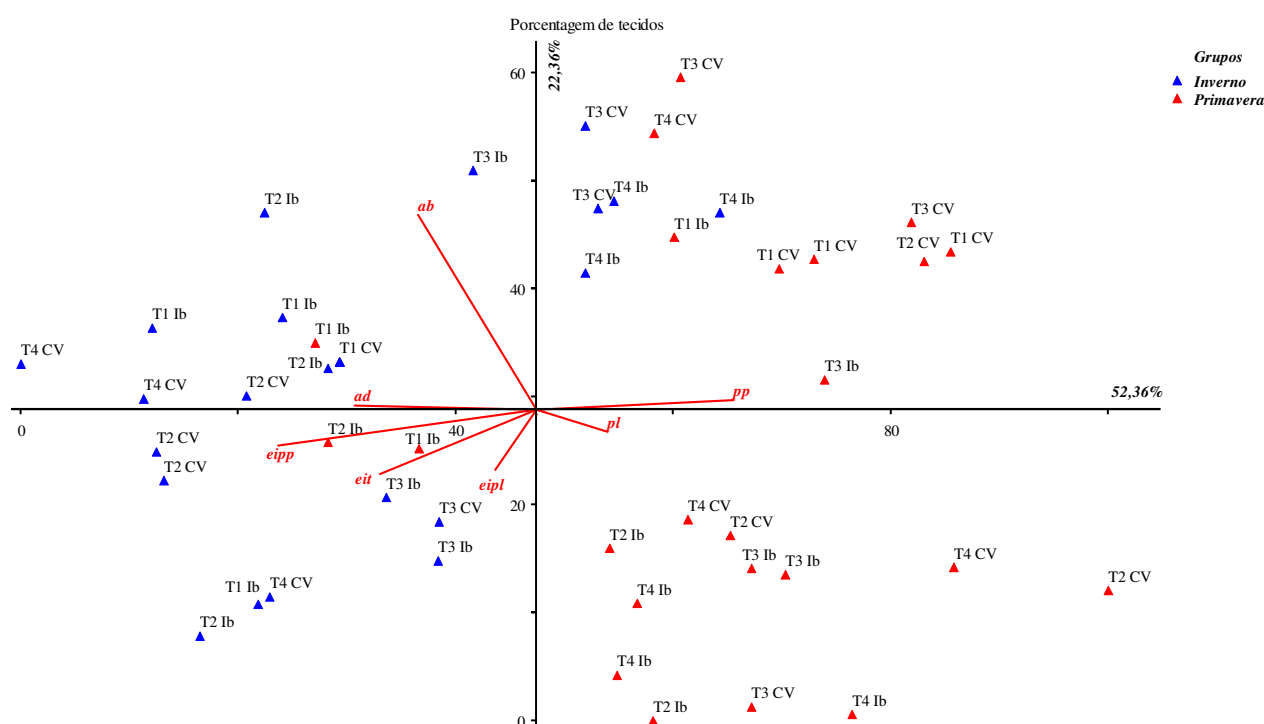


Figura 21. Análise de componentes principais para espessura dos tecidos em folhas de plantas de *Ipomoea nil* 'Scarlat O'Hara em quatro coletas (T1 – T4). Ib = Ibirapuera; CV = Casa de vegetação; ad = superfície adaxial; pp = parênquima paliçádico; eipp = espaço intercelular do parênquima paliçádico; pl = parênquima lacunoso; eiopl = espaço intercelular do parênquima lacunoso; ab = superfície abaxial; eit = espaço intercelular total.

Tabela 6. Relação dos valores médios da espessura dos tecido com os eixos um e dois da análise de componentes.

	Eixo 1	Eixo 2
dead	0,5468	-0.1867
iead	0.6676	-0.4896
deab	0.4033	0.6367
ieab	0.3043	0.5657

deab = densidade estomática na superfície adaxial; dead = densidade estomática na superfície adaxial; iead = índice estomático na superfície adaxial; ieab = índice estomático na superfície abaxial.

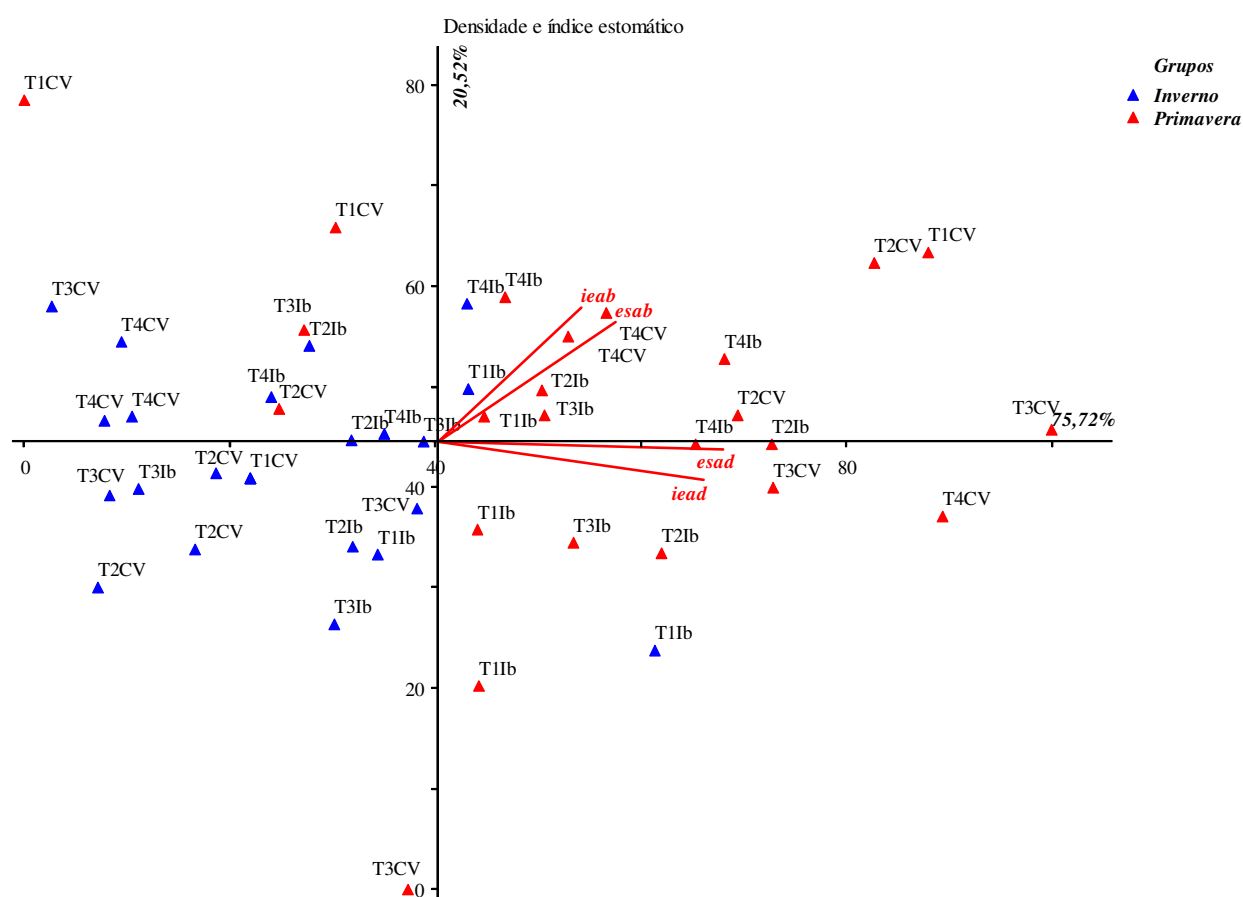


Figura 22. Análise de componentes principais para espessura dos tecidos em folhas de plantas de *I. nil* 'Scarlat O'Hara em quatro coletas (T1 – T4). Ib = Ibirapuera; CV = Casa de vegetação; dead = densidade estomática na superfície adaxial; deab = densidade estomática na superfície abaxial; iead = índice estomático na superfície adaxial; ieab = índice estomático na superfície abaxial.

4. Discussão

Antes de se discutir as respostas qualitativas e quantitativas observadas em plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara expostas na cidade de São Paulo é importante caracterizar a situação ambiental às quais as mesmas foram submetidas.

Na cidade de São Paulo, a poluição do ar apresenta aspectos sazonais marcantes, altamente influenciados pelas condições meteorológicas. Destacam-se duas estações climáticas bem definidas: uma estação chuvosa, centrada nos meses de primavera e verão, quando há uma elevação da incidência de radiação solar e as concentrações de ozônio tendem a ultrapassar o padrão da qualidade do ar, e uma estação seca caracterizada por concentrações altas de poluentes, exceto o ozônio, devido à diminuição da temperatura e da radiação solar incidente (CETESB 2005).

O ano de 2006 apresentou-se atípico quanto aos aspectos climáticos marcantes de cada estação, uma vez que a radiação global não diferiu acentuadamente no inverno e na primavera, o mesmo acontecendo com a temperatura média. Apesar da primavera ter apresentado temperatura e umidade relativa do ar médias, ao longo das 24 horas do dia, superiores à estação do inverno, neste último período houve uma maior concentração de ozônio e de seus precursores. Devido a essa maior concentração de precursores no inverno, associada a valores altos de radiação, comparáveis aos da primavera, ocorreram picos de ozônio, que perduraram por um período maior durante todo o dia.

Devido às altas concentrações de ozônio existentes na região do Parque do Ibirapuera (cidade de São Paulo), foi possível notar em plantas de *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara ali expostas a presença de sintomas visíveis característicos do O₃ em diversas folhas. Grande parte das amostras analisadas apresentava-se assintomática, porém, microscopicamente, foi possível observar uma resposta semelhante à de hipersensibilidade ("HR-like", sigla em inglês), tanto nas plantas expostas no inverno como na primavera; tal resposta foi encontrada em praticamente todas as amostras de

plantas que permaneceram expostas no Parque do Ibirapuera, não sendo evidenciadas em nenhuma das amostras das plantas que permaneceram na Casa de vegetação.

De acordo com Günthardt-Goerg & Vollenweider (2007) a resposta de hipersensibilidade é um tipo de morte celular programada (MCP ou PCD, em inglês) e representa um mecanismo de defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos. Esta pode ser observada em diferentes interações planta-patógeno e consiste numa resposta intensa de plantas a infecções microbianas, no sentido de restringir o desenvolvimento dos patógenos no tecido saudável. Quando o indutor da morte celular programada é um agente abiótico, a mesma é chamada de resposta semelhante à de hipersensibilidade (“HR-like”). O ozônio tem sido descrito como um indutor de resposta semelhante à de hipersensibilidade. Os mesmos autores definem os critérios para identificar a “HR-like”: ausência de patógenos, restrição da MCP a um pequeno grupo de células, ruptura dos conteúdos celulares, degeneração do núcleo e máxima condensação da cromatina, colapso das paredes celulares e degradação incompleta dos remanescentes celulares e sua condensação em corpos similares aos apoptóticos, como consequência da morte celular rápida. Muitos autores descrevem a “HR-like” em plantas submetidas ao ozônio. Vollenweider *et al.* (2003) trabalhando com *Robinia pseudoacacia* observaram o colapso das células do parênquima paliçádico e a degradação incompleta dos componentes celulares, sendo que as organelas permanecem identificáveis nas células necrosadas, ocorrendo, por fim, a morte celular. De acordo Gravano *et al.* (2003) esse tipo de sintoma é observado normalmente em regiões localizadas, especialmente no parênquima paliçádico, ocorrendo em grupos isolados de células. Tal resposta vem sendo utilizada de maneira a validar os sintomas microscópicos provocados pelo O₃, sendo geralmente encontrada em amostras assintomáticas.

Cabe ainda destacar que a morte celular decorrente da exposição a altas concentrações de O₃ pode ser detectada por meio de técnicas histoquímicas (Iriti & Faoro 2005) e é consequência de alterações nos processos metabólicos das plantas, onde muitas vezes pode ocorrer acúmulo de H₂O₂ nos tecidos foliares (Iriti *et al.* 2003, Iriti *et al.* 2006, Thordal-Cristensen *et al.* 1997, Schraudner *et*

al. 1998, Pellinen *et al.* 1999); além disso o O₃ é capaz de desregular o metabolismo celular (Peters *et al.* 1988), podendo modificar a atividade da rubisco, acarretando, em consequência, um decréscimo fotossintético (Pell *et al.* 1992, Eckardt & Pell 1994).

A resposta de hipersensibilidade em *Ipomoea nil* ocorreu exclusivamente em células do parênquima paliçádico, nas folhas 5, 6 e 7 expostas no Parque do Ibirapuera, tanto no inverno como na primavera, em porções distintas e isoladas de células, sendo possível observar a presença de organelas distintas dentro das células colapsadas como se vê na figura 12H, o que está de acordo com a literatura. Não foram observadas alterações no tecido condutor, o que demonstra que tais sintomas ocorrem entre nervuras e nunca sobre elas.

Nas folhas 5, 6 e 7 de *Ipomoea nil*, tanto no inverno quanto na primavera, também foi possível observar a presença de protrusões nas paredes celulares. Tais protrusões ocorreram preferencialmente nas células do parênquima lacunoso e foram evidenciadas somente nas plantas que permaneceram no Parque do Ibirapuera.

A presença de protrusões em plantas submetidas ao ozônio é conhecida e citada por diversos autores. Günthardt-Goerg *et al.* (2000) relataram o aparecimento de protrusões pécticas e incrustações fenólicas em *Prunus serotina* submetida a níveis críticos de O₃, descrevendo também outros sintomas, como o aparecimento de invaginações nas paredes de células do parênquima, presença de conteúdo celular condensado, colapsado celular antes mesmo da realocação dos conteúdos celulares e plasmólise das células. Reig-Armiñana *et al.* (2004), em *Pistacia lentiscus* coletada em ambiente submetido a altas concentrações de O₃, na região do Mediterrâneo, também descrevem o aparecimento de protrusões com o aspecto de “verrugas” nas paredes celulares de células do parênquima paliçádico e, também, a degeneração do tonoplasto e consequente desorganização celular. Günthardt-Goerg & Vollenweider (2007) relatam o aparecimento de HR-like e protrusões na parede celular em *Sambucus racemosa* como decorrentes do estresse oxidativo provocado pelo O₃. Os autores afirmam que as alterações microscópicas podem ser simultâneas ou anteriores aos

primeiros sintomas visíveis, o que é de interesse, uma vez que permite prever precocemente a sensibilidade da planta ao O₃.

Na análise de amostras sintomáticas de folhas de *Ipomoea nil* expostas no Parque do Ibirapuera notou-se, em regiões isoladas da folha, o desarranjo estrutural, tanto no parênquima paliçádico e lacunoso quanto nas células epidérmicas. Com o crescimento progressivo das injúrias visíveis, as células apresentavam-se vazias, plasmolisadas, com paredes celulares invaginadas e conteúdo celular condensado.

De uma maneira geral, os sintomas observados em *Ipomoea nil* foram os mesmos descritos pelos diferentes autores discutidos e permitem sua validação como decorrentes do ozônio. Cabe destacar, contudo, como afirma Günthardt-Goerg & Vollenweider (2006), que na validação de danos provocados por agentes abióticos deve-se buscar um conjunto de marcadores. Muita atenção deve ser dada à localização dos sintomas nos tecidos celulares afetados e deve-se combinar respostas microscópicas e fisiológicas como, também, levar em conta os sintomas visíveis, para melhor diagnóstico do agente causador do estresse. Segundo Holopainen *et al.* (1992), o ozônio é provavelmente o fator de estresse em que a avaliação microscopia dos tecidos pode ser aplicada com maior sucesso.

Considerando a avaliação quantitativa das folhas de *Ipomoea nil*, algumas poucas diferenças foram observadas em certos parâmetros. A folha 7, a mais nova, tanto no ambiente exposto ao ozônio como naquele isento desse gás, apresentou limbo menos espesso e maior densidade estomática, quando comparada à folha 5. Ferreira (2007) avaliando a produção de antioxidantes nas mesmas plantas, nos mesmos períodos, notou, em determinadas amostragens, uma tendência para a maior produção de ácido ascórbico na folha 7, quando comparada às folhas 6 e 5. O autor afirma que a folha mais nova apresentou, em média, um ritmo metabólico mais elevado pelo fato de ainda estar em desenvolvimento, o que favorece a formação de espécies ativas de oxigênio e exige uma maior eficiência do sistema de defesa antioxidativo.

Ao longo do tempo, cada uma das folhas de *Ipomoea nil* do mesmo nó não mostrou alteração, indicando que, especialmente as folhas 5 e 6, já tinham completado o seu desenvolvimento e estavam num estágio apropriado e comparável para serem avaliadas quanto à presença de sintomas decorrentes do ozônio.

Em *Ipomoea nil*, embora não tenha havido uma diferença evidente em parâmetros quantitativos da folha numa mesma estação, como se viu nos resultados, quando se compararam as folhas expostas no inverno e na primavera, algumas diferenças foram encontradas. De uma maneira geral, as folhas que se desenvolveram no inverno apresentaram menor espessura em todos os tecidos avaliados, menor porcentagem de tecido fotossintetizante, maior proporção de espaços intercelulares e menores valores de densidade e índice estomático.

Na literatura, há muitos registros de alterações quantitativas em plantas decorrentes dos fatores ambientais. Há muito tempo se discute a íntima relação existente entre a estrutura foliar e as funções fisiológicas da planta (Toth 1982), Roderick *et al.* 1999). A relação entre estrutura e fisiologia é particularmente importante quando se avalia o efeito de poluentes fitotóxicos na planta como discutido por Oksanen *et al.* (2001) que relacionaram as características estruturais de diferentes clones de *Betula papyrifera* e, com base nos resultados, estabeleceram o grau de sensibilidade ao O₃ dos diferentes clones.

Ljubešić & Britvec (2006), em folhas de *Vitis vinifera*, e Prozherina *et al.* (2003) em folhas de *Betula pendula*, observaram maior espessura do mesófilo em plantas submetidas ao O₃, o que demonstra que plantas com folhas mais espessas apresentam aclimação em situação de estresse, uma vez que existe uma associação positiva entre a espessura da folha e a fotossíntese (Slaton & Smith 2002). Com base nessa informação, e levando-se em conta que as plantas de *Ipomoea nil* que se desenvolveram na estação da primavera se apresentaram mais espessas e com maior proporção de tecidos fotossintetizantes, entende-se que tal grupo de plantas apresentou maior capacidade de metabolizar substâncias que pudessem servir como inibidores dos processos de oxidação gerados pelo O₃. Ferreira (2007) confirmou tal suposição, uma vez que, ao analisar as mesmas plantas de *I.*

nil estudadas no presente trabalho, observou os maiores valores de antioxidantes nas plantas de primavera, quando comparadas às de inverno.

Pääkkönen *et al.* (1995b), trabalhando com *Betula pendula* Roth. sugeriram que uma menor espessura do mesófilo e uma maior quantidade de espaços intercelulares podem estar relacionadas com alta sensibilidade ao ozônio. De acordo com Evans *et al.* (1996), plantas com mais espaços intercelulares apresentam uma condição ideal para a difusão uniforme dos gases, incluindo-se aí os poluentes, uma vez que os espaços intercelulares representam a real superfície de absorção dos gases. O desenvolvimento destes espaços está correlacionado, segundo Rhizopoulou & Psaras (2003) com as condições de luminosidade presentes durante o período de crescimento da espécie.

Segundo Pääkkönen *et al.* (1995a), no processo de aclimação, para tolerar os efeitos oxidativos do O₃, as folhas tendem a diminuir a área relativa dos espaços intercelulares, como um possível mecanismo de compensação para reduzir a difusão do O₃ dentro da folha. Além disso, outras alterações podem ser constatadas, como aquelas descritas por Pääkkönen *et al.* (1995b) em *Betula pendula*. Folhas dessa espécie após exposição, por longos períodos, a baixos índices de O₃, apresentaram redução na porcentagem de células epidérmicas na superfície adaxial e aumento da densidade estomática, tanto em plantas mantidas em câmaras de fumigação quanto em experimentos em campo.

Ipomoea nil desenvolvida na primavera apresentou essas mesmas tendências, ou seja, redução dos espaços intercelulares, da espessura das células epidérmicas e maior densidade estomática. Tais resultados explicam aqueles obtidos por Ferreira (2007) para as mesmas plantas, que observou menor proporção de danos visíveis nas plantas da primavera em comparação com aquelas que se desenvolveram no inverno. Essas últimas, do ponto de vista estrutural, apresentaram características que representam uma menor capacidade de defesa, como menor proporção de tecido funcional (parênquima paliádico e lacunoso) responsável pelo metabolismo de substâncias como antioxidantes, que neutralizam os danos gerados pelo ozônio, e mais espaços intercelulares por onde os gases são difundidos com maior facilidade.

Na literatura, há estudos que relacionam o aumento na densidade estomática em plantas submetidas ao ozônio (Pääkkönen *et al.* 1995b, Vanhatalo *et al.* 2001). Contudo, em *I. nil* não houve diferença estatisticamente significativa quanto à densidade e índice estomático entre as plantas expostas ao ozônio no Parque do Ibirapuera e aquelas mantidas em Casa de vegetação com ar filtrado, porém houve diferenças entre as plantas do inverno e da primavera. Lawson *et al.* (2002) explicam que uma maior densidade estomática pode ser um mecanismo que propicia à planta uma maior eficiência nos processos de trocas gasosas.

Com base nos resultados verificou-se que as plantas de *I. nil*, que se desenvolveram na estação da primavera, apresentando maior densidade e índice estomático que as que se desenvolveram no inverno, teriam uma maior capacidade de se aclimatar às diferentes variações ambientais, incluindo-se as concentrações de gases no ambiente; por meio de mecanismos compensatórios ou aclimação, teriam a capacidade de reduzir a condutância estomática e, dessa forma, aumentar sua tolerância ao O₃.

5. Conclusões

A partir do estudo realizado conclui-se que:

- *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara apresentou sintomas microscópicos específicos usados na validação do estresse provocado pelo ozônio.
- Houve uma sazonalidade no desenvolvimento estrutural das folhas da espécie entre as duas estações do ano avaliadas, decorrentes de variações nas condições climáticas ou outros estímulos ambientais.
- *Ipomoea nil* cv. Scarlet O'Hara, como planta bioindicadora de ozônio troposférico na cidade de São Paulo, pode vir a apresentar respostas não homogêneas ao longo de diferentes situações climáticas, uma vez que pode apresentar variações estruturais que lhe conferirão maior sensibilidade ou tolerância ao ozônio.

5. Resumo

O ozônio troposférico é o mais importante poluente fotoquímico por ser muito reativo e fitotóxico. O biomonitoramento com plantas possibilita a visualização dos efeitos provocados por esse gás sendo que observações microscópicas representam uma importante ferramenta para a detecção precoce de sintomas. Com o presente trabalho, objetivou-se ampliar análises com *Ipomoea nil* L. cv. Scarlet O'Hara, auxiliando no estabelecimento de sua viabilidade como bioindicadora de ozônio em São Paulo. As plantas foram expostas por 28 dias no inverno e na primavera de 2006, no Parque do Ibirapuera - SP, local com altos índices do ozônio e em Casa de vegetação com ar filtrado. Amostras das folhas 5, 6 e 7 foram processadas seguindo técnicas usuais em anatomia vegetal, e parâmetros quantitativos e qualitativos foram avaliados. Testes estatísticos foram utilizados a fim identificar diferenças entre amostras. Em nível celular, nas plantas expostas no Parque do Ibirapuera, foram observados sintomas característicos descritos na literatura como um tipo de morte celular programada, intitulada resposta semelhante à de hipersensibilidade ("HR-like", sigla em inglês), que abrange principalmente plasmólise em células do parênquima paliçádico; presença de protrusões pécticas nas paredes celulares indicadoras de processos oxidativos foram observadas no parênquimalacunoso. Dentre as características qualitativas foi observado nas plantas que se desenvolveram no inverno, comparada àquelas da primavera, uma menor espessura dos tecidos, menor porcentagem de tecido fotossintetizante, maior proporção de espaços intercelulares e menores valores de densidade e índice estomático, características estas relacionadas a uma maior sensibilidade ao ozônio. Embora a espécie apresente sintomas que validam o estresse provocado pelo ozônio, existe uma sazonalidade no desenvolvimento estrutural das folhas em diferentes estações do ano, que pode acarretar respostas não homogêneas da planta se utilizada em programas de biomonitoramento.

Palavras-chave: oxidante fotoquímico, anatomia da folha, bioindicador, biomonitoramento

6. Abstract

The tropospheric ozone is the most important photochemical pollutant because it is very reactive and phytotoxic. The biomonitoring with plants enables the visualization of the effects caused by this gas and microscopic observations represent an important tool for early detection of symptoms. The aim of the present work is to enlarge analyses with *Ipomoea nil* L. cv. Scarlet O'Hara, assisting in the establishment of their viability as a bioindicator of ozone in Sao Paulo. The plants were exposed for 28 days in winter and spring of 2006, in the Ibirapuera Park - SP, location with high rates of ozone and also in a greenhouse with filtered air. Samples of the leaves 5, 6 and 7 were processed according usual techniques in plant anatomy, and quantitative and qualitative parameters were evaluated. Statistical tests were used to identify differences between samples. In cellular level, in plants exposed in the Ibirapuera Park, were observed specific symptoms described in the literature, as a type of programmed cell death, entitled hypersensitivity response - like ("HR-like"), identified by the plasmolysis of the palisade parenchyma cells; presence of pectic protrusions in cell walls indicating oxidative processes were observed in spongy parenchyma. Differences in qualitative characteristics was observed in plants that had developed in the winter, compared to those of the spring, a lower thickness of the tissue, the lower percentage of photosynthetic tissue, higher proportion of the intercellular spaces and smaller values of density and stomatal index, these characteristics were related to a greater sensitivity to ozone. Although the species present symptoms that validate the stress caused by ozone, there is a seasonality in the structural development of the leaves at different seasons of the year, which can cause not homogeneous responses of the plant when used in biomonitoring programmes.

Keywords: photochemical oxidant, leaf anatomy, bioindicator, biomonitoring

5. Referências

- Abrantes, R., Assunção, J.V. & Hirai, E.Y.** 2005. Caracterização das emissões de aldeídos de veículos do ciclo diesel. *Revista de Saúde Pública* 39 (3): 479-485.
- Arndt, U. & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *In* Ellenberg (ed.) *Biological monitoring: Signals from the environmental*. Vieweg, Eschborn, pp. 199-298.
- Azevedo, T.R.** 2003. O ritmo da atividade urbana e a concentração de ozônio na camada de mistura na região metropolitana de São Paulo e arredores. X Simpósio Brasileiro de Geografia Física e Aplicada. <http://geografia.igeo.uerj.br> (acesso em 10.01.2008).
- Bassin, S., Kölliker, R., Cretton, C., Bertossa, M., Widmer, F., Bungener, P. & Fuhrer, J.** 2004. Intra-specific variability of ozone sensitivity in *Centaurea jacea* L., a potential bioindicator for elevated ozone concentrations. *Environmental Pollution* 131: 1–12.
- Boian, C. & Kirchhorff, V.W.J.H.** 2005. Surface ozone enhancements in the south of Brazil owing to large-scale air mass transport. *Atmospheric Environment* 39: 6140–6146.
- Cançado, J.E.D., Braga, A., Pereira, L.A.A., Arbex, M.A., Saldiva, P.H.N & Santos, U.P.** 2006. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 32 (suplemento 1): 5-11.
- CETESB.** 2005. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo – 2004. Série Relatórios.
- CETESB.** 2007. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo – 2006. Série Relatórios.
- Cox, R.M.** 2003. The use of passive sampling to monitor forest exposure to O₃, NO₂ and SO₂: a review and some case studies. *Environmental Pollution* 126: 301–311.
- Croce, M., Vasconcelos, D.M., Manso, D.M., Manso, E.R.C. & Duarte, A.J.S.** 1998. Poluição ambiental e alergia respiratória. *Medicina, Ribeirão Preto* 31: 144-153.

- De Temmerman, L., Bell, J. N. B., Garrec, J.P., Klump, A., Krause, G. H.M. & Tonneijck, A. E.G.** 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. *In*: Urban air pollution, bioindication and environmental awareness. A. Klumpp, W. Ansel & G. Klump (eds). Cuvillier Verlag, Göttingen, pp. 337-373.
- Domingos, M, Klumpp, A & Klumpp, G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230-236.
- Eckardt, N. A. & Pell, E. J.** 1994. O₃-Induced degradation of rubisco protein and loss of rubisco mRNA in relation to leaf age in *Solanum tuberosum* L. *New Phytologist*. 127(4): 741-748.
- Epstein, E.** 1975. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Evans, L.S., Adamski II, J.H. & Renfro, J.R.** 1996. Relationship between cellular injury, visible injury of leaves, and ozone exposure levels for several dicotyledonous plant species at great smoky mountains national park. *Environmental and Experimental Botany*. 36(2): 229-237.
- Fenger, J.** 1999. Urban air quality. *Atmospheric Environment* 33: 4877-4900.
- Fernandes A J, Reis L A M, Carvalho A.** 2002. Caracterização do meio físico. *In*: Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo (Bicudo DC, Forti MC & Bicudo CEM, orgs.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 51-62.
- Ferreira, M.L.** 2007. Relações entre antioxidantes e sintomas visíveis bioindicadores de ozônio em *Ipomoea nil* (L.) Roth. Cv. Scarlet O'Hara sob efeito da poluição aérea urbana de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Freedman, B.** 1995. Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses. 2ed. Academic Press Inc, San Diego.
- Gerosa, G., Cieslik, S. & Ballarin-Denti, A.** 2003 Micrometeorological determination of time-integrated stomatal ozone fluxes over wheat: a case study in Northern Italy. *Atmospheric Environment* 37: 777-788.

- Gravano, E., Bussotti, F., Strasser, R.J., Schaub, M., Novak, K., Skelly, J. & Tani, C.** 2004. Ozone symptoms in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. *Physiologia Plantarum* 121: 620–633.
- Gravano, E., Giuliotti, V., Desotgiu, R., Bussotti, F., Grossoni, P., Gerosa, G. & Tani, C.** 2003. Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution. *Environmental Pollution*. 121: 137–146.
- Günthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P.** 2006. Erratum to “Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage” [*Environ. Pollut.* 137 (2005) 455e465]*. *Environmental Pollution* 140: 562 – 571.
- Günthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P.** 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Environmental Pollution* 147(3): 467-488.
- Günthardt-Goerg, M.S., McQuattie, C.J., Scheidegger, C., Rhiner, C. & Matyssek, R.** 1997. Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 453-463.
- Günthardt-Goerg, M. S., McQuattie, C.J., Maurer, S. & Frey, B.** 2000. Visible and microscopic injury in leaves of five deciduous tree species related to current critical ozone levels. *Environmental Pollution* 109: 489-500.
- Heggestad, H.E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicator of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264-291.
- Holopainen, T., Anttonen, S., Wulff, A., Palomäki, V. & Kärenlampi, L.** 1992. Comparative evaluation of the effects of gaseous pollutants, acidic deposition and mineral deficiencies: structural changes in the cell of forest plants. *Agriculture, Ecosystems and Environmental*. 42: 365-398.
- Iriti, M. & Faoro, F.** 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biologia Plantarum* 49: 585-592

- Iriti, M., Belli, L., Nali, C., Lorenzini, G., Gerosa, G. & Faoro, F.** 2006. Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*) a potential bioindicator species. *Environmental Pollution* 141: 275-282.
- Iriti, M., Rabotti, G., Ascensao, A. & Faoro, F.** 2003. Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 4308-4314.
- Kan, H., Chen, B., Chen, C., Fu, Q. & Chen, M.** 2004. An evaluation of public health impact of ambient air pollution under various energy scenarios in Shanghai, China. *Atmospheric Environment* 38: 95-102.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G. & Fomini, A.** 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). *Revista Brasileira de Botânica* 24(4)suplemento: 511-518.
- Kolb, T.E., Fredericksen, T.S., Stainer, K.C. & Skelly, J.M.** 1997. Issue in scaling tree size and age responses to ozone: a review. *Environmental Pollution* 98 (2): 195–208.
- Kraus, J.E. & Arduin, M.** 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora Universidade Rural, Rio de Janeiro.
- Krupa, S.V & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.
- Krupa, S., McGrath, M.T., Andersen, C.P., Booker, F.L., Burkey, K.O., Chappelka, A.H., Chevone, B.I., Pell, E.J. & Zilinskas, B.A.** 2001. Ambient ozone and plant health. *Plant Disease*. 85(1): 4-12.
- Kubínová, L.** 1994. Recent stereological methods for measuring leaf anatomical characteristics: estimation of the number and sizes of stomata and mesophyll cell. *Journal of Experimental Botany* 45: 119-127.
- Lawson, T., Craigon, J., Black, C.R., Colls, J.J., Landon, G. & Weyers, J.D.B.** 2002. Impact of elevated CO₂ and O₃ on gas exchange parameters and epidermal characteristics in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Experimental Botany* 53: 737-746.

- Lima, J.S.** 2001. Processos biológicos e o biomonitoramento: aspectos bioquímicos e morfológicos. *In*: N.B. Maia, H.L. Martos & W. Barella (orgs.). Indicadores ambientais: conceitos e aplicações. Educ, São Paulo, pp. 95-115.
- Ljubešić, N. & Britvec, M.** 2006. Tropospheric ozone-induced structural changes in leaf mesophyll cell walls in grapevine plants. *Biologia, Bratislava Section Botany* 61(1): 85-90.
- Mayer, H.** 1999. Air pollution in cities. *Atmospheric Environment* 33: 4029-4037.
- Nouchi, I. & Aoki, K.** 1979. Morning Glory as a photochemical oxidant indicator. *Environmental Pollution* 18: 289-303.
- Novak, K., Skellya, J.M., Schaub, M., Kräuchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P.** 2003. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environmental Pollution* 125: 41-52.
- Oksanen, E., Sober, J., Karnosky, D.F.** 2001. Impacts of elevated CO₂ and/or O₃ on leaf ultrastructure of aspen (*Populus tremuloides*) and birch (*Betula papyrifera*) in the Aspen FACE experiment. *Environmental Pollution* 115: 437-446.
- Pääkkönen, E., Holopainen, L. & Kärenlampi, L.** 1995a. Ageing-related anatomical and ultrastructural changes in leaves of birch (*Betula pendula* Roth.) clones as affected by low ozone exposure. *Annals of Botany*. 75: 285 – 294.
- Pääkkönen, E., Metsärinne, S., Holopainen, L. & Kärenlampi, L.** 1995b. The ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) in relation to the developmental stage of leaves. *New Phytologist* 132: 145-154.
- Parkhurst, D.F.** 1982. Stereological methods for measuring internal leaf structure variables. *American Journal of Botany* 69(1): 31-39.
- Parkhurst, D.F.** 1994. Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytologist* 126: 449-479.

- Pell, E.J., Eckardt N. & Enyed A.J.** 1992. Timing of ozone stress and resulting status of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytologist* 120(3): 397-405
- Pell, E. V., Schlanhauser, C. D. & Arteca, R. N.** Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum*. 100: 264 – 273.
- Pellinen, R., Palva, T. & Kangasjärvi, J.** 1999. Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal* 20(3): 349-356.
- Peters, J.L., Castillo, F.J. & Heath, R.L.** 1988. Alteration of extracellular enzymes in pinto bean leaves upon exposure to air pollutants, ozone and sulfur dioxide. *Plant Physiology* 89: 159-164.
- Prozherina, N., Freiwald, V. & Oksanen, E. M. R.** 2003. Interactive effect of springtime frost and elevated ozone on early growth, foliar injuries and leaf structure of birch (*Betula pendula*). *New Phytologist*. 159 (3): 623-636.
- Reig-Armiñana, J., Calatayud, V., Cerveró, J., García-Breijo, F.J., Ibars, A. & Sanz, M.J.** 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). *Environmental Pollution* 132: 321-331.
- Rhizopoulou, S. & Psaras, G.K.** 2003. Development and structure of drought-tolerant leaves of the mediterranean shrub *Capparis spinosa* L. *Annals of Botany* 92: 377-383.
- Richter, H.G.** 1981. Anatomia des skundaren xylems und der Rinde der Lauraceae. Sonderbande des Naturh. Vereins Hamburg 5. Paul Parey, Hamburg.
- Roderick, M.L., Berry, S.L., Noble, I.R. & Farquhar, G.D.** 1999. A theoretical approach to linking the composition and morphology with the function of leaves. *Functional Ecology* 13: 683–695.
- Ryerson, T.B., Trainer, M., Holloway, J.S., Parrish, D.D., Huey, L.G., Sueper, D.T., Frost, G.J., Donnelly, S.G., Schauffler, S., Atlas, E.L., Kuster, W.C., Goldan, P.D., Hübler,**

- G., Meagher, J.F. & Fehsenfeld, F.C.** 2001. Observations of ozone formation in power plant plumes and implications for ozone control strategies. *Science* 292: 719-732.
- Saitanis, C.J. & Karandinos, M.G.** 2002. Effects of ozone on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Journal of Agronomy & Crop Science* 188: 51-58.
- Sant'Ana, S.M.R.** 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' para biomonitoramento dos níveis de contaminação por ozônio na cidade de São Paulo. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Sawyer, F.R., Harley, R.A., Cadle, S.H., Norbeck, J.M., Slott, R. & Bravo, H.A.** 2000. Mobile sources critical review: 1998 NARSTO assessment. *Atmospheric Environment* 34: 2161 – 2181.
- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Camp, W.V., Inze, D., Langebartels, C. & Sandermann Jr, H.** 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The Plant Journal* 16(2): 235-245.
- Seinfeld, J.H.** 1989. Urban air pollution: state of the science. *Science* 243: 745-752.
- Slaton, M.R. & Smith, W.K.** 2002. Mesophyll architecture and cell exposure to intercellular air space in alpine, desert, and forest species. *International Journal of Plant Science* 163(6): 937–948.
- Strittmatter, C.G.D.** 1973. Nueva tecnica de diafanizacion. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 15: 126-129.
- Thordal-Christensen, H., Zhabg, Z., Wei, Y. & Collinge, D.B.** 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11(6): 1187-1194.
- Toth, R.** 1982. An introduction to morphometric cytology and application to botanical research. *American Journal of Botany* 69(10): 1694-1706.
- Vanhatalo, M., Huttunen, S. & Bäck, J.** 2001. Effects of elevated [CO₂] and O₃ on stomatal and surface wax characteristics in leaves of pubescent birch grown under field conditions. *Trees*

15: 304–313.

VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

Vergé X., Chapuis A., Delpoux M. 2002. Bioindicator reability: The exemplo of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Environmental Pollution 118: 337-349.

Vollenweider, P., Ottiger, M. & Günthardt-Goerg, M.S. 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. Environmental Pollution 124: 101–118.

Vollenweider, P., Ottiger, M. & M.S Günthardt-Goerg. 2006. Erratum to “Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage”. Environmental Pollution 137: 455-465

Wenig, M., Spichtinger, N., Stohl, A., Held, G., Beirle, S., Wagner, T., Jahne, B. & Platt U. 2002. Intercontinental transport of nitrogen oxide pollution plumes. Atmospheric Chemistry and Physics 2: 2151-2165.

Wilkinson, H.P. 1979. The plant surface (mainly leaf). In: C.R. Metcalfe & L. Chalk (eds.) Anatomy of dicotyledons vol I, Oxford Press, Oxford, pp 97-165.

Parque do Ibirapuera – Folha 5 – Inverno

	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
ms	182.1 $\pm$ 24.7 a	177.1 $\pm$ 2.8 a	180.5 $\pm$ 11.5 a	181.0 $\pm$ 20.8 a
ad	21.8 $\pm$ 2.6 a	16.9 $\pm$ 0.0 a	20.3 $\pm$ 3.0 a	20.3 $\pm$ 5.4 a
pp	56.2 $\pm$ 2.5 c	66.5 $\pm$ 0.5 b	66.0 $\pm$ 2.8 b	71.1 $\pm$ 5.5 a
pl	76.2 $\pm$ 2.1 a	78.1 $\pm$ 2.3 a	80.5 $\pm$ 6.4 a	77.6 $\pm$ 14.7 a
ab	16.3 $\pm$ 0.8 a	16.0 $\pm$ 0.4 a	15.6 $\pm$ 2.3 a	12.4 $\pm$ 2.4 b
% de tecidos				
ad	11.2 $\pm$ 3.7 a	10.9 $\pm$ 0.5 a	7.9 $\pm$ 1.5 a	9.5 $\pm$ 4.8 a
pp	22.3 $\pm$ 0.8 b	27.8 $\pm$ 1.5 a	32.7 $\pm$ 0.8 a	28.1 $\pm$ 1.1 a
eipp	7.5 $\pm$ 0.9 a	6.7 $\pm$ 0.2 a	6.0 $\pm$ 0.7 a	6.1 $\pm$ 1.8 a
pl	32.1 $\pm$ 3.2 a	28.5 $\pm$ 2.4 a	22.4 $\pm$ 2.2 a	26.3 $\pm$ 10.2 a
eipl	18.1 $\pm$ 3.5 a	17.4 $\pm$ 1.6 a	21.2 $\pm$ 2.5 a	22.8 $\pm$ 6.7 a
ab	8.8 $\pm$ 1.1 a	8.7 $\pm$ 1.0 a	9.8 $\pm$ 3.9 a	7.2 $\pm$ 3.0 a
eit	25.6 $\pm$ 4.3 a	24.1 $\pm$ 1.4 a	27.2 $\pm$ 2.7 a	28.9 $\pm$ 7.0 a
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.4 $\pm$ 0.5 a	1.1 $\pm$ 0.2 a	1.6 $\pm$ 0.2 a	1.1 $\pm$ 0.2 a
iead	9.0 $\pm$ 3.3 a	6.3 $\pm$ 0.8 a	9.3 $\pm$ 0.6 a	6.7 $\pm$ 1.1 a
deab	3.6 $\pm$ 0.5 a	3.8 $\pm$ 0.4 a	3.2 $\pm$ 0.8 a	3.9 $\pm$ 0.7 a
ieab	21.5 $\pm$ 3.2 a	23.5 $\pm$ 1.8 a	21.3 $\pm$ 5.0 a	24.7 $\pm$ 1.5 a

Casa de vegetação – Folha 5 – Inverno

	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
ms	178.2 $\pm$ 0.0 a	172.3 $\pm$ 26.8 a	181.8 $\pm$ 15.2 a	167.3 $\pm$ 5.9 a
ad	20.7 $\pm$ 0.0 a	22.0 $\pm$ 0.7 a	20.4 $\pm$ 3.2 a	20.7 $\pm$ 0.4 a
pp	64.3 $\pm$ 0.0 a	66.3 $\pm$ 10.7 a	63.5 $\pm$ 9.8 a	60.9 $\pm$ 3.2 a
pl	75.7 $\pm$ 0.0 a	70.4 $\pm$ 11.9 a	82.1 $\pm$ 4.5 a	65.1 $\pm$ 5.6 a
ab	17.5 $\pm$ 0.0 a	15.5 $\pm$ 3.4 a	16.6 $\pm$ 4.9 a	21.0 $\pm$ 3.9 a
% de tecidos				
ad	10.1 $\pm$ 0.0 a	11.5 $\pm$ 1.1 a	10.0 $\pm$ 1.7 a	9.3 $\pm$ 3.7 a
pp	29.1 $\pm$ 0.0 b	29.1 $\pm$ 2.6 b	34.1 $\pm$ 1.4 a	25.8 $\pm$ 2.1 a
eipp	6.6 $\pm$ 0.0 a	6.2 $\pm$ 0.9 a	3.0 $\pm$ 2.0 a	6.7 $\pm$ 1.9 a
pl	25.5 $\pm$ 0.0 a	26.2 $\pm$ 2.0 a	28.1 $\pm$ 5.5 a	29.0 $\pm$ 4.0 a
eipl	19.3 $\pm$ 0.0 a	19.1 $\pm$ 0.7 a	16.2 $\pm$ 1.3 b	19.3 $\pm$ 2.0 a
ab	8.9 $\pm$ 0.0	7.9 $\pm$ 2.0	8.6 $\pm$ 0.9	9.8
eit	26.0 $\pm$ 0.0 a	25.3 $\pm$ 0.3 a	19.2 $\pm$ 2.3 a	26.1 $\pm$ 3.8 a
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.1 $\pm$ 0.0 a	0.7 $\pm$ 0.3 a	0.8 $\pm$ 0.4 a	1.1 $\pm$ 0.8 a
iead	6.3 $\pm$ 0.0 a	4.6 $\pm$ 1.3 a	4.4 $\pm$ 2.1 a	6.1 $\pm$ 4.6 a
deab	3.1 $\pm$ 0.0 a	2.8 $\pm$ 0.4 a	3.2 $\pm$ 0.5 a	3.1 $\pm$ 0.5 a
ieab	19.7 $\pm$ 0.0 a	19.0 $\pm$ 1.0 a	20.2 $\pm$ 3.5 a	19.9 $\pm$ 3.7 a

Parque do Ibirapuera – Folha 6 – Inverno				
	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	175.4 $\pm$ 21.7 a	160.4 $\pm$ 9.3 a	174.1 $\pm$ 6.6 a	184.0 $\pm$ 17.4 a
ad	22.3 $\pm$ 3.1 a	18.4 $\pm$ 1.5 a	20.2 $\pm$ 3.2 a	19.6 $\pm$ 3.3 a
pp	52.9 $\pm$ 6.5 a	57.8 $\pm$ 3.4 a	66.9 $\pm$ 9.1 a	65.8 $\pm$ 6.6 a
pl	84.5 $\pm$ 21.2 a	70.0 $\pm$ 7.5 a	70.3 $\pm$ 9.5 a	84.9 $\pm$ 12.5 a
ab	17.5 $\pm$ 0.9 a	15.1 $\pm$ 2.0 a	17.7 $\pm$ 6.0 a	15.1 $\pm$ 4.1 a
% de tecidos				
ad	11.7 $\pm$ 1.3 a	11.2 $\pm$ 1.2 a	10.1 $\pm$ 2.5 a	11.4 $\pm$ 1.0 a
pp	24.2 $\pm$ 2.1 a	29.0 $\pm$ 2.1 a	32.3 $\pm$ 4.0 a	27.6 $\pm$ 0.6 a
eipp	6.4 $\pm$ 0.8 a	6.0 $\pm$ 0.6 a	6.4 $\pm$ 0.8 a	6.2 $\pm$ 2.3 a
pl	31.2 $\pm$ 4.5 a	27.6 $\pm$ 4.7 a	22.3 $\pm$ 4.7 a	21.9 $\pm$ 2.8 a
eipl	18.9 $\pm$ 1.4 a	18.2 $\pm$ 4.0 a	19.4 $\pm$ 3.4 a	23.5 $\pm$ 3.5 a
ab	7.5 $\pm$ 1.6 a	8.1 $\pm$ 1.0 a	9.5 $\pm$ 1.3 a	9.5 $\pm$ 1.7 a
eit	23.5 $\pm$ 3.1 a	24.1 $\pm$ 4.5 a	25.8 $\pm$ 3.4 a	29.6 $\pm$ 2.6 a
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.2 $\pm$ 0.2 a	1.1 $\pm$ 0.2 a	1.2 $\pm$ 0.4 a	1.2 $\pm$ 0.5 a
iead	7.5 $\pm$ 1.8 a	6.3 $\pm$ 0.5 a	6.7 $\pm$ 2.2 a	6.7 $\pm$ 2.8 a
deab	4.2 $\pm$ 0.7 a	3.6 $\pm$ 0.2 a	3.5 $\pm$ 0.8 a	3.7 $\pm$ 0.0 a
ieab	25.5 $\pm$ 1.4 a	21.0 $\pm$ 1.4 a	21.8 $\pm$ 3.7 a	20.1 $\pm$ 2.1 a

Casa de vegetação – Folha 6 – Inverno				
	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	173.2 $\pm$ 0.0 a	176.5 $\pm$ 22.9 a	175.2 $\pm$ 16.8 a	166.5 $\pm$ 4.6 a
ad	20.2 $\pm$ 0.0 a	20.0 $\pm$ 2.9 a	21.3 $\pm$ 1.7 a	16.1 $\pm$ 1.5 a
pp	63.3 $\pm$ 0.0 a	62.9 $\pm$ 4.6 a	61.1 $\pm$ 2.4 a	64.2 $\pm$ 2.1 a
pl	75.0 $\pm$ 0.0 a	77.0 $\pm$ 16.3 a	79.0 $\pm$ 11.7 a	74.0 $\pm$ 9.1 a
ab	16.3 $\pm$ 0.0 a	18.0 $\pm$ 2.9 a	16.0 $\pm$ 2.9 a	15.4 $\pm$ 2.6 a
% de tecidos				
ad	10.9 $\pm$ 0.0 a	10.5 $\pm$ 2.8 a	11.5 $\pm$ 2.0 a	11.1 $\pm$ 2.0 a
pp	29.1 $\pm$ 0.0 a	26.0 $\pm$ 1.3 a	25.6 $\pm$ 2.6 a	31.2 $\pm$ 2.0 a
eipp	5.4 $\pm$ 0.0 a	7.3 $\pm$ 0.7 a	5.1 $\pm$ 1.7 a	4.5 $\pm$ 0.3 a
pl	25.7 $\pm$ 0.0 a	25.0 $\pm$ 3.2 a	26.3 $\pm$ 1.6 a	27.9 $\pm$ 5.9 a
eipl	19.9 $\pm$ 0.0 a	22.3 $\pm$ 2.4 a	22.5 $\pm$ 3.6 a	18.3 $\pm$ 2.7 a
ab	8.6 $\pm$ 0.0 a	8.9 $\pm$ 1.5 a	9.0 $\pm$ 2.3 a	7.0 $\pm$ 3.7 a
eit	25.7 $\pm$ 0.0 a	29.6 $\pm$ 2.4 a	27.6 $\pm$ 5.1 a	22.8 $\pm$ 2.9 a
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.2 $\pm$ 0.0 a	1.1 $\pm$ 0.4 a	1.3 $\pm$ 0.6 a	1.8 $\pm$ 0.8 a
iead	6.6 $\pm$ 0.0 a	6.4 $\pm$ 2.3 a	7.8 $\pm$ 2.9 a	8.9 $\pm$ 3.2 a
deab	3.5 $\pm$ 0.0 a	2.9 $\pm$ 0.8 a	3.2 $\pm$ 0.3 a	3.5 $\pm$ 1.5 a
ieab	20.0 $\pm$ 0.0 a	18.0 $\pm$ 5.2 a	19.8 $\pm$ 2.5 a	18.5 $\pm$ 5.0 a

Parque do Ibirapuera – Folha 7 - Inverno				
	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (µm)				
lb	163.3 ± 4.8 a	161.8 ± 4.6 a	166.8 ± 6.3 a	164.4 ± 14.6 a
ad	20.8 ± 1.1 a	18.6 ± 3.0 a	21.3 ± 0.7 a	18.5 ± 3.6 a
pp	51.0 ± 9.4 a	50.8 ± 8.2 a	62.4 ± 3.3 a	59.9 ± 6.3 a
pl	77.6 ± 10.2 a	63.8 ± 14.5 a	68.6 ± 5.4 a	68.0 ± 8.1 a
ab	16.7 ± 2.9 a	15.2 ± 1.9 a	15.5 ± 4.4 a	18.7 ± 3.1 a
% de tecidos				
ad	12.9 ± 1.8 a	10.4 ± 2.2 a	10.1 ± 1.4 a	14.4 ± 1.5 a
pp	25.4 ± 3.3 a	25.7 ± 3.5 a	31.5 ± 2.4 a	27.0 ± 2.5 a
eipp	6.3 ± 1.3 a	7.8 ± 2.7 a	4.2 ± 3.7 a	6.1 ± 2.8 a
pl	30.5 ± 1.9 a	29.2 ± 5.3 a	27.4 ± 3.6 a	23.0 ± 1.9 a
eipl	15.6 ± 2.4 a	17.7 ± 2.3 a	21.3 ± 0.6 a	19.8 ± 1.7 a
ab	9.4 ± 0.9	9.2 ± 5.2	5.5 ± 0.9	9.7 ± 2.4
eit	21.8 ± 1.7 a	25.6 ± 5.0 a	25.5 ± 3.3 a	25.9 ± 3.3 a
Densidade (200µm ²) e índice estomático				
dead	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
iead	10.3 ± 2.3	8.0 ± 0.9	5.5 ± 0.3	5.0 ± 0.6
deab	3.3 ± 1.2 a	4.1 ± 0.4 a	3.2 ± 0.2 a	4.0 ± 0.3 a
ieab	20.5 ± 4.5 a	20.7 ± 0.3 a	19.4 ± 3.3 a	22.4 ± 3.1 a

Casa de vegetação – Folha 7 - Inverno				
	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (µm)				
lb	166.9 ± 0.0 a	156.6 ± 14.0 a	179.7 ± 0.5 a	149.7 ± 5.7 a
ad	20.8 ± 0.0 a	18.6 ± 0.9 a	21.3 ± 2.0 a	20.6 ± 1.4 a
pp	61.0 ± 0.0 a	60.3 ± 7.8 a	63.5 ± 0.6 a	55.5 ± 3.4 a
pl	69.4 ± 0.0a	61.6 ± 5.9 a	80.4 ± 2.2 a	53.2 ± 10.9 b
ab	16.5 ± 0.0 a	16.9 ± 2.2 a	15.9 ± 1.0 a	18.1 ± 1.6 a
% de tecidos				
ad	11.0 ± 0.0 a	10.9 ± 0.6 a	8.8 ± 2.8 a	13.2 ± 2.5 a
pp	29.6 ± 0.0 a	26.4 ± 2.4 a	33.0 ± 1.4 a	30.9 ± 3.3 a
eipp	5.5 ± 0.0 a	6.9 ± 1.0 a	4.9 ± 1.8 a	4.6 ± 2.2 a
pl	25.10.0 a	26.60.6 a	24.00.1 a	25.14.3 a
eipl	19.8 ± 0.0 a	20.8 ± 0.6 a	21.1 ± 1.2 a	19.9 ± 1.6 a
ab	8.4 ± 0.0 a	8.5 ± 3.3 a	8.2 ± 1.6 a	8.4 ± 0.7 a
eit	25.0 ± 0.0 a	27.7 ± 1.3 a	26.0 ± 3.0 a	22.4 ± 6.1 a
Densidade (200µm ²) e índice estomático				
dead	1.4 ± 0.0 b	1.5 ± 0.2 b	1.2 ± 0.2 b	2.0 ± 0.5 a
iead	7.1 ± 0.0 ab	8.0 ± 0.8 ab	6.0 ± 0.6 b	9.3 ± 1.1 a
deab	4.0 ± 0.0 a	3.3 ± 0.7 a	4.0 ± 0.3 a	4.5 ± 0.5 a
ieab	20.5 ± 0.0 a	19.8 ± 2.8 a	21.0 ± 0.3 a	20.8 ± 1.9 a

Parque do Ibirapuera – Folha 5 - Primavera				
	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	194.9 ± 9.4	225.4 ± 12.7	230.3 ± 18.4	239.0 ± 19.7
ad	22.61.2	28.57.5	21.53.8	23.7 ± 1.3
pp	73.2 ± 5.4	89.1 ± 13.5	95.5 ± 14.9	100.9 ± 12.3
pl	79.2 ± 3.2	90.3 ± 2.1	95.3 ± 10.0	97.6 ± 5.8
ab	21.0 ± 3.7	18.1 ± 4.9	20.4 ± 2.1	17.9 ± 2.6
% de tecidos				
ad	10.0 ± 1.1 a	7.4 ± 1.6 a	8.4 ± 0.2 a	9.1 ± 1.4 a
pp	28.6 ± 3.7 a	32.1 ± 4.5 a	33.0 ± 0.7 a	30.9 ± 3.1 a
eipp	5.5 ± 1.9 a	6.9 ± 1.4 a	3.9 ± 0.6 a	5.0 ± 0.5 a
pl	25.8 ± 0.8 a	24.9 ± 1.1 a	28.6 ± 2.5 a	26.7 ± 1.7 a
eipl	20.2 ± 2.4 a	22.9 ± 1.9 a	18.0 ± 4.3 a	22.8 ± 3.5 a
ab	10.0 ± 0.4 a	5.9 ± 1.4 b	5.4 ± 0.5 b	5.5 ± 1.3 b
eit	25.7 ± 3.3 a	29.8 ± 2.4 a	21.9 ± 4.9 a	27.8 ± 3.0 a
Densidade (200μm ²) e índice estomático				
dead	1.3 ± 0.3 a	1.3 ± 0.6 a	1.3 ± 0.0 a	1.5 ± 0.4 a
iead	8.7 ± 2.7 a	8.8 ± 3.5 a	7.1 ± 0.8 a	8.2 ± 2.7 a
deab	3.9 ± 0.1 a	3.7 ± 0.6 a	3.8 ± 0.2 a	4.0 ± 0.3 a
ieab	22.1 ± 5.8 a	23.5 ± 1.8 a	23.1 ± 0.8 a	24.1 ± 4.1 a

Casa de vegetação – Folha 5 - Primavera				
	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	232.2 ± 25.4 a	229.1 ± 7.1 a	239.1 ± 20.8 a	235.0 ± 11.3 a
ad	22.4 ± 4.0 a	21.4 ± 9.5 a	26.4 ± 4.5 a	21.6 ± 9.3 a
pp	90.6 ± 17.0 a	88.7 ± 4.2 a	97.1 ± 5.4 a	96.0 ± 5.9 a
pl	98.6 ± 6.6 a	99.0 ± 12.5 a	98.01 ± 5.0 a	99.4 ± 4.9 a
ab	21.2 ± 2.9 a	20.7 ± 4.4 a	18.2 ± 1.2 a	19.1 ± 9.2 a
% de tecidos				
ad	8.8 ± 1.2 a	6.8 ± 1.9 a	8.6 ± 0.3 a	7.5 ± 1.8 a
pp	32.6 ± 3.7 a	34.1 ± 3.6 a	35.8 ± 2.4 a	36.9 ± 3.2a
eipp	3.9 ± 1.3 a	3.6 ± 2.0 a	3.9 ± 1.2 a	4.5 ± 0.6 a
pl	29.7 ± 2.9 a	29.7 ± 3.2 a	28.1 ± 2.4 a	27.2 ± 3.2 a
eipl	18.1 ± 1.5 a	19.3 ± 3.8 a	17.2 ± 5.4 a	17.6 ± 1.0 a
ab	6.9 ± 1.7 a	6.7 ± 2.4 a	6.4 ± 1.9 a	6.3 ± 3.1 a
eit	22.0 ± 1.8 a	22.8 ± 3.9 a	21.1 ± 4.9 a	22.1 ± 1.3 a
Densidade (200μm ²) e índice estomático				
dead	1.2 ± 0.4 a	1.3 ± 0.3 a	2.1 ± 1.2 a	2.1 ± 0.2 a
iead	7.9 ± 2.6 a	7.6 ± 1.7 a	10.7 ± 5.1 a	10.3 ± 2.3 a
deab	4.2 ± 1.1 a	4.3 ± 0.8 a	3.7 ± 1.8 a	5.4 ± 1.4 a
ieab	25.6 ± 5.9 a	24.6 ± 4.6 a	19.2 ± 6.7 a	26.8 ± 7.2 a

Parque do Ibirapuera – Folha 6 - Primavera

	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	208.5 $\pm$ 10.5 a	225.8 $\pm$ 22.7 a	212.9 $\pm$ 6.3 a	228.4 $\pm$ 10.8 a
ad	21.6 $\pm$ 2.0 a	22.9 $\pm$ 1.3 a	17.4 $\pm$ 2.3 b	23.9 $\pm$ 1.6 a
pp	78.7 $\pm$ 6.6 a	90.1 $\pm$ 9.7 a	86.8 $\pm$ 6.0 a	93.5 $\pm$ 4.7 a
pl	87.6 $\pm$ 4.8 a	96.1 $\pm$ 14.1 a	96.0 $\pm$ 5.6 a	97.3 $\pm$ 10.5 a
ab	22.7 $\pm$ 5.0 a	18.4 $\pm$ 0.8 a	14.7 $\pm$ 3.4 a	14.5 $\pm$ 1.6 a
% de tecidos				
ad	10.2 $\pm$ 3.0 a	8.2 $\pm$ 1.3 a	10.4 $\pm$ 1.3 a	9.1 $\pm$ 2.9 a
pp	30.1 $\pm$ 4.3 a	33.5 $\pm$ 1.4 a	29.5 $\pm$ 1.9 a	34.2 $\pm$ 0.7 a
eipp	5.5 $\pm$ 0.3 a	4.9 $\pm$ 0.9 a	3.9 $\pm$ 0.1 a	4.1 $\pm$ 1.5 a
pl	27.8 $\pm$ 4.5 a	26.6 $\pm$ 1.5 a	32.5 $\pm$ 1.2 a	28.6 $\pm$ 2.8 a
ei	19.0 $\pm$ 1.5 a	20.1 $\pm$ 1.7 a	17.7 $\pm$ 2.0 a	19.0 $\pm$ 1.9 a
ab	7.3 $\pm$ 2.0 a	6.7 $\pm$ 1.5 a	6.1 $\pm$ 0.2 a	5.0 $\pm$ 0.6 a
ei	24.5 $\pm$ 1.7 a	25.0 $\pm$ 1.1 a	21.5 $\pm$ 1.9 a	23.1 $\pm$ 0.6 a
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.5 $\pm$ 0.2 a	1.3 $\pm$ 0.3 a	1.5 $\pm$ 0.2 a	1.8 $\pm$ 0.2 a
iead	9.8 $\pm$ 2.1 a	6.9 $\pm$ 1.9 a	8.5 $\pm$ 0.4 a	8.6 $\pm$ 1.0 a
deab	3.7 $\pm$ 0.7 a	4.6 $\pm$ 0.4 a	3.8 $\pm$ 0.2 a	4.8 $\pm$ 0.7 a
ieab	24.3 $\pm$ 1.8 b	24.7 $\pm$ 2.0 b	23.4 $\pm$ 1.6 b	30.7 $\pm$ 2.3 a

Casa de vegetação – Folha 6 - Primavera

	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	229.1 $\pm$ 22.1 a	228.8 $\pm$ 16.0 a	228.5 $\pm$ 20.0 a	232.9 $\pm$ 27.0 a
ad	25.4 $\pm$ 2.9 a	18.6 $\pm$ 6.9 a	21.9 $\pm$ 3.9 a	30.0 $\pm$ 4.7 a
pp	87.0 $\pm$ 12.8 a	87.8 $\pm$ 12.9 a	89.1 $\pm$ 14.8 a	94.9 $\pm$ 23.8 a
pl	96.4 $\pm$ 11.8 a	102.9 $\pm$ 13.0 a	98.1 $\pm$ 10.9 a	93.9 $\pm$ 8.5 a
ab	20.6 $\pm$ 2.3 a	19.8 $\pm$ 3.2 a	19.2 $\pm$ 3.5 a	14.7 $\pm$ 4.9 a
% de tecidos				
ad	7.2 $\pm$ 1.6 a	4.1 $\pm$ 2.9 a	8.6 $\pm$ 2.3 a	7.6 $\pm$ 0.4a
pp	34.0 $\pm$ 2.2 a	35.0 $\pm$ 1.9a	32.8 $\pm$ 4.7 a	36.8 $\pm$ 1.3 a
eipp	3.3 $\pm$ 0.4 a	3.8 $\pm$ 0.8 a	4.7 $\pm$ 0.4 a	4.4 $\pm$ 1.5 a
pl	29.0 $\pm$ 2.1 a	30.3 $\pm$ 2.8 a	31.7 $\pm$ 5.8 a	27.6 $\pm$ 6.2 a
ei	19.4 $\pm$ 2.9 a	19.5 $\pm$ 4.5 a	14.7 $\pm$ 5.1 a	16.0 $\pm$ 3.8 a
ab	7.2 $\pm$ 1.9 a	7.4 $\pm$ 1.8 a	7.6 $\pm$ 2.4 a	7.6 $\pm$ 4.0a
ei	22.7 $\pm$ 2.7 a	23.2 $\pm$ 3.7 a	19.4 $\pm$ 5.4 a	20.4 $\pm$ 2.6 a
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.2 $\pm$ 0.3 a	3.0 $\pm$ 0.0 a	2.8 $\pm$ 1.4 a	2.0 $\pm$ 1.0 a
iead	7.5 $\pm$ 1.7 a	11.8 $\pm$ 0.0 a	12.8 $\pm$ 1.2 a	9.3 $\pm$ 5.0 a
deab	5.0 $\pm$ 1.3 a	7.0 $\pm$ 0.0 a	5.7 $\pm$ 2.5 a	5.0 $\pm$ 2.0 a
ieab	27.1 $\pm$ 6.1 a	28.0 $\pm$ 0.0 a	26.3 $\pm$ 8.4 a	23.6 $\pm$ 6.4 a

Parque do Ibirapuera – Folha 7 - Primavera				
	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (µm)				
lb	217.4 ± 6.1 a	206.8 ± 31.2 a	220.0 ± 21.6 a	212.9 ± 15.4 a
ad	23.9 ± 0.6 a	22.9 ± 3.6 a	23.0 ± 2.7 a	22.5 ± 3.1 a
pp	79.1 ± 4.7 a	80.0 ± 13.9 a	87.8 ± 12.8 a	81.1 ± 9.0 a
pl	97.9 ± 5.5 a	100.0 ± 5.0 a	93.8 ± 9.5 a	95.2 ± 1.9 a
ab	19.3 ± 1.7 a	17.0 ± 0.8 a	15.8 ± 2.2a	15.4 ± 3.6 a
% de tecidos				
ad	6.8 ± 3.2 a	10.5 ± 1.7 a	7.6 ± 0.5 a	10.5 ± 2.5 a
pp	31.1 ± 4.1 a	29.6 ± 2.1 a	29.5 ± 0.4 a	31.1 ± 4.8 a
eipp	4.5 ± 0.1 a	4.4 ± 0.2 a	4.4 ± 0.3 a	4.4 ± 0.1 a
pl	28.3 ± 3.1 a	27.0 ± 3.6 a	32.4 ± 1.4 a	27.7 ± 0.4 a
ei	18.2 ± 3.0 a	20.8 ± 2.9 a	19.8 ± 1.8 a	21.1 ± 3.3 a
ab	8.9 ± 2.5 a	7.7 ± 2.1 a	6.4 ± 0.9 a	5.0 ± 0.6 a
ei	25.0 ± 4.1 a	25.2 ± 3.0 a	24.1 ± 2.1 a	25.6 ± 3.4 a
Densidade (200µm ²) e índice estomático				
dead	1.5 ± 0.5 a	2.8 ± 0.8 a	1.5 ± 0.9 a	2.1 ± 0.5 a
iead	7.9 ± 1.8 a	13.0 ± 4.2 a	8.5 ± 5.3 a	9.4 ± 1.7 a
deab	3.3 ± 0.3 b	5.2 ± 0.4 a	4.4 ± 0.7 a	5.2 ± 0.7 a
ieab	20.3 ± 1.6 a	24.9 ± 1.5 a	25.2 ± 3.3 a	26.1 ± 5.8 a

Parque do Ibirapuera – Folha 7 - Primavera				
	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (µm)				
lb	202.9 ± 7.8 a	200.5 ± 32.6 a	222.1 ± 26.3 a	221.5 ± 20.3 a
ad	26.3 ± 1.5 a	23.5 ± 3.3 a	22.4 ± 4.5 a	28.2 ± 3.1 a
pp	76.8 ± 7.6 a	80.2 ± 12.8 a	82.1 ± 9.5 a	81.7 ± 8.0 a
pl	83.1 ± 3.4 a	78.5 ± 18.4 a	84.4 ± 14.1 a	94.6 ± 17.9 a
ab	17.5 ± 1.8 a	18.8 ± 1.7 a	17.8 ± 3.1 a	18.1 ± 1.5 a
% de tecidos				
ad	8.0 ± 1.1 a	9.4 ± 2.7 a	7.2 ± 2.3 a	10.8 ± 3.4 a
pp	36.3 ± 1.8 a	38.5 ± 4.3 a	34.1 ± 3.7 a	34.4 ± 5.0 a
eipp	3.4 ± 0.6 a	4.7 ± 1.9 a	4.9 ± 2.5 a	4.7 ± 1.0 a
pl	29.11.7 a	29.13.2 a	31.11.3 a	27.7 ± 4.5 a
ei	14.3 ± 0.9 a	14.6 ± 0.4 a	14.4 ± 2.0 a	16.11.0 a
ab	8.9 ± 1.6 a	4.7 ± 2.7 a	8.3 ± 4.4 a	6.3 ± 1.5a
ei	17.7 ± 1.4 a	18.4 ± 7.1 a	19.3 ± 4.5 a	20.8 ± 0.4 a
Densidade (200µm ²) e índice estomático				
dead	1.3 ± 1.5 a	1.3 ± 1.3 a	1.8 ± 0.3 a	1.8 ± 0.7 a
iead	5.9 ± 6.6 a	5.8 ± 5.2 a	9.4 ± 2.0 a	8.7 ± 2.1 a
deab	6.3 ± 1.5 a	4.5 ± 2.8 a	4.3 ± 1.1 a	5.1 ± 1.4 a
ieab	28.6 ± 4.8 a	19.5 ± 9.7 a	20.2 ± 3.9 a	23.6 ± 4.7 a

Parque do Ibirapuera - Inverno

	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	173.6 $\pm$ 9.5 a	166.4 $\pm$ 9.3 a	173.8 $\pm$ 6.9 a	176.1 $\pm$ 4.7 a
ad	21.6 $\pm$ 0.8 a	18.0 $\pm$ 0.9 b	20.6 $\pm$ 0.6 a	21.9 $\pm$ 1.5 a
pp	53.4 $\pm$ 2.6 b	58.4 $\pm$ 7.9 ab	65.1 $\pm$ 2.4 a	65.4 $\pm$ 2.1 a
pl	79.2 $\pm$ 4.7 a	70.5 $\pm$ 7.0 a	72.9 $\pm$ 6.1 a	72.2 $\pm$ 4.2 a
ab	16.8 $\pm$ 0.6 a	15.4 $\pm$ 0.5 a	16.3 $\pm$ 1.2 a	15.6 $\pm$ 2.3 a
% de tecidos				
ad	11.9 $\pm$ 0.8 a	10.8 $\pm$ 0.4 a	9.3 $\pm$ 1.3 a	9.5 $\pm$ 2.6 a
pp	24.0 $\pm$ 1.6 c	27.5 $\pm$ 1.7 b	32.2 $\pm$ 0.6 a	34.9 $\pm$ 1.9 a
eipp	6.7 $\pm$ 0.7 a	6.9 $\pm$ 0.9 a	5.5 $\pm$ 1.1 ab	3.9 $\pm$ 0.7b
pl	31.3 $\pm$ 0.8 a	28.4 $\pm$ 0.8ab	24.0 $\pm$ 2.9 b	23.8 $\pm$ 1.7 b
eipl	17.5 $\pm$ 1.7 a	17.8 $\pm$ 0.4 a	20.6 $\pm$ 1.1 a	19.4 $\pm$ 2.1 a
ab	8.6 $\pm$ 1.0 a	8.7 $\pm$ 0.5 a	8.3 $\pm$ 2.4 a	8.5 $\pm$ 0.5 a
eit	23.6 $\pm$ 1.9 a	24.6 $\pm$ 0.9 a	26.2 $\pm$ 0.9 a	23.3 $\pm$ 2.8 a
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.5 $\pm$ 0.4 a	1.3 $\pm$ 0.3 a	1.2 $\pm$ 0.3 a	1.2 $\pm$ 0.4 a
iead	8.9 $\pm$ 1.4 a	6.9 $\pm$ 1.0 a	7.1 $\pm$ 1.9 a	7.0 $\pm$ 2.5 a
deab	3.7 $\pm$ 0.5 a	3.8 $\pm$ 0.3 a	3.3 $\pm$ 0.2 a	4.1 $\pm$ 0.7 a
ieab	22.5 $\pm$ 2.7a	21.7 $\pm$ 1.6 a	20.8 $\pm$ 1.3 a	23.4 $\pm$ 2.4 a

Casa de vegetação - Inverno

	4 dias	12 dias	20 dias	28dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	172.8 $\pm$ 5.7 ab	168.5 $\pm$ 10.5 ab	178.9 $\pm$ 3.4 a	161.2 $\pm$ 9.9 b
ad	20.6 $\pm$ 0.3 a	20.2 $\pm$ 1.7 a	21.0 $\pm$ 0.5 a	19.1 $\pm$ 2.6 a
pp	62.9 $\pm$ 1.7 a	63.2 $\pm$ 3.0 a	62.7 $\pm$ 1.4 a	60.2 $\pm$ 4.4 a
pl	73.4 $\pm$ 3.4 ab	69.7 $\pm$ 7.7 ab	80.5 $\pm$ 1.6 a	64.1 $\pm$ 10.5 b
ab	16.8 $\pm$ 0.6 a	16.8 $\pm$ 1.3 a	16.2 $\pm$ 0.4 a	17.0 $\pm$ 1.4 a
% de tecidos				
ad	10.7 $\pm$ 0.5 a	11.0 $\pm$ 0.5 a	10.1 $\pm$ 1.3 a	11.2 $\pm$ 1.9 a
pp	29.3 $\pm$ 0.3 a	27.2 $\pm$ 1.7 a	30.9 $\pm$ 4.6 a	29.3 $\pm$ 3.0 a
eipp	5.9 $\pm$ 0.7 a	6.8 $\pm$ 0.5 a	4.3 $\pm$ 1.1 a	5.3 $\pm$ 1.3 a
pl	25.4 $\pm$ 0.3 a	25.9 $\pm$ 0.8 a	26.1 $\pm$ 2.1 a	27.3 $\pm$ 2.0 a
eipl	19.7 $\pm$ 0.3 a	20.7 $\pm$ 1.6 a	19.9 $\pm$ 3.3 a	19.2 $\pm$ 0.8 a
ab	8.6 $\pm$ 0.3 a	8.4 $\pm$ 0.5 a	8.6 $\pm$ 0.4 a	8.4 $\pm$ 1.4 a
eit	25.6 $\pm$ 0.5 a	27.5 $\pm$ 2.2 a	24.3 $\pm$ 4.4 a	23.8 $\pm$ 2.0 a
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.2 $\pm$ 0.2 b	1.1 $\pm$ 0.4 b	1.1 $\pm$ 0.3 b	1.6 $\pm$ 0.5 a
iead	6.7 $\pm$ 0.4 a	6.3 $\pm$ 1.7 a	6.1 $\pm$ 1.7 a	8.1 $\pm$ 1.7 a
deab	3.5 $\pm$ 0.5 a	3.0 $\pm$ 0.3 b	3.5 $\pm$ 0.5 a	3.7 $\pm$ 0.7 a
ieab	20.1 $\pm$ 0.4 ab	18.9 $\pm$ 0.9 b	20.3 $\pm$ 0.6 a	19.7 $\pm$ 1.2 ab

Parque do Ibirapuera - Primavera

	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	206.9 $\pm$ 11.3 a	219.3 $\pm$ 10.9 a	221.1 $\pm$ 8.8 a	226.8 $\pm$ 13.1 a
ad	22.7 $\pm$ 1.2 a	24.8 $\pm$ 3.2 a	20.6 $\pm$ 2.9 a	23.4 $\pm$ 0.8 a
pp	77.0 $\pm$ 3.3 a	86.4 $\pm$ 5.6 a	90.0 $\pm$ 4.8 a	91.8 $\pm$ 10.0 a
pl	88.2 $\pm$ 9.4 a	95.5 $\pm$ 4.9 a	95.0 $\pm$ 1.1 a	96.7 $\pm$ 1.3 a
ab	21.0 $\pm$ 1.7 a	17.8 $\pm$ 0.7 a	17.0 $\pm$ 3.0 a	15.9 $\pm$ 1.8 a
% de tecidos				
ad	9.0 $\pm$ 1.9 a	8.7 $\pm$ 1.6 a	8.8 $\pm$ 1.5 a	9.6 $\pm$ 0.8 a
pp	29.9 $\pm$ 1.3 a	31.7 $\pm$ 2.0 a	30.7 $\pm$ 2.0 a	32.1 $\pm$ 1.8 a
eipp	5.2 $\pm$ 0.6 a	5.4 $\pm$ 1.3 a	4.0 $\pm$ 0.3 a	4.5 $\pm$ 0.4 a
pl	27.3 $\pm$ 1.3 b	26.2 $\pm$ 1.1 b	31.2 $\pm$ 2.2 a	27.7 $\pm$ 1.0 b
eipl	19.1 $\pm$ 1.0 a	21.3 $\pm$ 1.5 a	18.5 $\pm$ 1.1 a	21.0 $\pm$ 1.9 a
ab	8.7 $\pm$ 1.3 a	6.7 $\pm$ 0.9 b	6.0 $\pm$ 0.5 b	5.2 $\pm$ 0.3 b
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.4 $\pm$ 0.1 a	1.8 $\pm$ 0.8 a	1.4 $\pm$ 0.1 a	1.8 $\pm$ 0.3 a
iead	13.3 $\pm$ 7.7 a	14.5 $\pm$ 8.4 a	13.4 $\pm$ 8.4 a	14.1 $\pm$ 8.7 a
deab	3.6 $\pm$ 0.3 a	4.5 $\pm$ 0.8 a	4.0 $\pm$ 0.3 a	4.7 $\pm$ 0.6 a
ieab	22.2 $\pm$ 2.0 a	24.4 $\pm$ 0.8 a	23.9 $\pm$ 1.1 a	27.0 $\pm$ 3.4 a

Casa de vegetação - Primavera

	4 dias	12 dias	20 dias	28 dias
Espessura dos tecidos (μm)				
lb	221.4 $\pm$ 16.1 a	219.5 $\pm$ 16.4 a	229.9 $\pm$ 8.6 a	229.8 $\pm$ 7.3 a
ad	24.7 $\pm$ 2.0 a	21.2 $\pm$ 2.5 a	23.6 $\pm$ 2.5 a	26.6 $\pm$ 4.4 a
pp	84.8 $\pm$ 7.2 a	85.6 $\pm$ 4.7 a	89.4 $\pm$ 7.5 a	90.9 $\pm$ 8.0 a
pl	92.7 $\pm$ 8.4 a	93.51 $\pm$ 3.1 a	93.5 $\pm$ 7.9 a	96.0 $\pm$ 3.0 a
ab	19.8 $\pm$ 2.0 a	19.8 $\pm$ 1.0 a	18.4 $\pm$ 0.7 a	17.3 $\pm$ 2.3 a
% de tecidos				
ad	8.0 $\pm$ 0.8 a	6.8 $\pm$ 2.6 a	8.1 $\pm$ 0.8 a	8.6 $\pm$ 1.9 a
pp	34.3 $\pm$ 1.9 a	35.9 $\pm$ 2.3 a	34.2 $\pm$ 1.5 a	36.0 $\pm$ 1.4 a
eipp	3.5 $\pm$ 0.3 a	4.0 $\pm$ 0.6 a	4.5 $\pm$ 0.6 a	4.5 $\pm$ 0.2 a
pl	29.3 $\pm$ 0.4 a	29.7 $\pm$ 0.6 a	30.3 $\pm$ 1.9 a	27.5 $\pm$ 0.3 a
eipl	17.3 $\pm$ 2.7 a	17.8 $\pm$ 2.8 a	15.4 $\pm$ 1.5 a	16.6 $\pm$ 0.9 a
ab	7.7 $\pm$ 1.1 a	6.2 $\pm$ 1.4 a	7.4 $\pm$ 0.9 a	6.7 $\pm$ 0.7 a
eit	20.8 $\pm$ 2.7 a	21.5 $\pm$ 2.7 a	19.9 $\pm$ 1.0 a	21.1 $\pm$ 0.9 a
Densidade (200 μm^2) e índice estomático				
dead	1.2 $\pm$ 0.1 a	1.9 $\pm$ 1.0 a	2.3 $\pm$ 0.5 a	2.0 $\pm$ 0.2 a
iead	7.1 $\pm$ 1.1 a	8.4 $\pm$ 3.1 a	11.0 $\pm$ 1.7 a	9.4 $\pm$ 0.9 a
deab	5.2 $\pm$ 1.1 a	5.3 $\pm$ 1.5 a	4.6 $\pm$ 1.0 a	5.2 $\pm$ 0.2 a
ieab	27.1 $\pm$ 1.5 a	24.0 $\pm$ 4.3 a	21.9 $\pm$ 3.8 a	24.7 $\pm$ 1.9 a