

THAMIRES FERNANDA GOMES

***Bixa orellana* L. (BIXACEAE): UMA ESPÉCIE POTENCIAL FITOINDICADORA DE
FLÚOR NA ATMOSFERA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

Orientadora: Luzimar Campos da Silva

Coorientadora: Alice Pita Barbosa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G633b
2022
Gomes, Thamires Fernanda, 1987-
Bixa orellana L. (Bixaceae): uma espécie potencial
fitoindicadora de flúor na atmosfera / Thamires Fernanda
Gomes. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Luzimar Campos da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.394>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Urucum - Anatomia. 2. Urucum - Efeito do flúor. 3. Ar -
Poluição. 4. Hormônios vegetais. I. Silva, Luzimar Campos da,
1971-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica.
III. Título.

CDD 22. ed. 583.68

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

THAMIRES FERNANDA GOMES

***Bixa orellana* L. (BIXACEAE): UMA ESPÉCIE POTENCIAL FITOINDICADORA DE FLÚOR NA ATMOSFERA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 29 de abril de 2022

Assentimento:



Thamires Fernanda Gomes
Autora



Luzimar Campos da Silva
Orientadora

*Ao meu avô Alício José de Carvalho
que sabia como e quando plantar,
sempre presente em meus pensamentos...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao eterno Presidente Luiz Inácio Lula da Silva, por conceder a pessoas de origem humilde como eu, o direito de poder sonhar.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Botânica pela oportunidade de realização dessa pesquisa, e a Capes pelo aporte financeiro e pela concessão da bolsa de doutorado que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Prof. Luzimar Campos da Silva pela orientação desde o mestrado, pelos inúmeros ensinamentos, confiança, e contribuições à minha formação profissional.

À Prof. Alice Pita Barbosa pela coorientação, por toda ajuda na estruturação da tese, e por todo apoio pessoal e profissional.

Ao Prof. Cleberson Ribeiro por todo apoio desde minha graduação.

Agradeço a todos professores da Botânica por toda minha formação, e a todos os mestres que passaram pela minha vida.

As técnicas Aurora e Rosana pela assistência técnica e amizade.

A todos colegas do laboratório de Anatomia Vegetal, que durante a minha gravidez foram meus braços e pernas, não citarei nomes (porque são muitos) para não correr o risco de esquecer alguém, vocês sempre serão lembrados com muito carinho. Obrigada por todos os ensinamentos, acadêmicos ou não!

Aos meus irmãos de sangue e aos de coração, agradeço por tudo.

Agradeço ao meu companheiro de vida Ademir, e meu filhotinho Caiman, vocês são luz em minha vida!

E finalmente a todos que de alguma forma contribuíram para a minha conquista, gratidão!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

GOMES, Thamires Fernanda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2022. ***Bixa orellana* L. (Bixaceae): uma espécie potencial fitoindicadora de flúor na atmosfera.** Orientadora: Luzimar Campos da Silva. Coorientadora: Alice Pita Barbosa.

O flúor (F) liberado durante a manufatura de alumínio, fertilizantes, vidros e cerâmicas, é considerado altamente tóxico para as plantas, causando danos em concentrações relativamente baixas. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas promovidas pelo F em *Bixa orellana*, em curto e longo prazo, após o fim da exposição ao poluente. As plantas foram submetidas à chuva simulada contendo concentrações crescentes de F. Durante o experimento foram realizadas análises visuais, e ao final, foram coletadas amostras foliares para análises em microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, teste para morte celular, quantificação de pigmentos fotossintéticos, de F, bixina, fitohormônios e enzimas antioxidantes, além de análise de trocas gasosas. Após o 6º dia a aplicação da chuva foi interrompida, e as plantas ficaram sob monitoramento. Durante o monitoramento, foram realizadas análises visuais. Completados 85 dias de experimento, foram coletadas amostras foliares para quantificação de F e biomassa, além de análise de trocas gasosas. Ocorreram cloroses, necroses, encarquilhamento foliar e alterações na estrutura anatômica das plantas expostas ao F. As folhas apresentaram tricomas glandulares flácidos, células epidérmicas atrofiadas, células do parênquima clorofiliano e laticíferos plasmolisados. Houve redução nos parâmetros fotossintéticos e no teor de pigmentos fotossintéticos. O estresse causado pelo F promoveu o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX). A concentração dos fitohormônios Ácido Salicílico (SA) e Ácido Aminociclopropano Carboxílico (ACC) aumentou durante o estresse, já a concentração de bixina nas folhas não foi alterada. Após 85 dias sem aplicação de F, as cloroses progrediram em extensão e evoluíram para necroses. Folhas adultas e jovens apresentaram alto teor de F em relação ao controle, além de redução nos valores da taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s) e queda na produção de biomassa. Os sintomas apresentados indicam que *B. orellana* é sensível ao F, podendo ser indicada como espécie fitoindicadora de F na atmosfera em possíveis programas de biomonitoramento. Concluímos ainda que, após 85 dias sem exposição ao F, não houve respostas de recuperação aos danos provocados pelo poluente.

Palavras-chave: Alterações anatômicas. Urucum. Bixina. Poluição do ar. Hormônios.

ABSTRACT

GOMES, Thamires Fernanda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2022. ***Bixa orellana* L. (Bixaceae): a potential phytoindicator species of fluorine in the atmosphere.** Advisor: Luzimar Campos da Silva. Co-Advisor: Alice Pita Barbosa.

Fluoride (F) released during the manufacture of aluminum, fertilizers, glass and ceramics is considered highly toxic to plants, causing damage at relatively low concentrations. The objective of this study was to evaluate the responses promoted by F in *Bixa orellana*, in the short and long term, after the end of exposure to the pollutant. The plants were submitted to simulated rain containing increasing concentrations of F. During the experiment, visual analyzes were performed, and at the end, leaf samples were collected for analysis in light microscopy, scanning electron microscopy, cell death test, quantification of photosynthetic pigments, F, bixin, phytohormones and antioxidant enzymes, in addition to gas exchange analysis. After the 6th day, the application of rain was interrupted, and the plants were monitored. During monitoring, visual analyzes were performed. After 85 days of experiment, leaf samples were collected for quantification of F and biomass, in addition to gas exchange analysis. There were chlorosis, necrosis, leaf wrinkling and alteration in the anatomical structure of plants exposed to F. The leaves showed flaccid glandular trichomes, atrophied epidermal cells, chlorophyll parenchyma cells and the laticifers were plasmolyzed. There was a reduction in photosynthetic parameters and in the content of photosynthetic pigments. The stress caused by F promoted an increase in the activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POX) enzymes. The concentration of the phytohormones Salicylic Acid (SA) and Aminocyclopropane Carboxylic Acid (ACC) increased during stress, whereas the concentration of bixin in the leaves was not altered. After 85 days without F application, the chloroses progressed in extent and progressed to necrosis. Adult and young leaves showed high F content in relation to control, in addition to a reduction in the values of photosynthetic rate (*A*), stomatal conductance (*g_s*) and decrease in biomass production. The symptoms presented indicate that *B. orellana* is sensitive to F, and may be indicated as a phytoindicator species of F in the atmosphere in possible biomonitoring programs. We also concluded that, after 85 days without exposure to F, there were no recovery responses to the damages caused by the pollutant.

Keywords: Anatomical changes. Annatto. Bixin. Air pollution. Hormones.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO I - Alterações morfoanatômicas e metabólicas em <i>Bixa orellana</i> exposta ao flúor atmosférico	15
RESUMO	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO II - O urucum (<i>Bixa orellana</i>) se recupera após exposição ao poluente flúor?	54
RESUMO	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
3. RESULTADOS	58
4. DISCUSSÃO	60
5. CONCLUSÃO	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas duas décadas, vários fatores naturais e antropogênicos aumentaram o nível de flúor (F) na atmosfera, um poluente altamente fitotóxico, reativo e não biodegradável no meio ambiente. Plantas e animais quando expostos a altas concentrações de F podem ter sua sobrevivência ameaçada (Davison & Weinstein, 2006; Louback et al., 2016; Yepu et al., 2017; Mukherjee et al., 2020; Gomes et al., 2021).

O flúor (F) é um elemento químico não metálico, considerado como o mais eletronegativo e quimicamente ativo dos elementos químicos. Este elemento pode causar danos à vegetação mesmo em concentrações extremamente baixas na atmosfera, sendo considerado o mais fitotóxico dentre os diversos poluentes atmosféricos, tais como ozônio (O_3) e dióxido de enxofre (SO_2) (Arndt, 1995; Klumpp et al., 1996; Panda, 2015). O F ocorre naturalmente na crosta terrestre, na forma de compostos minerais como criolita (Na_3AlF_6), fluorita (CaF_2) e apatita ($Ca_{10}F_2(PO_4)_6$). Por ação antrópica, o F é lançado na atmosfera nos processos industriais como fundição de alumínio, produção de adubos minerais, fabricação de vidros e cerâmicas, sendo emitido na forma de fluoreto de hidrogênio (HF), a principal forma encontrada na atmosfera (Arndt et al., 1995; Weinstein & Davison, 2004; Hong et al., 2018; Ron Fuge, 2019).

O F em sua forma gasosa penetra na folha principalmente pelos estômatos e, em menor proporção, através da cutícula. Já em solução aquosa, é absorvido por toda a superfície foliar. No interior da folha, este elemento move-se via apoplasto, chegando às margens e ápices foliares pela corrente transpiratória, onde é acumulado, causando injúrias nestas regiões (Baunthiyal & Ranghar, 2014; Rhimi et al., 2016; Mondal, 2017; Anjos et al., 2018).

A poluição atmosférica pode ser monitorada através do uso de bioindicadores, ou seja, usando seres vivos para verificar e avaliar a qualidade ambiental ou dos efeitos da poluição naquele ambiente (Klumpp, 2001). Esse método apresenta vantagens, como baixo custo, e melhor interpretação das relações ecológicas. Isto por que, os bioindicadores podem modificar suas funções vitais em resposta às alterações ambientais, fornecendo assim, informações sobre a situação do ambiente (Lima, 2001; Oliva & Figueiredo, 2005; Gorelova & Frontasyeva, 2017; Yalaltdinova et al., 2018). O monitoramento da poluição atmosférica utilizando organismos bioindicadores tem sido apontado cada vez mais como uma alternativa e/ou complemento a métodos físico-químicos sofisticados, que requerem custos elevados de implantação, operação e manutenção (Buss et al., 2003).

Plantas expostas ao F podem apresentar alterações macro, microscópicas e metabólicas. Estas alterações resultam em danos para a planta, além de prejuízos na comercialização da

espécie. Acredita-se que o F possa diminuir a produtividade de espécies de interesse agrônomo, como a cana-de-açúcar e o milho (Fortes et al., 2003; Otto et al., 2007). No entanto, pouco se sabe dos efeitos do F na produtividade de espécies lenhosas de interesse econômico como o urucum.

Bixa orellana L. (Bixaceae) é uma espécie lenhosa, nativa da América do Sul. No Brasil, é popularmente conhecida como urucum, urucu, colorau, colorífico, açafroa e açafroeira-da-terra (Lorenzi, 2002; Moreira et al., 2015; Dequigiovanni et al., 2018). Esta espécie é a única planta terrestre que produz o pigmento bixina, um apocarotenoide dicarboxílico éster monometílico, que confere coloração vermelha às sementes de *B. orellana* (Lorenzi & Matos, 2008; Stringheta et al., 2008; Silva et al., 2009).

A bixina é um dos pigmentos mais antigos usados pelos seres humanos, e seu uso está cada vez mais em evidência, especialmente devido à proibição do uso de corantes sintéticos (Rather & Mohammad, 2016). Este pigmento tem se destacado na indústria alimentícia como corante natural para derivados lácteos, embutidos e doces. Além disso, também é utilizado nas indústrias farmacêutica, têxtil, de tintas e de cosméticos (Stringheta & Silva, 2008), e representa o segundo aditivo de cor natural, mais utilizado em processos industriais (Lauro, 1991; Bouvier et al., 2003). Dentre as atividades farmacológicas registradas para *B. orellana* algumas já confirmam indicações terapêuticas como a antibacteriana e antifúngica (Otero et al., 2000; Fleischer et al., 2003; Braga et al., 2007; Lorenzi & Matos, 2008; Shahid-ul-Islam & Mohammad, 2016). Embora os maiores teores de bixina estejam presentes nas sementes de *B. orellana*, suas folhas, caule e raízes também apresentam bixina (Rodriguez-Avila et al., 2011; Almeida et al., 2021), esses órgãos vegetativos também têm sido utilizados na medicina popular (Agra et al., 2007). Além dos laticíferos secretores de bixina (Almeida et al., 2021), *B. orellana* apresenta outras estruturas secretoras características diagnósticas da família Bixaceae, como ductos de mucilagem, tricomas peltados (Metcalf & Chalk, 1957, 1988; Freitas, 2009) e nectários florais e extraflorais (Metcalf & Chalk, 1988; Miranda et al., 2017). Assim, a espécie tem sido cultivada extensivamente no Brasil, sendo de grande importância para a economia nacional (Rather & Mohammad, 2016).

É de grande importância verificar os efeitos do F na produtividade das plantas, diante da escassez de trabalhos que avaliem a sensibilidade de *B. orellana* a poluentes atmosféricos. Também não existem informações sobre os danos causados pelo F em longo prazo nestas plantas, após o fim da imissão desse elemento. *B. orellana* é uma espécie nativa e rica em estruturas secretoras, muito importante economicamente. Assim, são necessários estudos que

identifiquem os possíveis danos causados pelo F nesta espécie a fim de auxiliar na resolução de problemas ambientais e econômicos relacionados a mesma.

A partir de análises realizadas em ambiente controlado, pretendemos responder as seguintes perguntas:

- Qual o efeito de diferentes concentrações de F sobre a morfoanatomia e fisiologia de *Bixa orellana*?
- Qual o grau de susceptibilidade de *Bixa orellana* ao F?
- Quais seriam os danos causados pelo F em longo prazo nestas plantas, após o fim da imissão desse elemento?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agra, M. F., Freitas, P. F., Barbosa-Filho, J. M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 17, 114-140
- Almeida, A. L., Freitas, P. F., Ferreira, C. P., Ventrella, M. C. 2021. Syncytial development of annatto (*Bixa orellana* L.) pigment gland: A curious type of anastomosed articulated laticifer. *Flora*. 274, 151-727
- Anjos, T. B. O., Louback, E., Azevedo, A. A., Silva, L. C. 2018. Sensibility of *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) exposed to fluoride-simulated fog. *Ecological Indicators*. 90, 154-163
- Arndt, U., Flores, F., Weinstein, L. H. 1995. Fluoride effects on plants, diagnose of injury in the vegetation of Brazil. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS
- Baunthiyal, M., Ranghar, S. 2014. Physiological and biochemical responses of plants under fluoride stress: an overview. *Fluoride*. 47, 287–293
- Braga, F. G., Bouzada, M. L. M., Fabri, R. L., Matos, M. O., Moreira, F. O., Scio, E., Coimbra, E. S. 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 396-402
- Buss, D. F., Baptista, D. F., Nessimian, J. L. 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Cadernos de Saúde Pública*. 19, 465-473
- Davison, A. W., Weinstein, L. H. 2006. Some problems relating to fluorides in the environment: effects on plants and animals. In: Tressaud, A. (Ed.), *Fluorine and the Environment. Atmospheric Chemistry, Emissions & Lithosphere*. pp. 251– 298
- Dequigiovanni, G., Ramos, S. L. F., Alves, P. A., Fabri, E. G., Picanco-Rodrigues, D., Clement, C. R., Gepts, P., Veasey, E. A. 2018. Highly structured genetic diversity of *Bixa orellana* var. urucurana, the wild ancestor of annatto, in Brazilian Amazonia. *PLoS ONE* 13: e0198593
- Fleischer, T. C., Ameade, E. P. K., Mensah, M. L. K., Sawyer, I. K. 2003. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*. 74, 136-138

- Fortes, C., Duarte, A. P., Matsuoka, S., Hoffmann, H. P., Lavorenti, N. A. 2003. Toxicidade de flúor em cultivares de milho em área próxima à uma indústria cerâmica, Araras (SP). *Bragantia*, Campinas. 62, 275-281
- Freitas, P. F. 2009. Leaf anatomy, ontogeny and histochemistry of secretory structures of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). University of Viçosa, Brazil. MSc Thesis
- Fuge, R. 2019. Fluorine in the environment: a review of its sources and geochemistry. *Appl Geochem*. 100, 393–406
- Gomes, T. F., Lima, A. M., Marques, A. P. P. Silva, L. C. 2021. Effects of fluoride emission on the morphoanatomy of three plant species endemics to Brazil using passive biomonitoring. *Environ Sci Pollut Res*. 28, 33083–33095
- Gorelova, S. V., Frontasyeva, M. V. 2017. The use of higher plants in biomonitoring and environmental bioremediation. In: Ansari A, Gill S, Gill R, Lanza RG, Newman L (eds) *Phytoremediation*
- Hong, X., Liang, H., Chen, Y., Liu, Y., Shi, Y. 2018. Distribution of fluorine in the surface dust of Wuda coal base, Inner Mongolia of Northern China. *J Geochem Explor*. 188, 390–397
- Klumpp, A, Domingos, M, Klumpp, G. 1996. Assessment of the vegetation risk by fluoride emissions from fertiliser industries at Cubatao, Brazil. *Sci Total Environ*. 192, 219–228
- Klumpp, A., et al. 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*. 4, 511-518
- Lauro, G. J. 1991. A primer on natural colors. *Am. Assoc. Cereal Chemists*. 36, 949-953
- Li, M., Li, C., Zhang, M. 2018. Exploring the spatial spillover effects of industrialization and urbanization factors on pollutants emissions in China's Huang-Huai-Hai region. *Journal of Cleaner Production*. 195, 154–162
- Lima, J. S. 2001. Processos biológicos e o biomonitoramento: aspectos bioquímicos e morfológicos. In: Maia, N. B.; Martos, H. L.; Barrella, W. (Org.). *Indicadores ambientais: conceitos e aplicações*. São Paulo: Editora da PUC. 77-94
- Lorenzi, H. 2002. *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 368p

- Lorenzi, H., Matos, F. J. A. 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 544p
- Louback, E., Pereira, T. A. R., de Souza, S. R., de Oliveira, J. A., Da Silva, L. C. 2016. Vegetation damage in the vicinity of an aluminum smelter in Brazil. *Ecol Indic.* 67, 193–203
- Metcalf, C.R., Chalk, L. 1988. Anatomy of the dicotyledons: Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. Clarendon Press. 2º edição
- Miranda, R. M., Nery, L. A., Ventrella, M. C. 2017. Extrafloral nectaries of annatto (*Bixa orellana* L.): anatomy, nectar composition and activity during organ development. *Acta Bot. Bras.* 31, 468–476.
- Mondal, N. K. 2017. Effect of fluoride on photosynthesis, growth and accumulation of four widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in India. *Ecotox Environ Safety.* 144, 36–44
- Moreira, P. A., Lins, J., Dequigiovanni, G. Veasey, E.A., Clement, C.R. 2015. The domestication of annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia, *Econ Bot.* 69, 127–135
- Mukherjee, I., Singh, U. K. 2020. Fluoride abundance and their release mechanisms in groundwater along with associated human health risks in a geologically heterogeneous semi-arid region of east India. *Microchem J.* 152, 104-304
- Oliva, M. A., Figueiredo, G. D. E., Nees, S., Stapf, N. 2005. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. *Pesqui Agropecuária Bras.* 1, 389–397
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Osorio, R. G., Saldarriaga, M., Díaz, S. L. 2000. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colômbia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology.* 73, 233-241
- Otto, R., Faria, M. R. M., Queiroz, F. E. C., Moura, T. A., Vitti, G. C., Cantarella, H. 2007. Rendimento da Cana-de-açúcar é afetado por flúor. *Bragantia, Campinas.* 66, 505-509
- Panda, D. 2015. Fluoride toxicity stress: physiological and biochemical consequences on plants. *Int J Bioresour Environ Agric Sci.* 1, 70-84

- Rather, L. J., Mohammad, F. 2016. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications—A review. *Journal of advanced research*. 7, 499-514
- Rhimi, N., Mezghani, I., Elloumi, N., Nasri, M., Ben, Abdallaha, F. 2016. Morphological and anatomical responses of pear and almond trees to fluoride air pollution. *Fluoride*. 49, 130-8
- Rodriguez-Avila, N. L., Narvaez-Zapata, J. A., Ramirez-Benitez, J. E., Aguilar-Espinosa, M.L., Rivera-Madrid, R. 2011. Identification and expression pattern of a new carotenoid cleavage dioxygenase gene member from *Bixa orellana*, *J. Exp Bot*. 62, 5385–5395
- Ron, Fuge. 2019. Fluorine in the environment, a review of its sources and geochemistry, *Applied Geochemistry*. 100, 393-406
- Shahid-ul-Islam, L. J., Mohammad, F. 2016. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications—a review. *J Adv Res*. 7, 499-514
- Silva, P. I., Nachtigall, A. M., Stringheta, P. C. 2009. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (*Bixa orellana* L.). *Ciência e Agrotecnologia*. 33, 1892-1897
- Stringheta, P. C., Silva, P. I., Costa, M. G. C., Soares, V. L. F., Gesteira, A.G., Cruz, A. C. F., Otoni, W. C. 2008. Pigmentos do urucum – estrutura, química, biossíntese e degradação. p. 24-26. In: Stringheta, P. C., Silva, P. I. (Org.). *Pigmentos do urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações*. 1. ed. Viçosa-MG: Gráfica e Editora Suprema, 166p
- Weinstein, L. H., Davison, A. 2004. *Fluorides in the environment: Effects on Plants and Animals*, CABI Publishing, Wallingford, UK
- Yalaltdinova, A., Kim, J., Baranovskaya, N., Rikhvanov, L. 2018. *Populus nigra* L. as a bioindicator of atmospheric trace element pollution and potential toxic impacts on human and ecosystem. *Ecol Indic*. 95, 974–983
- Yepu, L., Shengli, W., Prete, D., Suyin, X., Zhongren, X., Fei, Z., Qian, Z. 2017. Accumulation and interaction of fluoride and cadmium in the soil-wheat plant system from the wastewater irrigated soil of an oasis region in northwest China. *Sci Total Environ*. 595, 344–351

CAPÍTULO I

Alterações morfoanatomicas e metabólicas em *Bixa orellana* exposta ao flúor atmosférico

RESUMO

O flúor (F) é onipresente no ambiente, sendo proveniente de fontes naturais e/ou antropogênicas. Este elemento pode causar danos à vegetação mesmo em concentrações extremamente baixas na atmosfera, por isso, o F é muito mais tóxico do que a maioria dos outros poluentes atmosféricos. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas promovidas pelo F em *Bixa orellana*, uma espécie nativa da América do Sul, e economicamente importante por produzir bixina, um pigmento usado como corante natural na indústria alimentícia, cosmética e têxtil. As plantas foram submetidas à chuva simulada contendo 0, 10, 20 e 40 mg/L de F. Durante o experimento foram realizadas análises visuais, e ao final, foram coletadas amostras foliares para microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, teste para morte celular, quantificação de pigmentos fotossintéticos, de F, de bixina, de fitohormônios e de enzimas antioxidantes, além de trocas gasosas. A concentração de F em *B. orellana* aumentou em função da concentração utilizada em cada tratamento. Nas folhas das plantas expostas ao poluente, ocorreram cloroses, necroses e encarquilhamento foliar. Houve redução da assimilação de CO₂ (*A*), da condutância estomática (*gs*), da respiração (*R_d*), e do teor de pigmentos fotossintéticos. O estresse causado pelo F promoveu o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX). O estresse induziu o aumento na concentração dos fitohormônios Ácido Salicílico (SA) e Ácido Aminociclopropano Carboxílico (ACC). A concentração de bixina nas folhas não foi alterada. Anatomicamente, as folhas apresentaram células epidérmicas atrofiadas, e tricomas glandulares flácidos. Laticíferos, células do parênquima lacunoso e paliádico encontraram-se plasmolisados. Grupos celulares corados de azul foram verificados nas folhas de todos os tratamentos contendo F. Conclui-se que *B. orellana* apresenta sensibilidade ao F e responde com rapidez à presença desse poluente, podendo ser usada como uma espécie fitoindicadora de F na atmosfera em possíveis programas de biomonitoramento.

1. INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica tornou-se um problema universal devido ao desenvolvimento industrial e urbano, acelerado e insustentável. Quando encontrados em alta concentração no ar, os poluentes atmosféricos são prejudiciais não só aos animais e seres humanos, mas também representam uma ameaça para as espécies vegetais (Davison & Weinstein, 2006; Yepu et al., 2017; Mukherjee et al., 2019).

O flúor (F) é um poluente altamente reativo, e dentre os contaminantes atmosféricos, ele se destaca por ser extremamente fitotóxico, podendo causar diversos danos às plantas (Mondal, 2017, Yepu et al., 2017; WHO, 2019; Mukherjee & Singh, 2020).

O F pode estar presente naturalmente em pequena quantidade na atmosfera, água, e no solo (Bharti et al., 2017), mas também pode ser emitido antropogenicamente, através da combustão de carvão, mineração, fabricação de alumínio, produção de fertilizantes, dentre outros. Este halogênio gasoso é emitido para atmosfera principalmente na forma de fluoreto de hidrogênio (HF) (Weinstein & Davison, 2004; Hong et al., 2018; Ron Fuge, 2019). Devido a sua alta toxicidade, plantas próximas a estas fontes de liberação de F estão sujeitas aos danos que este poluente pode causar (Fornasiero, 2003; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2010; Sant'Anna-Santos et al., 2014; Louback et al., 2016; Gomes et al., 2021).

Quando presente no ambiente em seu estado gasoso, o F é absorvido pela planta através dos estômatos, por meio das trocas gasosas entre a planta e o meio externo (Domingos et al., 2003; Mustafa et al., 2018), os estômatos são as principais vias de entrada do flúor gasoso nas plantas (Rodrigues et al., 2018a; Anjos et al., 2018; Gomes et al., 2021). Quando este poluente está dissolvido em água, pode ser absorvido por toda a superfície foliar (Weinstein & Davison, 2004; Rhimi et al., 2016; Mondal, 2017). No interior da folha, o transporte de F pode ocorrer através de canais iônicos e/ou através do apoplasto, chegando às margens e ápices foliares pela corrente transpiratória, onde é acumulado, causando injúrias nestas regiões (Pita-Barbosa et al., 2009; Baunthiyal & Ranghar 2014; Mondal, 2017; Anjos et al., 2018).

A exposição das plantas ao F pode levar a alterações que se manifestam em níveis morfológicos, anatômicos e fisiológicos. A complexidade dos efeitos deste poluente nas plantas está diretamente relacionada à suscetibilidade genética da espécie avaliada, ao estágio de desenvolvimento foliar, tempo de exposição do indivíduo, e a concentração de F na atmosfera (Weinstein & Davison 2004; Gadi et al., 2020).

O F é um elemento eletronegativo, que tem a capacidade de ligar-se a cátions como o magnésio (Mg^{2+}), formando complexos “metal-flúor” extremamente estáveis. Sabe-se que o

Mg^{2+} é um importante constituinte da molécula de clorofila, assim, quando o F forma esses complexos, pode causar a indisponibilidade do Mg^{2+} na biossíntese da clorofila, podendo provocar alterações macroscópicas na planta como a clorose foliar (Fornasiero, 2003; Anjos et al., 2018; Rodrigues et al., 2018b). Alterações microscópicas na superfície foliar, como ruptura da cutícula e de tricomas (Pita-Barbosa et al., 2009), erosão das ceras epicuticulares e danos nas cristas estomáticas (Fornasiero, 2001; Sant'Anna-Santos et al., 2012; Louback et al., 2016; Anjos et al., 2018; Gomes et al., 2021), além de modificações celulares como, colapso e hipertrofia (Silva et al., 2000; Sant'Anna-Santos et al., 2014; Rodrigues et al., 2017, 2018b), também podem ocorrer em decorrência da ação do F.

O F também pode afetar processos fisiológicos importantes nas plantas, reduzindo a taxa fotossintética, a fluorescência da clorofila *a* e o teor de pigmentos fotossintéticos. Este poluente pode provocar, também, aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), e das enzimas do sistema antioxidativo (Peixoto et al., 2005; Divan Junior et al., 2007; Mondal, 2017; Zouari et al., 2017).

Bixa orellana L. (Bixaceae) é um arbusto nativo da América tropical do Norte, Central e do Sul. Esta espécie recebe diversas denominações em todo o mundo e, no Brasil é popularmente conhecida como urucum, urucu, colorau, colorífico, açafoa e açafoeira-da-terra (Lorenzi, 2002; Moreira et al., 2015; Dequigiovanni et al., 2018). Esta planta é facilmente distinguida por seu fruto característico e o pigmento vermelho que se desprende da testa de suas sementes, conhecido como bixina, um apocarotenóide monometil éster di-carboxílico (Preston & Rickard, 1980; Lorenzi, 2002; Stringheta et al., 2008; Lorenzi & Matos, 2008; Silva et al., 2009; Louro et al., 2015). Este pigmento tem se destacado na indústria alimentícia, têxtil, de tintas e de cosméticos (Stringheta et al., 2008).

Atualmente, tem-se dado ênfase à utilização de produtos naturais que propiciam melhores condições de saúde ao ser humano. É neste aspecto que surge a importância econômica de *B. orellana*, que, por produzir um corante natural, vem ganhando interesse das indústrias, em face da crescente proibição da utilização de corantes sintéticos. Assim, o Brasil se consolida como o maior produtor de sementes e corantes de urucum de todo o mundo (Marcolino et al., 2011; Shahid-ul-Islam & Mohammad, 2016; IBGE, 2020).

Não só as sementes de *B. orellana* contêm estruturas secretoras de bixina, mas todos os órgãos da planta (Freitas et al., 2009; Rodriguez-Avila et al., 2011; Rivera-Madrid et al., 2013; Almeida et al., 2021). Além disso, folhas, sementes e raízes desta espécie são utilizados na medicina popular (Agra et al., 2007), e dentre as atividades farmacológicas registradas, algumas

já confirmam indicações terapêuticas como a antibacteriana, antifúngica, efeito anticancerígena e prevenção de diabetes (Otero et al., 2000; Fleischer et al., 2003; Braga et al., 2007; Lorenzi & Matos, 2008; Tibodeau & Isham, 2010; Rossoni-Júnior et al., 2012; Coronado-Cáceres et al., 2014).

Os hormônios regulam o crescimento e o desenvolvimento do vegetal, e assim, interferem na resistência a estresses bióticos e abióticos que afetam negativamente a saúde das plantas (Howe & Jander, 2008; Pulga, 2016; Shigena & Argueso, 2016). Alguns estudos têm mostrado que o desenvolvimento da planta é regulado por cinco principais classes de hormônios, sendo eles, ácido abscísico, auxinas, giberelinas, citocininas e etileno (Vogt, 2010; Thakur et al., 2013). Alguns desses hormônios possuem forte correlação com estresses ambientais. Entretanto, os possíveis efeitos do F, um elemento potencialmente tóxico, na síntese desses hormônios precisa ser elucidado, uma vez que o estresse provocado pelo F pode interferir no desenvolvimento da planta.

As respostas fitotóxicas à exposição do F são variáveis, reforçando a importância de estudos sobre potenciais espécies fitoindicadoras para o estabelecimento de critérios adequados para reconhecimento de biomarcadores da presença de F no ambiente.

Apesar da importância econômica e das perspectivas de uso de *B. orellana*, ainda não se conhece a relação entre esta espécie e poluentes atmosféricos, como o F. Sendo assim, a análise dos efeitos causados pelo F nesta planta é de grande importância, pois o mesmo pode alterar a síntese de bixina, além de outros processos metabólicos, que podem acarretar prejuízos na comercialização de seus frutos. É de grande importância verificar os efeitos do F na produtividade das plantas, diante da escassez de trabalhos que avaliem a sensibilidade de *B. orellana* a poluentes atmosféricos. *B. orellana* é uma espécie nativa e rica em laticíferos secretores de bixina, muito importante economicamente. Assim, são necessários estudos que identifiquem os danos causados pelo F nesta espécie a fim de auxiliar na resolução de problemas ambientais e econômicos relacionados à mesma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material botânico e condição experimental

As mudas de *Bixa orellana*, com oito meses de idade e cerca de 50 cm de altura, foram fornecidas pelo viveiro do Instituto Estadual de Florestas (IEF), localizado no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. Essas plantas foram transferidas para vasos de 11 L, os quais foram preenchidos com substrato orgânico (Tropstrato HT®).

Durante todo o experimento, as plantas permaneceram em ambiente controlado e cada planta recebeu 50 ml de solução nutritiva de Hoagland 50% (Hoagland & Arnon, 1950) semanalmente. As plantas foram irrigadas com água deionizada, em dias alternados, para manter a capacidade de campo do substrato.

O experimento consistiu na exposição dos indivíduos à chuva simulada com F, sendo este utilizado na forma de uma solução de fluoreto de potássio (KF) preparada em água destilada (pH 6,0) (Silva et al., 2000). Para o tratamento controle, foi utilizado apenas água destilada (pH 6,0). A técnica de aplicação de KF simulando uma névoa, foi baseada no estudo de Pita-Barbosa et al. (2009), utilizando-se um pulverizador manual de pré-compressão. Após realização de um pré-teste de aplicação da solução nas plantas, foi determinado o volume de 30 ml como o suficiente para molhar toda a superfície da planta. As plantas foram expostas ao spray contendo F diariamente, às 8 horas. A simulação do nevoeiro ocorreu no exterior da casa de vegetação, respeitando-se o tempo de 15 min antes e depois da aplicação, para a aclimação das plantas ao ambiente. O solo de todos os indivíduos foi coberto durante a aplicação do poluente na parte aérea das plantas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se seis repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram compostos por 0; 10; 20 e 40 mg/L de KF.

2.2. Determinação do teor de flúor

Para a quantificação do F na matéria seca, foram coletadas folhas do terceiro nó a partir do ápice (n=4) dos indivíduos de todos os tratamentos, 24 horas após a última chuva simulada. As amostras foram secas em estufa, a 65 °C, e reduzidas, em moinho do tipo Wiley, em partículas com dimensões inferiores a 1 mm. Logo após, alíquotas de 0,25 g de cada repetição foram submetidas à extração em ácido sulfúrico 0,5 M (Fialho, 1997). A determinação potenciométrica do teor de F foi realizada com o uso de um eletrodo específico (Thermo Scientific Fluoride Ions Selective Electrode, Massachusetts, EUA) ligado ao aparelho analisador de íons (Orion Research Incorporated EA 920, Massachusetts, EUA).

2.3. Avaliação dos sintomas visuais

Todas as folhas com sintomas, de cada um dos indivíduos (n=6) de todos tratamentos, foram fotografadas diariamente, com o objetivo de registrar o início dos sintomas, e a evolução das cloroses ou necroses ocasionadas pelo flúor (Silva et al., 2000; Louback et al., 2016; Anjos et al., 2018).

As injúrias visuais foliares foram avaliadas conforme uma escala que classifica o grau da injúria de acordo com a porcentagem de área foliar danificada em relação ao tamanho da folha (Silva et al, 2000). Folhas levemente injuriada possuem manchas necróticas e cloróticas esparsas, folhas moderadamente injuriadas apresentam 30 a 50% da área foliar necrosada, folhas muito injuriadas possuem 50 a 70% da área foliar necrosada e folhas extremamente injuriadas apresentam mais de 70% da área foliar necrosada (Silva et al, 2000).

2.4. Avaliação de trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas (taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração interna de CO₂ (*C_i*), respiração (*R_d*)) foram obtidos por meio de um analisador portátil de gás infravermelho (LICOR Biosciences Inc., Nebraska, USA) equipado com câmara de fluorescência integrada (LI-6400-40, Lincoln, NE, USA). As medições foram realizadas no último dia de aplicação de F em folhas completamente expandidas do 3º nó a partir do ápice (n=4), de todos os indivíduos de cada tratamento, sob irradiância de 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, concentração atmosférica de CO₂ de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e temperatura de 25°C. A avaliação das trocas gasosas foi realizada entre 9 e 10 horas da manhã.

2.5. Quantificação de pigmentos cloroplastídicos

A quantificação de pigmentos fotossintéticos foi realizada em folhas completamente expandidas localizadas no terceiro nó, a partir do ápice, sem sintomas visuais. Para tal, três discos foliares de 5 mm cada, foram coletados de cada indivíduo (n=4), de todos os tratamentos, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator. Os discos foliares foram imersos em 4 ml de DMSO saturado com carbonato de cálcio e mantidos a 25 °C e ao abrigo da luz por 48 h. Posteriormente, determinou-se a absorbância nos comprimentos de onda de 663, 656 e 470 nm, em leitor de microplacas (modelo 892 Thermo Fisher Scientific Multiskan Go), determinando assim, os teores de clorofila *a* (Chl_a), clorofila *b* (Chl_b), clorofila total (Chl_{a+b}), e carotenoides, respectivamente, de acordo com Wellburn (1994).

2.6. Atividade enzimática

Foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase (POX, EC 1.11.1.7). O meio de extração para SOD, CAT e POX foi composto por tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v).

Para a obtenção do extrato enzimático foram utilizados 0,3 g de folha do 3º nó a partir do ápice, dos indivíduos de cada tratamento (n=4). Os meios de extração seguiram protocolo descrito por Peixoto et al. (1999). As proteínas foram determinadas pela metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando o reagente de Bradford e albumina bovina como padrão.

A atividade das POX foi determinada pela adição do extrato enzimático bruto ao meio de reação (Kar & Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorbância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance & Maehley, 1955).

A atividade da SOD foi determinada utilizando meio de reação descrito por Giannopolitis & Ries (1977) juntamente com 50 µl do extrato enzimático. A produção fotoquímica de azul de formazana foi determinada a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

A atividade da CAT foi determinada adicionando ao meio de reação 0,1 mL do extrato enzimático bruto (Havir & McHale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) e expresso em µmoles de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.7. Quantificação de bixina e fitohormônios

Para extração de bixina e hormônios, foi coletada 1 folha de cada indivíduo dos tratamentos com 0 e 40 mg/L de KF, 24 horas após aplicação da última chuva simulada. Cerca de 250 mg de folha foi macerado em nitrogênio líquido, e em seguida foram adicionados 400 µl de solução extratora (metanol: isopropanol: ácido acético 20:79:1), segundo metodologia descrita por Muller & Munné-Bosch (2011) com modificações. Após, as amostras foram agitadas em vortex e sonicadas. Após centrifugação (13000g, 10 min a 4°C), 350 µl do sobrenadante foi coletado para novo tubo. O processo de extração se repetiu no pellet resultante, e, em seguida, juntou-se os sobrenadantes. Uma última centrifugação (13000g, 5 min a 4°C) foi realizada para remoção de restos de tecidos em suspensão.

O extrato obtido para quantificação de bixina foi automaticamente injetado (300 µl) no sistema de Cromatografia Líquida de ultra eficiência em tandem com espectrometria de massas (UPLC-MS/MS), utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ) (modelo 6430 Agilent Technologies). A

separação cromatográfica foi realizada utilizando-se a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 μ m, 2.1 x 50mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB-C18, 1.8 μ m (Agilent). A fase móvel consistiu em: (A) ácido acético 0,02% em água e (B) ácido acético 0,02% em acetonitrila em um gradiente de tempo/%B de: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. Um fluxo de 0.3 ml/minuto e temperatura da coluna de 23°C foram utilizados. No espectrômetro de massas foi utilizada a fonte de ionização ESI (Electrospray Ionisation) com as seguintes condições: gas temperature of 300 °C, nitrogen flow rate of 10 L/min, nebulizer pressure of 35 psi and capillary voltage of 4000 V. O equipamento foi operado no modo MRM (multiple reaction monitoring) no qual monitora-se as massas do íon precursor/fragmento estabelecidas mediante testes de fragmentação de bixina (395/157; 395/145).

Para identificação e quantificação hormonal também foi utilizado o sistema de Cromatografia Líquida de ultra eficiência em tandem com espectrometria de massas (UPLC-MS/MS), utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ) (modelo 6430 Agilent Technologies Palo Alto, CA, EUA), conforme descrito em Napoleão et al (2017). Os equipamentos pertencem ao Núcleo de Biomoléculas da UFV.

2.8. Análises anatômicas

Ao final do experimento, folhas completamente expandidas do terceiro nó a partir do ápice, de três indivíduos de cada tratamento foram coletadas. Os fragmentos foliares coletados compreendiam regiões que a área sadia era contígua com uma área com sintoma visual. As amostras foram fixadas em solução glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica crescente e incluído em historresina glicol-metacrilato, de acordo com Gerrits (1964). Cortes transversais com 4 μ m de espessura foram obtidos com auxílio de um micrótomo rotativo de avanço automático (RM2265, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e corados em Azul de Toluidina (pH=4,0) (O'Brien & McCully, 1981). As lâminas permanentes foram montadas em Permount.

As imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema de captura de imagens (Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.9. Detecção de morte celular

Amostras da margem de folhas sem sintoma visual, localizadas no 3º nó, do ápice para a base, foram coletadas 24 horas após a última chuva simulada. Os fragmentos foliares ficaram imersos em solução de Azul de Evans (0,1%) durante 40 min, imediatamente após a coleta. Em seguida, as amostras foram clarificadas por 32 horas em álcool 95% aquecido a 45°C segundo protocolo adaptado de Kato et al (2007). Logo após, as amostras foram colocadas sobre lâminas que foram montadas em água glicerizada. As análises e imagens foram obtidas em microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema de captura de imagens (Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha).

2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Folhas do 3º nó a partir do ápice, foram coletadas de 3 indivíduos de cada tratamento, 24 horas após a última chuva simulada. As amostras foram fixadas em solução glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), desidratadas em série etílica e secas ao ponto crítico com auxílio do equipamento Critical Point Dryer (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A superfície das folhas foi coberta com ouro em metalizador (Sputter Coater modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein).

Todas as imagens foram fotodocumentadas em MEV (1430 VP, LEO, Cambridge, Inglaterra), utilizando o software Iridium Ultra. Os equipamentos pertencem ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

2.11. Análise estatística

Os dados obtidos (n=6) foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade de variância e, posteriormente, submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2014).

3. RESULTADOS

3.1. Determinação do teor de flúor

A concentração de F nas folhas adultas de *B. orellana* aumentou em função da concentração utilizada deste poluente em cada tratamento. As plantas expostas a 40 mg de F apresentaram 45,0 µg deste poluente, concentração 2.150% maior em relação ao controle. As plantas do tratamento com 20 mg de F, tiveram uma concentração de 12,1 µg do poluente, 505%

maior que o controle. Já o tratamento com 10 mg de F apresentou 5,1 μg do poluente, não diferindo significativamente do tratamento controle, o qual apresentou 2,0 μg de F (Fig. 1).

3.2. Avaliação dos sintomas visuais

Bixa orellana possui folhas alternas, simples, inteiras, cordiformes, membranáceas, ápice acuminado e base cordada, pecíolo alongado, cilíndrico, apresentando pulvino nas porções proximal e distal (Fig. 2). No tratamento controle, todas as folhas apresentaram-se saudáveis, exibindo a estrutura foliar típica da espécie (Fig. 2A, E).

Após 3 dias de aplicação da névoa simulada contendo F, todos os indivíduos dos tratamentos contendo o poluente já apresentavam sintomas visíveis de injúrias. As folhas dos tratamentos com menor concentração de F (10 e 20 mg F L⁻¹) apresentaram-se levemente injuriadas, com manchas cloróticas esparsas (Fig. 2B, C). No tratamento com maior concentração de F (40 mg F L⁻¹), as folhas apresentaram-se muito injuriadas, com 50% da área foliar necrosada (Fig. 2D). Com 6 dias de aplicação de F, as cloroses se desenvolveram em necroses, além de aumentarem a área da injúria foliar (Fig. 2F, G). As plantas expostas à mais alta concentração de F apresentaram-se extremamente injuriadas, com mais de 70% da área foliar necrosada. Nessa concentração, as margens e a lâmina foliar apresentaram aspecto enrugado (Fig. 2H).

3.3. Avaliação de trocas gasosas

As plantas tratadas com 40 mg F L⁻¹ apresentaram taxa fotossintética de 1,8 μmol , uma redução de 77,5% em relação ao controle que apresentou 8,0 μmol . Os tratamentos com menor concentração de F (10 e 20 mg F L⁻¹) também alteraram os valores da *A*, apresentando 4,0 e 5,1 respectivamente, com redução de 50 e 36,2% em relação ao controle, respectivamente (Fig. 3A).

A condutância estomática (*g_s*) acompanhou a redução da taxa fotossintética nos tratamentos com 40 e 10 mg de F, nessas plantas a *g_s* foi de 0,02 e 0,05 μmol , uma redução de 80 e 50% em relação ao controle, respectivamente. A *g_s* das plantas do tratamento com 20 mg de F foi de 0,08 μmol , não diferindo do tratamento controle (Fig. 3B).

A respiração (*R_d*) reduziu significativamente nos tratamentos contendo 10, 20 e 40 mg de F, estes tratamentos apresentaram *R_d* de 1,2; 1,1 e 1,2 μmol , uma redução de 42,5, 46,8 e 42,5% respectivamente, em relação ao controle (Fig. 3C).

Os valores médios da concentração interna de CO₂ (*C_i*), não variaram significativamente entre o controle e as plantas tratadas com F (Fig. 3D).

3.4. Quantificação de pigmentos cloroplastídicos

A concentração das clorofilas *a*, *b*, e clorofila total nas plantas do tratamento com maior teor de F (40 mg F L⁻¹) foi de 5,4; 3,8 e 10,8 µg, uma redução de 42,3%, 47,3%, 33,7% respectivamente, em relação ao controle. As plantas dos tratamentos contendo 10 mg de F apresentaram 9,6; 4,3 e 12,7 µg de clorofila *a*, *b*, e clorofila total, sem redução significativa em relação ao controle. No tratamento com 20 mg de F, os indivíduos apresentaram concentração de clorofilas *a*, *b*, e clorofila total de 7,9; 3,9 e 11,3 µg respectivamente, sem redução significativa em relação ao controle (Fig. 4A, B, C).

A concentração de carotenoides não variou entre os diferentes tratamentos (Fig. 4D).

3.5. Atividade enzimática

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX) aumentou significativamente somente na maior concentração de F utilizada (40 mg F L⁻¹), onde apresentaram 280,2 U e 14,2 umol, respectivamente. A atividade da SOD foi 66,2% superior ao controle, e a POX teve atividade 294,4% superior em relação ao controle. Não foi observada diferença significativa na atividade destas enzimas nas demais concentrações (Fig. 5A, C). A atividade da catalase (CAT), em resposta ao F, em todos os tratamentos, não apresentou diferenças significativas em relação ao controle (Fig. 5B).

3.6. Quantificação de bixina e fitohormônios

Os hormônios detectados nas folhas de *Bixa orellana* foram Ácido Salicílico (SA), Ácido Aminociclopropano Carboxílico (ACC) e Ácido Abscísico (ABA) (Fig. 6).

O SA não foi detectado nas plantas do tratamento controle, já no tratamento com F o conteúdo de SA foi de 2,1 ng ml (Fig. 6A).

No tratamento em que as plantas foram submetidas a 40 mg F L⁻¹, o conteúdo de ACC foi 360% maior que o tratamento controle (Fig. 6B).

A concentração de ABA em *B. orellana* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com e sem a presença de F (Fig. 6C).

A concentração de bixina não diferiu significativamente entre o tratamento controle e o tratamento com 40 mg de F (Fig. 7).

3.7. Análises anatômicas

A lâmina foliar de *Bixa orellana* é anfiestomática, ambas as faces da folha são recobertas por tricomas peltados, a epiderme é unisseriada e o mesofilo é dorsiventral. Laticíferos secretores de bixina estão distribuídos por todo parênquima lacunoso (Fig. 8A). Em todos os

tratamentos contendo flúor foram observados danos a estrutura foliar de *B. orellana*, os quais podemos citar o colapso das células epidérmicas (Fig. 8B, C, D), e a presença de tricomas glandulares flácidos, com formato alterado (Fig. 8B-D). Os laticíferos secretores de bixina também foram afetados pelo poluente, apresentando aspecto plasmolisado, e alteração no formato destas estruturas secretoras (Fig. 8B-D). Também ocorreu colapso de células do parênquima lacunoso e paliçádico (Fig. 8C, D).

3.8. Detecção de morte celular

As células foliares que tiveram a permeabilidade de suas membranas alterada pelo F, possibilitaram a infiltração do reagente Azul de Evans, assim, elas coraram-se de azul, evidenciando a morte celular. A reação positiva ocorreu em todos os tratamentos que foram submetidos ao F. Os danos foram observados em células do mesofilo, que se apresentaram fortemente coradas pelo Azul de Evans (Fig. 9C - H). Plantas do tratamento controle não apresentaram reação positiva para o reagente (Fig. 9A, B).

3.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície foliar na face abaxial do tratamento controle mostrou-se inalterada (Fig. 10A-C). Nas plantas expostas ao F, a superfície abaxial exibiu depressões na lâmina foliar (Fig. 10D) e rupturas da epiderme expondo o mesofilo (Fig. 10G). As células epidérmicas apresentaram-se colapsadas e a cera epicuticular exibia sinais de escamação (Fig. 10D, G, J). Os tricomas glandulares exibiram aspecto flácido e plasmolisado (Fig. 10F, G, I, M). O flúor provocou também ruptura das cristas estomáticas em todas as concentrações estudadas (Fig. 10E, H, L).

4. DISCUSSÃO

O flúor aplicado na forma de nevoeiro foi absorvido pelas plantas expostas, confirmado pela quantificação de flúor nas folhas, assim, a exposição de *Bixa orellana* a este poluente levou a alterações que se manifestaram aos níveis morfológico, fisiológico e anatômico.

Injúrias como cloroses e necroses são reconhecidamente os primeiros sintomas visíveis provocados pelo F (Arndt et al., 1995; Fornasiero, 2001; Stepec et al., 2019), conforme observado também em nosso estudo. Com apenas 3 dias de aplicação do poluente, observamos danos morfológicos mesmo no tratamento com menor concentração de F, o que nos indica uma alta sensibilidade de *Bixa orellana* ao F. Nesta espécie, a intensidade dos danos se mostrou diretamente proporcional às concentrações e ao período de aplicação do poluente, no entanto,

todas as concentrações foram danosas, sendo possível observar a progressão dos sintomas visuais de acordo com o aumento da concentração do F. Assim como *B. orellana*, as espécies lenhosas *Spondias mombim*, *S. purpurea* e *Sapindus saponaria* também apresentaram o mesmo comportamento em relação ao F, e foram indicadas como sensíveis a este poluente (Anjos et al., 2018; Rodrigues et al., 2018a; Rodrigues et al., 2020).

O F é um elemento eletronegativo, e, portanto, tem a capacidade de se ligar ao Mg^{2+} , formando assim complexos metal-flúor responsáveis pelo surgimento das cloroses, isso acontece devido à redução na biossíntese de clorofila (Fornasiero, 2001; Fornasiero, 2003; Saleh & Abdel-Kader, 2003; Louback et al. 2016). Com o decorrer do tempo da exposição ao F, essas cloroses evoluem para necroses, e essa mesma evolução de danos vem sendo observada por diversos pesquisadores (Pita-Barbosa et al., 2009; Sant'Anna-Santos et al., 2012; Anjos et al., 2018).

A fotossíntese de *B. orellana* foi afetada pelo F. Nossos resultados mostraram que a capacidade fotossintética foi significativamente reduzida, proporcionalmente ao aumento das concentrações de F nas folhas de *B. orellana*. As plantas apresentaram redução na taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s) e na respiração (R_d), em todos os tratamentos contendo F, no entanto, reduções mais severas foram observadas no tratamento com maior concentração desse poluente (40 mg F L^{-1}). Alterações no processo de fotossíntese também foram observadas em outras plantas tratadas com KF (Zouari et al., 2018; Rodrigues et al., 2020a, 2020b; Nawaz et al., 2021; Sun et al., 2021). A interpretação para esse efeito foi a resposta rápida de fechamento dos estômatos devido às variações ambientais. O fechamento dos estômatos seria uma das primeiras respostas das plantas aos poluentes atmosféricos, um mecanismo que diminui a entrada de poluentes nos tecidos vegetais, mas que, consequentemente, pode levar à redução das taxas fotossintéticas (Cai et al., 2016). Além desse fator, danos ocorridos nas células-guarda dos estômatos, podem prejudicar a condutância estomática, e consequentemente pode afetar o processo fotossintético (Xu, 1997; Ming et al., 2008; Sun et al., 2021), como as cristas estomáticas rompidas, verificadas em nossa pesquisa.

A redução no teor dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas a , b , clorofila total) neste trabalho, sugere que houve alterações na biossíntese e/ou a degradação destes pigmentos, promovida pela maior dose de F utilizada. O F é o elemento mais eletronegativo da tabela periódica, e tem a capacidade de se ligar a íons de magnésio, formando fluoretos metálicos, alterando assim, a síntese de clorofila (Fornasiero, 2001, Kumar et al., 2013; García & Borghino, 2015). A redução na concentração de pigmentos é comum em plantas sob condições

de estresse, afetando negativamente a capacidade fotossintética. Respostas similares a de *B. orellana* ao F, foram relatadas em outras espécies quando expostas a este poluente (Saleh & Abdel-Kader, 2003; Paula et al., 2005; Gupta et al., 2009; Bhargava & Bhardwaj, 2010; Rhimi et al., 2016).

Plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e a desintoxicação destes compostos instáveis e altamente reativos do organismo pode ser feita por meio de antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), dentre outras (Das & Roychoudhury, 2014; Hossain et al., 2015; Gadi et al., 2020). Em nossa pesquisa, as enzimas SOD e POX desempenharam importante papel na defesa de *B. orellana* no tratamento com maior concentração de F. Isto se deve ao fato de que a SOD é considerada a primeira linha de defesa das plantas, convertendo o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (García-Caparrós et al., 2020), já a POX atua na conversão do H_2O_2 . Estas duas enzimas desempenham importante papel na redução de EROs em plantas submetidas a estresses ambientais (Hasanuzzaman et al., 2020b). Assim como em *B. orellana*, o aumento na atividade destas enzimas também foi verificado em outros estudos (Peixoto et al., 2005; Chakrabarti & Patra, 2013; Asthir & Tak, 2017; Banerjee & Roychoudhury, 2019b).

Os laticíferos de *B. orellana* secretam e acumulam o carotenoide bixina (Almeida et al., 2021), e quando estes laticíferos têm sua forma alterada, como o ocorrido nesta pesquisa, podemos esperar que a síntese de bixina possa ser afetada. No entanto, não foi o observado por nós, onde verificamos que a maior concentração de F utilizada no experimento não causou alteração na concentração de bixina das folhas. No entanto, se faz necessário um monitoramento com um período de exposição maior da planta, além de também se avaliar os órgãos reprodutivos, a fim de investigar os efeitos do F na bixina presente nos frutos. Rivera-Madrid et al (2013) também investigaram a relação entre as concentrações de bixina em folhas de *B. orellana* e o efeito do herbicida norflurazon, similarmente aos nossos resultados, os autores observaram que não houve diferenças significativas na concentração de bixina nos diferentes tratamentos utilizados. Salientamos que ainda não existem estudos que correlacionem os efeitos de poluentes atmosféricos com a síntese desse carotenoide, sendo nossa pesquisa pioneira nesse tipo de análise.

Os fitohormônios são um dos principais meios de comunicação intercelular, pois são mensageiros químicos que carregam a informação entre células e, assim, coordenam o crescimento e desenvolvimento vegetal. Além destas funções, os fitohormônios também atuam

na resistência da planta a climas adversos e patógenos (Pulga, 2016; Shigena & Argueso, 2016; Gomez et al., 2020). Em nossa pesquisa, as plantas com e sem a aplicação do F apresentaram concentrações semelhantes de Ácido Abscísico (ABA), ou seja, o estresse ao qual as plantas foram expostas não alterou a síntese desse hormônio. O Ácido Salicílico (SA) e Ácido Aminociclopropano Carboxílico (ACC) foram diagnosticados como os fitohormônios mais responsivos ao estresse causado pelo F em nosso monitoramento.

O SA desempenha papel importante no desenvolvimento das plantas e media as respostas destes vegetais aos estresses biótico e abiótico (Klessig & Malamy, 1994; Clarke et al., 2004; Vlot et al., 2009; Miura & Tada, 2014; Zhao et al., 2019b, 2020). Em *B. orellana*, o SA foi detectado somente em plantas submetidas ao F, indicando seu papel na resposta a este poluente. Igualmente ao observado em nosso estudo, a concentração de SA também aumentou em *Cucumis sativus* em situação de estresse, quando inoculado com o vírus da necrose do tabaco (Rasmussen et al., 1991). Além disso, quando o SA foi aplicado em plantas de *Oryza sativa* e *Cucumis sativus*, este hormônio conferiu tolerância ao estresse causado pelo cádmio (Cd) e agrotóxicos, respectivamente (Wang et al., 2021; Liu et al., 2021).

O ACC é um aminoácido não proteico que atua como o precursor direto do etileno, um hormônio vegetal que age diretamente no desenvolvimento das plantas, e tem papel preponderante na resposta a diferentes estresses. Em condições normais, a produção de etileno nos tecidos vegetais é geralmente baixa, mas seu acúmulo é estimulado durante estágios de estresse ambiental (Yang & Hoffman, 1984; Zhang et al., 2011; Groen et al., 2014; Dubois et al., 2018; Husain et al., 2020). Em nosso monitoramento, foi observado em *B. orellana* submetida a 40 mg de F, que o conteúdo de ACC foi 360% maior que no tratamento controle. Consistente com nossos resultados, foi observado que a superprodução de ACC aumenta a tolerância a diversos fatores estressantes como, estresse salino, alta radiação solar, e déficit hídrico (Munné-Bosch et al., 2002; Yang et al., 2013; Freitas et al., 2018). Além de apresentarem aumento na concentração de ACC, as plantas expostas a 40 mg de F também apresentaram redução na condutância estomática em relação ao tratamento controle, o que pode indicar que a alta concentração de ACC está induzindo o fechamento estomático. Pesquisas anteriores relataram que este fitohormônio também reduziu a abertura dos estômatos em *Arabidopsis* (Desikan et al., 2006) e *Lycopersicon esculentum* (Borbély et al., 2019).

O papel do SA e ACC nas respostas das plantas a patógenos, metais, estresse salino e hídrico é bem documentado. No entanto, seus efeitos diretos e indiretos nas respostas aos poluentes atmosféricos são raramente investigados e, portanto, são pouco compreendidos.

Em todas as concentrações de F utilizadas neste estudo foram observados danos a estrutura foliar de *B. orellana*, esse mesmo padrão de danos anatômicos, foi verificado em plantas expostas ao F em biomonitoramento ativo e passivo, e também em ambiente controlado (Silva et al., 2000; Louback et al., 2016; Anjos et al., 2018; Sant'Anna-Santos et al. 2021; Gomes et al., 2021).

O F causa danos à planta interagindo com os componentes das membranas celulares, afetando a matriz lipídica e consequentemente, sua permeabilidade, prejudicando assim, sua função metabólica e seletiva, causando a morte da célula (Fornasiero, 2001; Kamaluddin & Zwiazek, 2003; Weinstein & Davison, 2003), conforme verificado no presente estudo, através da microscopia de luz e teste com azul de evans. Em alguns casos, esses danos celulares levam à formação de necrose generalizada e plasmólise (Louback et al. 2016; Anjos et al. 2018; Rodrigues et al. 2018a; Sant'Anna-Santos et al. 2019; Rodrigues et al. 2020a, 2020b). De acordo com Sant'Anna-Santos et al. (2012), em algumas espécies, as alterações anatômicas precedem o aparecimento de sintomas visuais, indicando assim, o valor prognóstico das análises microscópicas, e a importância dessas análises anatômicas nas pesquisas, por serem capazes de detectar a poluição de determinado ambiente, mesmo quando a exposição da planta ainda é insuficiente para provocar danos visuais a mesma.

O F se move pela corrente transpiratória, e é acumulado principalmente nas regiões marginais e apicais da folha causando danos nesses locais (Rhimi et al., 2016; Mondal, 2017). Sendo assim, após 24 horas da última chuva simulada com F, nós analisamos amostras da região marginal de folhas sem sintoma visual, e diagnosticamos grupos celulares corados de azul, verificado através do teste com o reagente azul de Evans. Neste teste, o reagente infiltra apenas em células com a permeabilidade de membrana alterada, um sintoma típico de células mortas, corando-as de azul (Gaff & Okong'o-ogola, 1971). No estudo de Gomes et al., (2021) as plantas nativas monitoradas em uma área de preservação ambiental sob influência de poluentes atmosféricos não apresentaram sintomas visuais. No entanto, a partir do teste com o azul de Evans foi verificado que havia regiões que já apresentavam grupo de células mortas. Assim, ressaltamos que este é um importante teste prognóstico para detecção de morte celular, mesmo quando as lesões morfológicas ainda não são visualizadas (Faoro e Iriti 2005; Louback et al. 2016; Anjos et al., 2018; Gomes et al., 2021).

As alterações micromorfológicas encontradas nas folhas observadas ao microscópio eletrônico de varredura como rompimento da cera epicuticular, colapso de células epidérmicas formando depressões ou rompimento das células, flacidez dos tricomas glandulares e ruptura

de cristas estomáticas foram danos similares aos relatados por Gomes et al. (2021), também analisando espécies nativas do Brasil expostas ao F.

A proliferação de hifas fúngicas torna-se algo esperado em estruturas foliares que tiveram a cera epicuticular erodida, como verificado neste estudo e em outras pesquisas com F (Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007; Louback et al., 2016; Anjos et al., 2018; Gomes et al., 2021). A descamação da cera epicuticular facilita o desenvolvimento de fungos e outros patógenos, além de também favorecer a entrada de F nas células epidérmicas (Pascholati & Leite, 1995).

5. CONCLUSÃO

O flúor promoveu alterações na anatomia e nos parâmetros fisiológicos avaliados em *B. orellana*, com alterações mais pronunciadas no tratamento com 40 mg de F. Os danos à estrutura foliar das plantas monitoradas foram diretamente relacionados com o aumento dos níveis de F nestas folhas. Em adição, demostramos que os fitohormônios são responsivos à aplicação de F e sua avaliação deve ser encorajada em estudos futuros, suprimindo a carência de evidências mais concretas, capazes de comprovar a atuação destas substâncias, direta ou indiretamente na defesa da planta. Nossos resultados indicam que *B. orellana* é uma espécie sensível ao F devido às alterações nos parâmetros metabólicos e morfoanatômicos, mesmo quando submetida a baixa concentração de F, sendo assim, uma espécie nativa promissora para uso em programas de biomonitoramento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles, F. B. M., Morgan, P. W., Saltveit, M. E. 1992. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York
- Agra, M. F., Freitas, P. F., Barbosa-Filho, J. M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 17, 114-140
- Almeida, A. L., Freitas, P. F., Ferreira, C. P., Ventrella, M. C. 2021. Syncytial development of annatto (*Bixa orellana* L.) pigment gland: A curious type of anastomosed articulated laticifer. Flora. 274, 151-727
- Anjos, T. B. O., Louback, E., Azevedo, A. A., Silva, L. C. 2018. Sensibility of *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) exposed to fluoride-simulated fog. Ecological Indicators. 90, 154-163
- Arndt, U., Flores, F., Weinstein, L. H. 1995. Fluoride effects on plants, diagnose of injury in the vegetation of Brazil. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS
- Asthir, B., Tak, Y. 2017. Fluoride-induced changes in carbon and nitrogen metabolism in two contrasting cultivars of *Triticum aestivum* L. Fluoride. 50, 334–342
- Banerjee, A., Roychoudhury, A. 2019. Differential regulation of defence pathways in aromatic and non-aromatic indica rice cultivars towards fluoride toxicity. Plant Cell Rep. 38, 1217–1233
- Baunthiyal, M., Ranghar, S. 2014. Physiological and biochemical responses of plants under fluoride stress: an overview. Fluoride. 47, 287–293
- Beauchamp, C., Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry. 44, 276-287
- Bhargava, D., Bhardwaj, N. 2010. Effect of sodium fluoride on seed germination and seedling growth of *Triticum aestivum* var Raj 4083. J Phytol. 2, 41–43
- Bharti, V. K., Giri, A., Kumar, K. 2017. Fluoride sources, toxicity and its amelioration: A review. Annals of Environmental Science and Toxicology. 2, 21–32
- Borbély, P., Bajkán, S., Poór, P., Tari, I. 2019. Exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid controls photosynthetic activity, accumulation of reactive oxygen or nitrogen species and

macroelement content in tomato in long-term experiments. *J. Plant Growth Regul.* 38, 1110–1126

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–254

Braga, F. G., Bouzada, M. L. M., Fabri, R. L., Matos, M. O., Moreira, F. O., Scio, E., Coimbra, E. S. 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology.* 111, 396–402

Brito, F. A. L., Pimenta, T. M., Henschel, J. M., Martins, S. C. V., Zsogon, A., Ribeiro, D. M. 2020. Elevated CO₂ improves assimilation rate and growth of tomato plants under progressively higher soil salinity by decreasing abscisic acid and ethylene levels. *Environ Exp Bot.* 176, 104–050

Cai, H. M., Dong, Y. Y., Li, Y. Y., Li, D. X., Peng, C. Y., Zhang, Z. Z. 2016. Physiological and cellular responses to fluoride stress in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Acta Physiol Plant.* 38, 144–155

Chakrabarti, S., Patra, P. K. 2013. Effect of fluoride on superoxide dismutase activities in four common crop plants. *Fluoride.* 46, 59–62

Chance, B., Maehley, A. C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology.* 2, 764–775

Clarke, S. M., Mur, L. A. J., Wood, J. E., Scott, I. M. 2004. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38, 32–47

Coronado-Cáceres, L. J., Lugo-Cervantes, E., Puebla-Pérez, A. M., Aguilar- Espinosa, M., Alcaraz-López, O. A., Mateos-Díaz, J. C., et al. 2014. Actividad antitumoral y antioxidante de las proteínas de reserva de *Bixa orellana* L in Proceedings of the Memorias em Extenso del 4º Congreso Internacional del Biología, Química y Agronomía: Innovación Para el Desarrollo Sustentable, Rome

Das, K., Roychoudhury, A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and the response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci.* 2, 1–13

- Davison, A. W., Weinstein, L. H. 2006. Some problems relating to fluorides in the environment: effects on plants and animals. In: Tressaud, A. (Ed.), Fluorine and the Environment. Atmospheric Chemistry, Emissions & Lithosphere. pp. 251–298
- Dequigiovanni, G., Ramos, S. L. F., Alves, P. A., Fabri, E. G., Picanco-Rodrigues, D., Clement, C. R., Gepts, P., Veasey, E. A. 2018. Highly structured genetic diversity of *Bixa orellana* var. urucurana, the wild ancestor of annatto, in Brazilian Amazonia. PLoS ONE 13:e0198593
- Desikan, R., Last, K., Harrett-Williams, R., Tagliavia, C., Harter, K., Hooley, R., Hancock, J.T., Neill, S.J. 2006. Ethylene-induced stomatal closure in Arabidopsis occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. Plant J. 47, 907–916
- Divan Junior, A. M., Oliva, M. A., Martinez, C. A., Cambraia, J. 2007. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colônia. Ecotoxicol Environ Saf. 67, 247–253
- Dolotseva, I. M. 2013. Effects of environmental fluoride on plants, animals and humans. Інтернет-конференції ХНУМГ ім.ОМ Бекетова. 1, 48-54
- Domingos, M., Klumpp, A., Rinaldi, M.C.S., Modesto, I.F., Klumpp, G., Delitti, W. B. C. 2003. Combined effects of air and soil pollution by fluoride emissions on *Tibouchina pulchra* Cogn., at Cubatao, SE Brazil, and their relations with aluminium. Plant Soil. 249, 297-308
- Dubois, M., Van den Broeck, L., Inze, D. 2018. The pivotal role of ethylene in plant growth. Trends Plant Sci. 23, 311-323
- Faoro, F., Iriti, M. 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. Biol Plant. 49, 585–592
- Fialho, R. C. 1997. Acumulação foliar de fluoretos e seu significado ecológico em espécies arbóreas da Mata Atlântica, Cubatão, SP. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Fleischer, T. C., Ameade, E. P. K., Mensah, M. L. K., Sawyer, I. K. 2003. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. Fitoterapia. 74, 136-138
- Fornasiero, R. B. 2003. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: First field observations. Plant Sci. 165, 507–513
- Fornasiero, R.B. 2001. Phytotoxic effects of fluorides. Plant Sci. 161, 979–985

- Freitas, V. S., de Souza Miranda, R., Costa, J. H., de Oliveira, D. F., de Oliveira Paula, S., de Castro Miguel, E., Freire, R. S., Prisco, J. T., Gomes-Filho, E. 2018. Ethylene triggers salinity tolerance in maize genotypes by modulating polyamine catabolism enzymes associated with H₂O₂ production. *Environ Exp Bot.* 145, 75–86
- Gadi, B. R., Kumar, R., Goswami, B., Rankawat, R., Rao, S. R. 2020. Recent developments in understanding fluoride accumulation, toxicity, and tolerance mechanisms in plants: an overview. *Soil Sci Plant Nutr.* 21, 209-228
- Gaff, D. F., Okong'o-ogola, O. 1971. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *J Exp Bot.* 22, 756–758
- García, M. G., Borghino, L. 2015. Fluoride in the context of the environment. In: Preedy WR (ed) *Fluorine: chemistry, analysis, function and effects*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 3–21
- García-Caparrós, P., De-Filippis, L., Gul, A., Hasanuzzaman, M., Ozturk, M., Altay, V., Lao, M. T. 2020. Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review.* 87, 421-466
- Gerrits, P. O. 1964. The application of glycol methacrylate histotechnology: some ground principles. Leica GmbH, Germany
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology.* 59, 09-14
- Gomes, T. F., Lima, A. M., Marques, A. P. P. Silva, L. C. 2021. Effects of fluoride emission on the morphoanatomy of three plant species endemics to Brazil using passive biomonitoring. *Environ Sci Pollut Res.* 28, 33083–33095
- Gomez, J. D., Pinheiro, V. J. M., Silva, J. C., Romero, J. V., Merino-Cabrera, Y., Coutinho, F. S., Lourenção, A. L., Serrão, J. E., Vital, C. E., Fontes, E. P. B., Oliveira, M. G. A., Ramos, H. J. O. 2020. Leaf metabolic profiles of two soybean genotypes differentially affect the survival and the digestibility of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Plant Physiol Biochem.* 155, 196–212
- Groen, S. C, Whiteman, N. K. 2014. The evolution of ethylene signaling in plant chemical ecology. *J Chem Ecol.* 40, 700–716

- Gupta, S., Banerjee, S., Mondal, S. 2009. Phytotoxicity of fluoride in the germination of paddy (*Oryza sativa*) and its effect on the physiology and biochemistry of germinated seedlings. *Fluoride*. 42, 142–146
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. Á., Fujita, M., Fotopoulos, V. 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*. 9, 681
- Havir, E. A., McHale, N. A. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*. 84, 450-455
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station: Berkeley, pp 347
- Hong, X., Liang, H., Chen, Y., Liu, Y., Shi, Y. 2018. Distribution of fluorine in the surface dust of Wuda coal base, Inner Mongolia of Northern China. *J Geochem Explor*. 188, 390-397
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., Tran, L. S. P. 2015. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. *Front Plant Sci*. 6, 1-19
- Howe, G.A, Jander, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*. 59, 41-66
- Husain,T., Fatima, Abreeq., Suhel, Mohammad., Singh, Samiksha., Sharma, Anket., Prasad, S. M., Singh, V. P. 2020. A brief appraisal of ethylene signaling under abiotic stress in plants, *Plant Signaling & Behavior*. 15, 782-051
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tabela 1613 - Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br>. Rio de Janeiro, RJ. Acessado em 16/01/2022
- Kamaluddin, M., Zwiazek, J. J. 2003. Fluoride inhibits root water transport and affects leaf expansion and gas exchange in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. *Physiologia Plantarum*. 117, 368–375

- Kar, M., Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*. 57, 315-319
- Karmakar, S., Mukherjee, J., Mukherjee, S. 2016. Removal of fluoride contamination in water by three aquatic plants. *Int J Phytoremediat*. 18, 222-227
- Kato, T., Sato, N., Hayama, S., Yamabuki, T., Ito, T., Miyamoto, M., Kondo, S., Nakamura, Y., Daigo, Y. 2007. Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. *Cancer Res*. 67, 8544-8553
- Klessig, D. F., Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol*. 26, 39-58
- Kumar, T., Dhakaand, K. T., Singharya, S. P. 2013. Effect of fluoride toxicity on biochemical parameters (chlorophyll, nitrogen, protein and phosphorus) of wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Forestry and Crop Improvement*. 4, 80-83
- Liu, T., Li, T., Zhang, L., Li, H., Zou, N.J.E., Safety, E. 2021. Exogenous salicylic acid alleviates the accumulation of pesticides and mitigates pesticide-induced oxidative stress in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). *Ecotoxicol Environ Saf*. 208, 111-654
- Lorenzi, H. 2002. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 368p
- Lorenzi, H., Matos, F. J. A. 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 544p
- Louback, E., Pereira, T. A. R., de Souza, S. R., de Oliveira, J. A., Da Silva, L. C. 2016. Vegetation damage in the vicinity of an aluminum smelter in Brazil. *Ecol Indic*. 67, 193–203
- Marcolino, V. A., Zanin, G. M., Durrant, L. R., Benassi, M. T., Matioli, G. 2011. Interaction of curcumin and bixin with β -cyclodextrin: complexation methods, stability, and applications in food, *J. Agric. Food Chem*. 59, 3348-3357
- Ming, H., CAO, Y., Hu, C. S., Hang, Y. M., Cheng, Y. S. 2008. Effect of Lead Stress on the Photosynthetic Characteristics and Yield of Maize. *Journal of Maize Sciences*. 16, 74-78
- Miura, K., Tada, Y. 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*. 5, p12
- Mondal, N. K. 2017. Effect of fluoride on photosynthesis, growth and accumulation of four widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in India. *Ecotox Environ Safety*. 144, 36-44

- Moreira, P.A., Lins, J., Dequigiovanni, G. Veasey, E.A., Clement, C.R. 2015. The domestication of annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia, Econ. Bot. 69, 127-135
- Mukherjee, I., Singh, U. K. 2020. Fluoride abundance and their release mechanisms in groundwater along with associated human health risks in a geologically heterogeneous semi-arid region of east India. Microchem J. 152, 104-304
- Müller, M., Munné-Bosch, S. 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Plant Methods. 7, 37
- Munné-Bosch, S., López-Carbonell, M., Alegre, L., Van Onckelen, H. A. 2002. Effect of drought and high solar radiation on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid concentrations in *Rosmarinus officinalis* plants. Physiol. Plant. 114, 380-386
- Mustafa, G., Ullah, I., Khanc, I. 2018. Fluoride toxicity and its effects on two varieties of *Solanum lycopersicum*. Fluoride. 51, 267-277
- Na, L. Z, Xu, X. F, Tang, H. G, Zhang, M. X, Hou, Z. D, Liu, Y. H, Zhao, Z. G, Feng, H. Y, Xu, S. J, Wang, X. L. 2006. Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase gene expression in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves under enhanced UV-B radiation. J Integr Plant Biol. 48, 1190-1196
- Nawaz, M., Dawood, M., Javaid, K., Imran, M., Zhao, F., Saima, S., Shah, S. T. H. 2021. Evaluating the environmental impacts of fluoride on the growth and physiology of cotton (*Gossypium hirsutum*). Pakistan Journal of Agricultural Research. 34, 425
- O'Brien, T. P., McCully, M. E. 1981. The study of plants structure principles and select methods. Termarcarphi Pty. Ltda, Melbourne, p 45
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Osorio, R. G., Saldarriaga, M., Díaz, S. L. 2000. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colômbia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. Journal of Ethnopharmacology. 73, 233-241
- Pascholati, S. F., Leite, B. 1995. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorin L (eds) Manual de Fitopatologia – princípios e conceitos. Ceres, São Paulo, pp 417–453

- Paula, M. T., Filho, B. G., Santos, D. S. B., Vieira, I. M. S., Conceição, H. E. O. 2005. Fluorine effect on chemical and biochemical parameters in leaves of murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich). *Revista de Ciências Agrárias* (Brazil). 43, 137-148
- Peixoto, P. H. P., Pimenta, D. S., Antunes, F. 2005. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. 40, 727-734
- Pita-Barbosa, A., Sant'Anna-santos, B. F., Silva, K. L. F., Azevedo, A. A., Rocha, D. I. 2009. Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). *Acta Bot Bras.* 23, 1027-1033
- Preston, H. D. E., Rickard, M. D. 1980. Extraction and chemistry of annatto, *Food Chem.* 5, 47-56
- Pulga, P.S. 2016. Ácido Salicílico como indutor de resistência ao *Tetranychus urticae* (Kock) e Tuta absoluta (Meyrick) em genótipos de tomateiro. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Produção Vegetal) – UNICENTRO
- R CORE TEAM. 2014. R: A language and environment for statistical computing Vienna: R Foundation 5 for Statistical Computing
- Rasmussen, J. B., Hammerschmidt, R., Zook, M. N. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* 97, 42-47
- Rhimi, N., Mezghani, I., Elloumi, N., Nasri, M., Ben, Abdallaha, F. 2016. Morphological and anatomical responses of pear and almond trees to fluoride air pollution. *Fluoride.* 49, 5-8
- Rivera-Madrid, R. J., Burnell, M., Aguilar-Espinosa, N. L., Rodriguez-Avila, E., Lugo-Cervantes, L. A., Saenz-Carbonell. 2013. Control of carotenoid gene expression in *Bixa Orellana* L. leaves treated with norflurazon, *Plant Mol Biol Rep.* 31, 1422-1432
- Rodrigues, A. A., Vasconcelos-Filho, S. C., Mendes, G. C., Rehn, L. S., Rodrigues, D. A., Rodrigues, C. L., Müller, C. 2017. Fluoride in simulated rain affects the morphoanatomy and physiology of *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC. *Ecol Indic.* 82, 189-195
- Rodrigues, A. A., Vasconcelos-Filho, S. C., Müller, C., Rodrigues, D. A., Mendes, G. C., Rehn, L. S., Costa, A. C., Vital, R. G., Sales, J. F. 2018a. *Sapindus saponaria* bioindicator potential

concerning potassium fluoride exposure by simulated rainfall: anatomical and physiological traits. *Ecol Indic.* 89, 552-558

Rodrigues, D. A., de Fátima, S. J., Vasconcelos-Filho, S. C., Rodrigues, A. A., Teles, E. M. G., Costa, A. C., Reis, E. L., de Carvalho, S. T. A, Müller, C. 2020b. Bioindicator potential of *Ricinus communis* to simulated rainfall containing potassium fluoride. *PeerJ.* 8, 94-45

Rodrigues, D. A., Vasconcelos-Filho, S. C, Rodrigues, A. A, Müller, C., Farnese, F. S., Costa, A. C., Teles, E. M. G., Rodrigues, C. L. 2018b. *Byrsonima basiloba* as a bioindicator of simulated air pollutants: morphoanatomical and physiological changes in response to potassium fluoride. *Ecol Indic.* 89, 301-308

Rodrigues, D.A., de Fátima, S. J., Vasconcelos-Filho, S. C., Rodrigues, A.A., Costa, A. C., Rodrigues, C. L., Lima, F. H., Müller, C. S. 2020a. *Spondias mombin*, a potential bioindicator of potassium fluoride pollution. *Ecol Indic.* 114, 106-314

Rodriguez-Avila, N. L., Narvaez-Zapata, J. A., Ramirez-Benitez, J. E., Aguilar-Espinosa, M.L., Rivera-Madrid, R. 2011. Identification and expression pattern of a new carotenoid cleavage dioxygenase gene member from *Bixa orellana*. *J Exp Bot.* 62, 5385-5395

Rossoni-Júnior, J. V., Araújo, G. R., Da Cruz Pádua, B., Chaves, M. M., Pedrosa, M. L., Silva, M.E., et al. 2012. Annatto extract and b-carotene modulate the production of reactive oxygen species/nitric oxide in neutrophils from diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr.* 50, 177–183

Saleh, A. A. H., Abdel-Kader, D. Z. 2003. Metabolic responses of two *Helianthus annuus* cultivars to different concentrations during germination and seedling growth stages. *Egypt J Biol.* 5, 43–54

Sant’Anna-Santos, B. F. S., Azevedo, A. A. 2010. Toxicidade e acúmulo de flúor em hortaliças nas adjacências de uma fábrica de alumínio. *Acta Bot Brasilica.* 24, 952–963

Sant’Anna-Santos, B. F., Azevedo, A. A., Alves, T. G., Campos, N.V., Oliva, M. A., Valente, V. M. M. 2014. Effects of emissions from an aluminium smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. *Water Air Soil Pollut.* 225, 17-18

Sant’Anna-Santos, B. F., Azevedo, A. A., Silva, L. C., Oliva, M. A. 2012. Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Anais da Acad Brasil de Ciências.* 84, 689–702

- Sant'Anna-Santos, B. F., de Freitas-Silva, L., Azevedo, A. A., Gomes, M. P. 2021. Could the fluoride-tolerant species *Panicum maximum* replace sensitive plants in fluoride biomonitoring? *Ecological Indicators*. 122, 107-308
- Shahid-ul-Islam, L.J., Mohammad, F. 2016. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications—a review. *J Adv Res*. 7, 499
- Shigenaga, A. M., Argueso, C.T. 2016. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 56, 174-186
- Silva, L. C, Azevedo, A. A, Silva, E. A. M, Oliva, M. A. 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Rev Bras Bot*. 23, 385–393
- Silva, P. I., Nachtigall, A. M., Stringheta, P. C. 2009. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (*Bixa orellana* L.). *Ciência e Agrotecnologia*. 33, 1892-1897
- Stepec, D., Tavcar, G., Ponikvar-Svet, M. 2019. Fluorine in vegetation due to an uncontrolled release of gaseous fluorides from a glassworks: a case study of measurement uncertainty, dispersion pattern and compliance with regulation. *Environ Pollut*. 248, 958–964
- Stringheta, P. C., Silva, P. I., Costa, M. G. C., Soares, V. L. F., Gesteira, A.G., Cruz, A. C. F., Otoni, W. C. 2008. Pigmentos do urucum – estrutura, química, biossíntese e degradação. p. 24-26. In: Stringheta, P. C., Silva, P. I. (Org.). *Pigmentos do urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações*. 1. ed. Viçosa-MG: Gráfica e Editora Suprema, 166p
- Sun, C., Zhao, T., Wang, X., Han, K., Xie, H. 2021. Fluorine Accumulation in Sunflower and Its Photosynthetic Response. *Applied Ecology and Environmental Sciences*. 9, 795-799
- Thakur, M., Sohal, B.S. 2013. Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review, *ISRN Biochem*. 1–10
- Tibodeau, J., Isham, C. B. K. 2010. Annatto constituent cis-bixin has selective anticancer effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Food Res Int*. 38, 911–917

- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., Klessig, D.F. 2009. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. In. Annual Review of Phytopathology. 47, 177-206
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis., Mol Plant. 3, 2–20
- Weinstein, L. H., Davison, A. 2004. Fluorides in the environment. I p.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J Plant Physiol. 144, 307–313
- World Health Organization. 2019. Preventing disease through healthy environments, inadequate or excess fluoride: a major public health concern. WHO, Geneva
- Xu, D. Q. 1997. Some Problems in Stomatal Limitation Analysis of Photosynthesis. Plant Physiology Communications. 33, 241-244
- Yang, L., Zu, Y. G., Tang, Z. H. 2013. Ethylene improves Arabidopsis salinity tolerance mainly via retaining K^+ in shoots and roots rather than decreasing tissue Na^+ content. Environ Exp Bot. 86, 60–69
- Yang, S. F, Hoffman, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu Rev Plant Physiol. 35, 155–189
- Yepu, L., Shengli, W., Prete, D., Suyin, X., Zhongren, X., Fei, Z., Qian, Z. 2017. Accumulation and interaction of fluoride and cadmium in the soil-wheat plant system from the wastewater irrigated soil of an oasis region in northwest China. Sci Total Environ. 595, 344–351
- Zhang, L., Jia, C., Liu, L., Zhang, Z., Li, C., Wang, Q. 2011. The involvement of jasmonates and ethylene in *Alternaria alternata* f. sp. lycopersici toxin-induced tomato cell death. J Exp Bot. 62, 5405–5418
- Zhao, X.Y., Qi, C. H., Jiang, H., Zhong, M. S., You, C. X., Li, Y.Y., Hao, Y. J. 2020. MdWRKY15 improves resistance of apple to *Botryosphaeria dothidea* via the salicylic acid-mediated pathway by directly binding the MdICS1 promoter. J Integr Plant Biol. 62, 527–543
- Zhao, X.Y., Qi, C.H., Jiang, H., Zhong, M.S., Zhao, Q., You, C.X., Li, Y.Y., Hao, Y.J. 2019b. MdWRKY46-enhanced apple resistance to *Botryosphaeria dothidea* by activating the expression of MdPBS3.1 in the salicylic acid signaling pathway. Mol Plant Microbe Interact. 32, 1391–1401

Zouari, M., Elloumi, N., Bellassoued, K., Ben Ahmed, C., Krayem, M., Delmail, D., Elfeki, A., Ben Rouina, B., Ben Abdallah, F., Labrousse, P. 2017. Enzymatic antioxidant responses and mineral status in roots and leaves of olive plants subjected to fluoride stress. *S Afr J Bot.* 111, 44–49

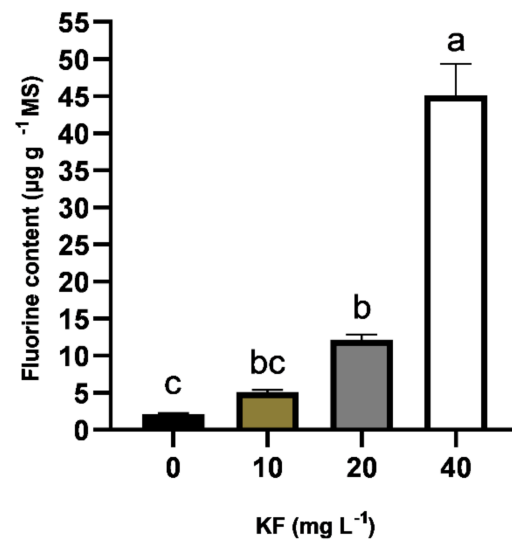


Figura 1. Teor de flúor em folhas de *Bixa orellana* submetida a diferentes concentrações do poluente por 6 dias consecutivos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4).

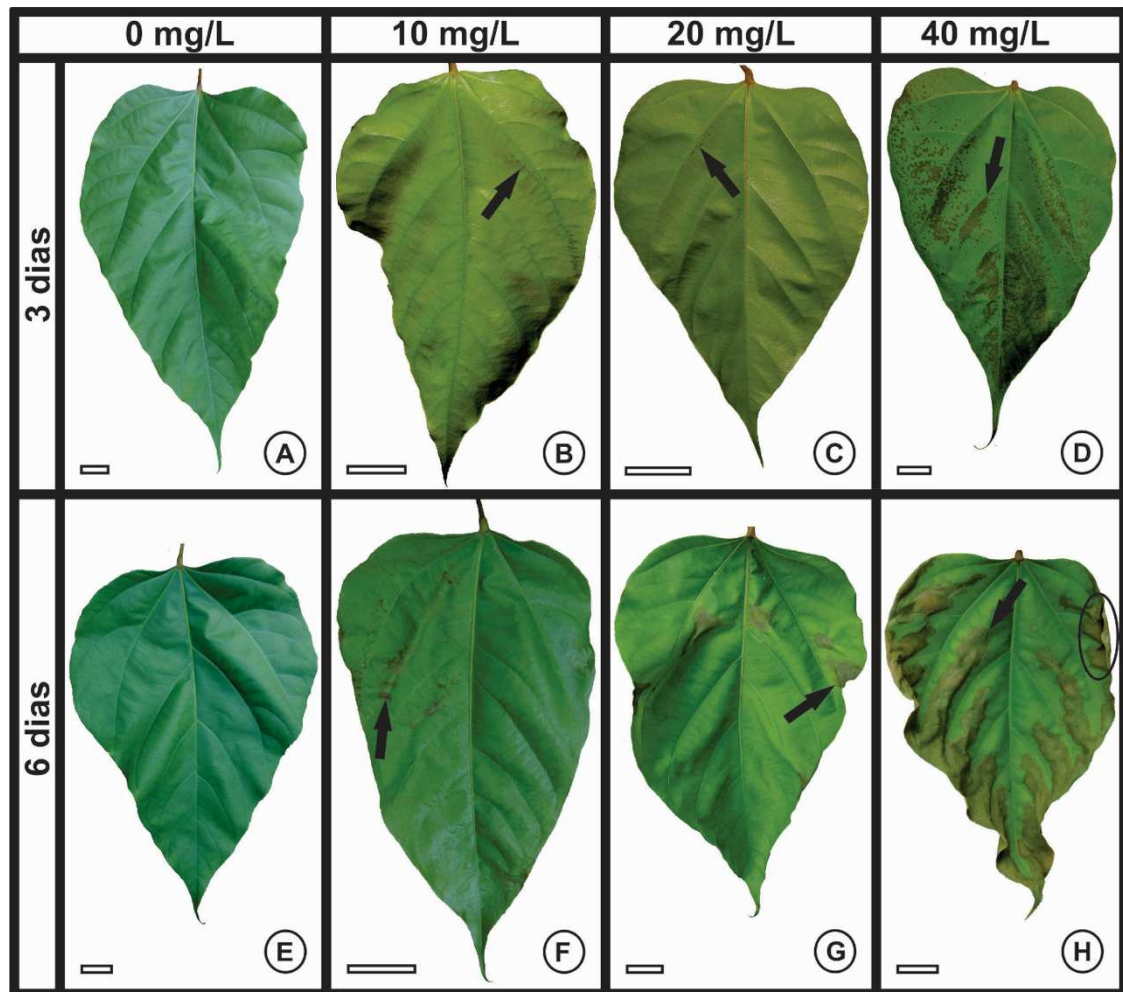


Figura 2. Sintomatologia de *Bixa orellana* exposta ao flúor (0, 10, 20, 40 mg F L⁻¹) durante 6 dias consecutivos. A, E. Tratamento controle. B, C. Manchas cloróticas esparsas intervenais (seta). D. Necroses intervenais e marginais (seta). F, G. Necroses entre as nervuras e na margem foliar (seta). H. Encarquilhamento foliar (elipse) e necroses intervenais e marginais (seta). Escala: 2cm.

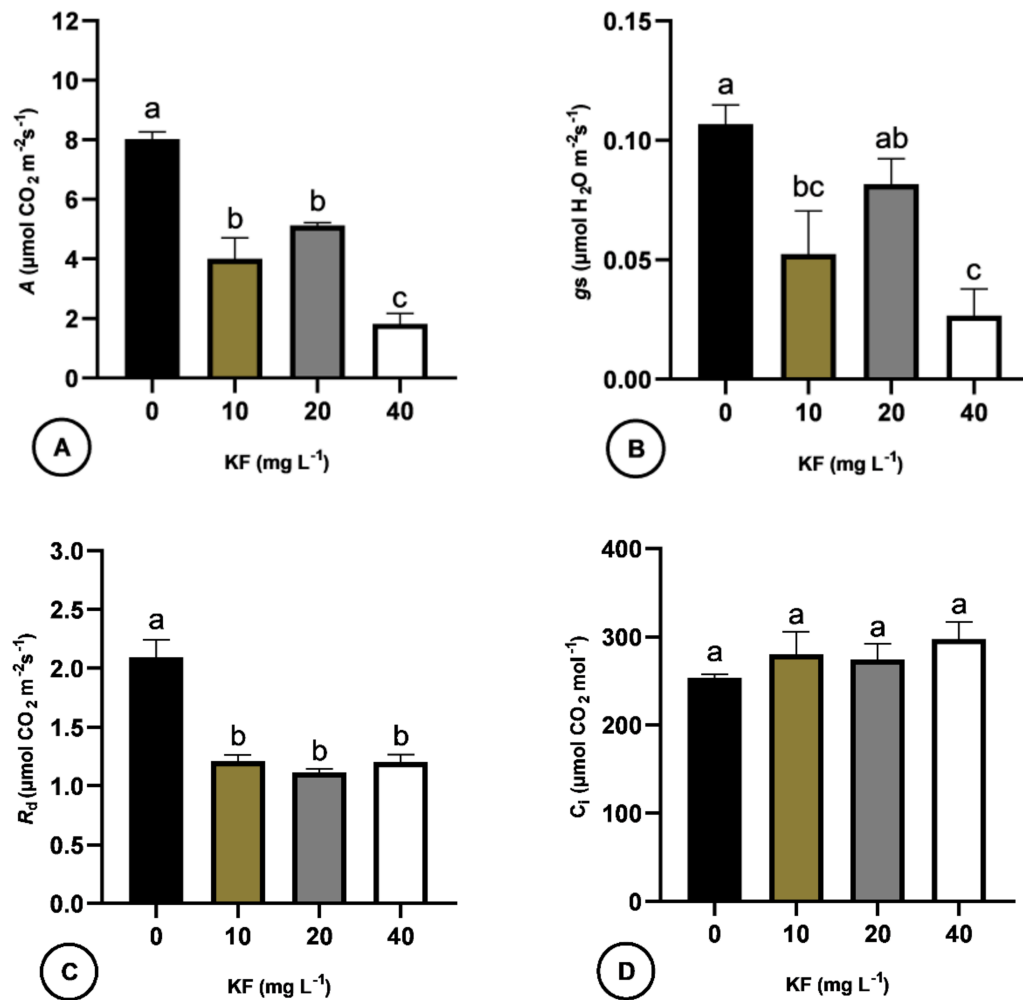


Figura 3. Parâmetros fotossintéticos avaliados em folhas de *Bixa orellana* submetidas a diferentes concentrações de flúor por 6 dias consecutivos. A. Assimilação de CO₂ (A). B. Condutância estomática (g_s). C. Respiração (R_d). D. Concentração interna de CO₂ (C_i). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4).

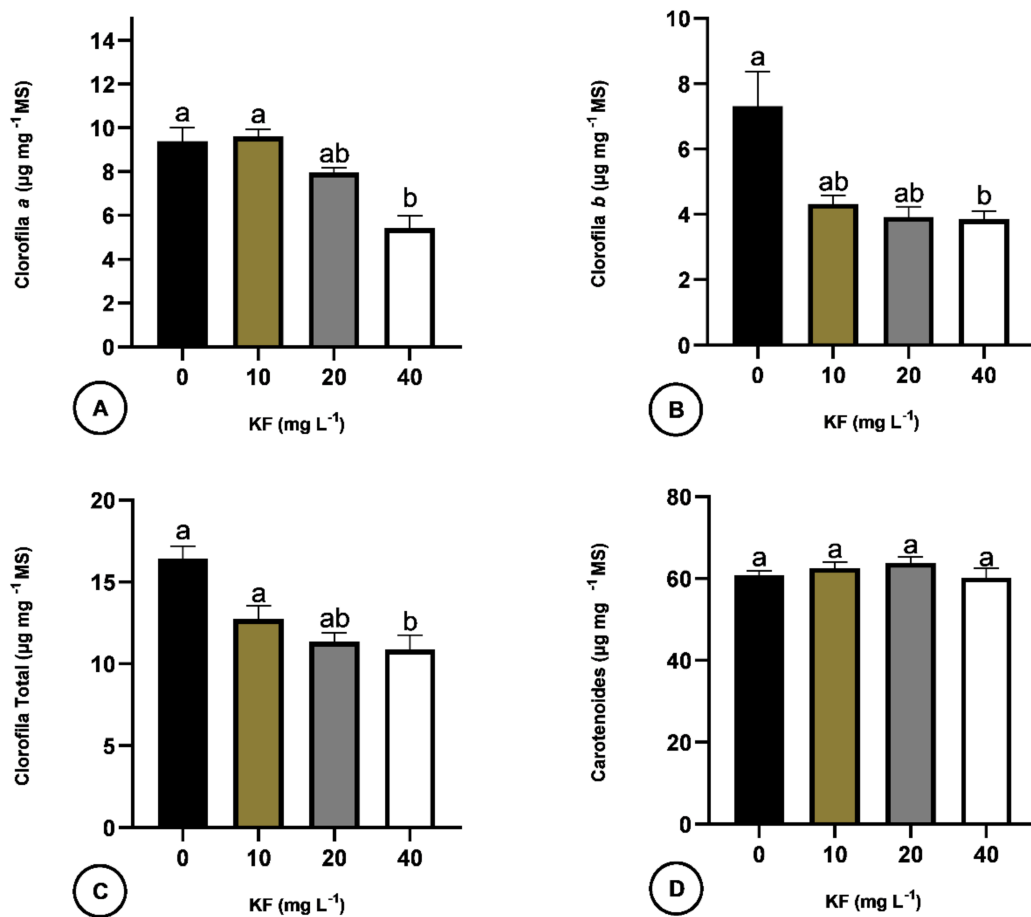


Figura 4. Teor de pigmentos fotossintetizantes nas folhas de *Bixa orellana* submetida a diferentes concentrações de flúor por 6 dias consecutivos. A. Clorofila *a*. B. Clorofila *b*. C. Clorofila total. D. Carotenoides. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o erro padrão ($n=4$).

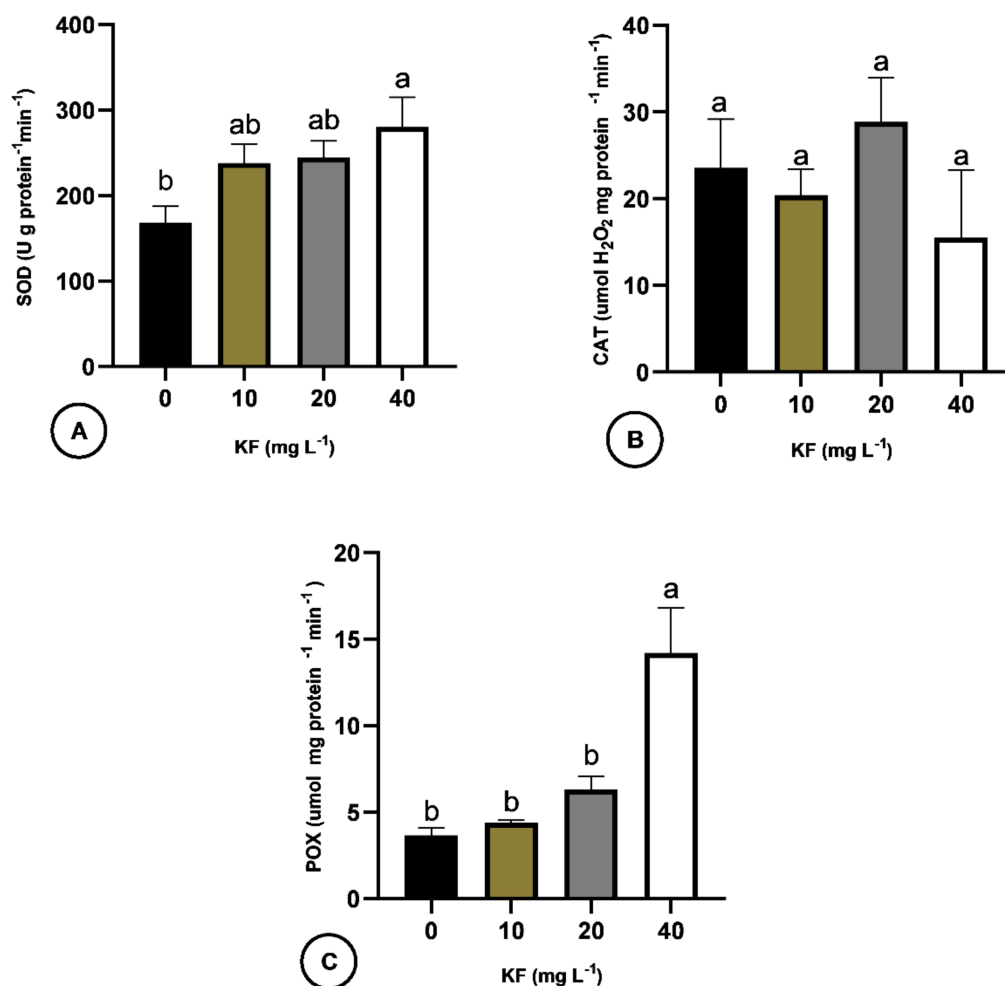


Figura 5. Quantificação da atividade enzimática nas folhas de *Bixa orellana* submetida a diferentes concentrações de flúor por 6 dias consecutivos. A. Superóxido dismutase (SOD). B. Catalase (CAT). C. Peroxidase (POX). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4).

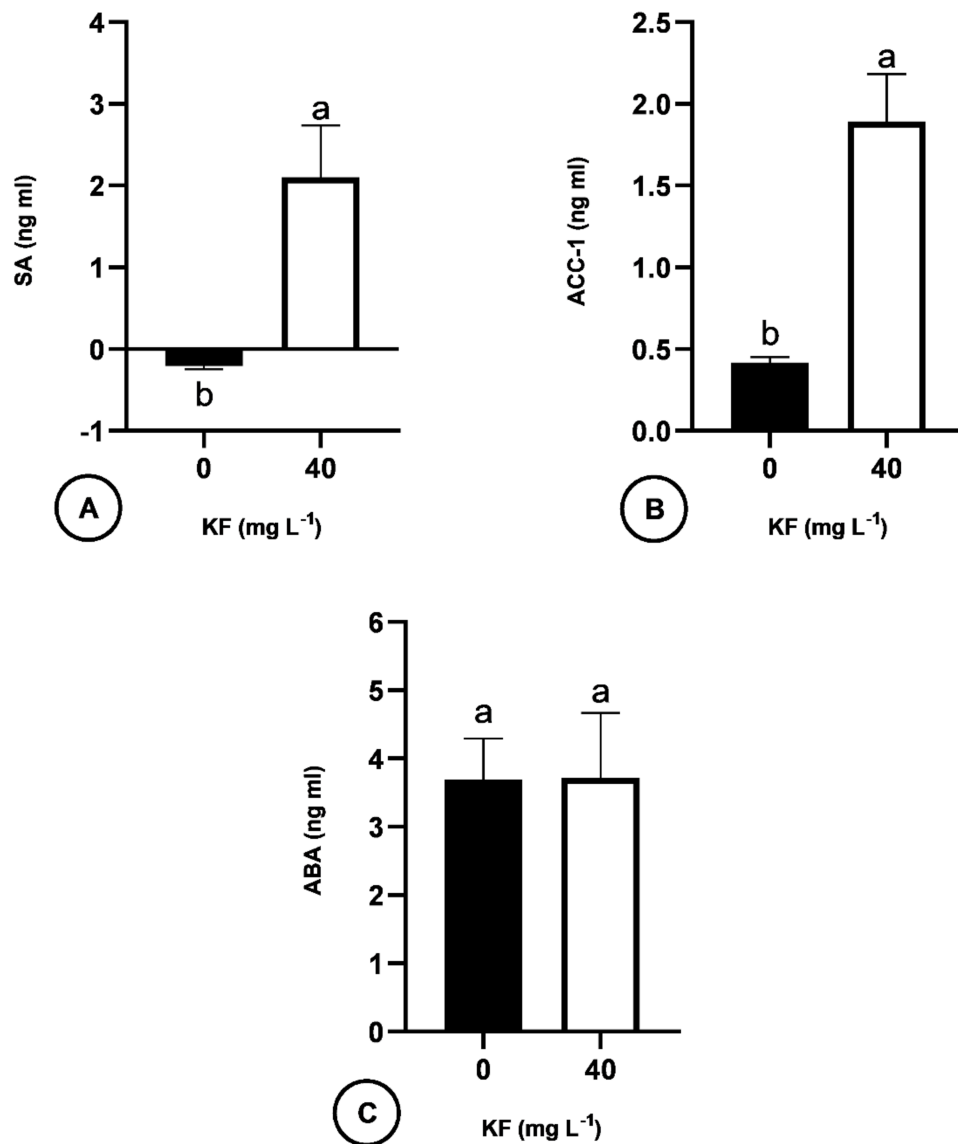


Figura 6. Perfil fitohormonal das folhas de *Bixa orellana* submetidas a 40 mg L⁻¹ de fluoreto de potássio por 6 dias consecutivos. A. Ácido salicílico (SA). B. Ácido aminociclopropano carboxílico (ACC). C. Ácido abscísico (ABA). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o erro padrão (n=5).

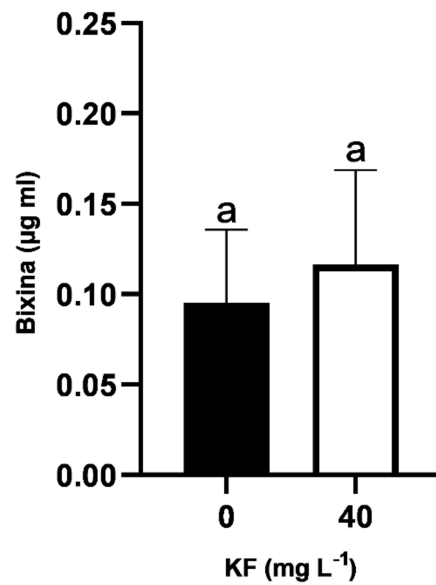


Figura 7. Teor de bixina em folhas de *Bixa orellana* submetidas a 40 mg L⁻¹ de fluoreto de potássio por 6 dias consecutivos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4).

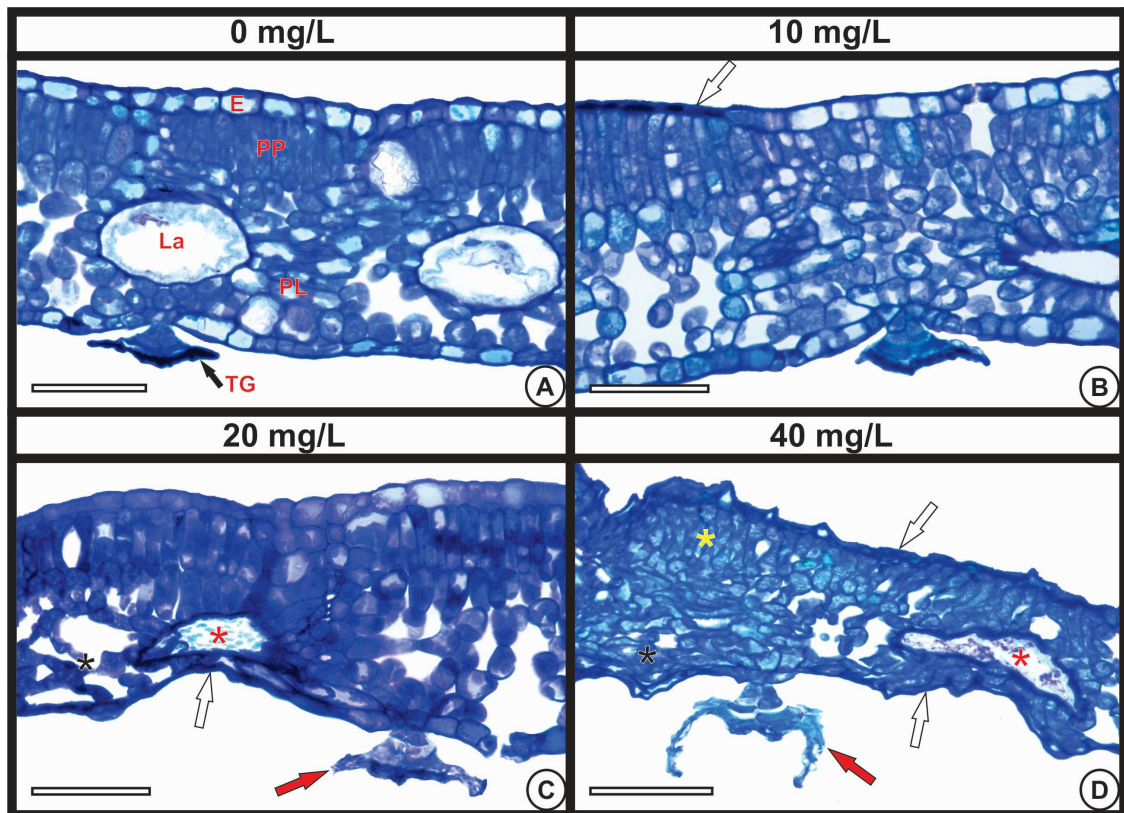


Figura 8. Lâmina foliar de *Bixa orellana* exposta ao flúor (0, 10, 20, 40 mg F L⁻¹) durante 6 dias consecutivos, em microscopia de luz. A. Tratamento controle. B, C, D. Células epidérmicas atrofiadas (seta branca), tricoma glandular flácido (seta vermelha), laticífero plasmolisado, com formato alterado (asterisco vermelho), plasmólise das células do parênquima lacunoso (asterisco preto) e paliçádico (asterisco amarelo). E. Epiderme. PP. Parênquima Paliçádico. PL. Parênquima Lacunoso. La. Laticífero. TG. Tricoma Glandular. Escalas. 100 µm.

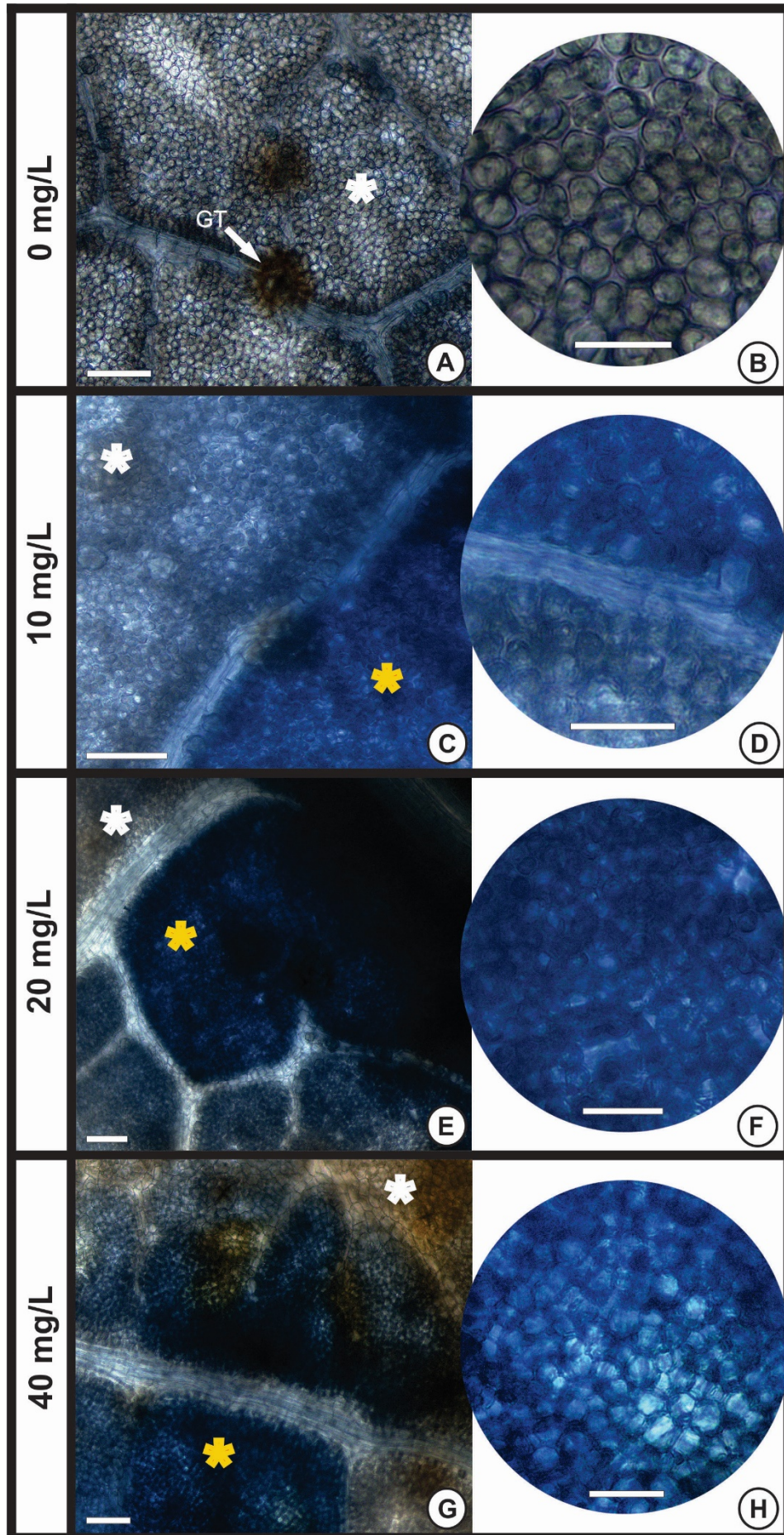


Figura 9. Detecção de morte celular em folhas de *Bixa orellana* exposta ao flúor (0, 10, 20, 40 mg F L⁻¹) durante 6 dias consecutivos. Teste histoquímico com Azul de Evans, em diafanização. A, B. Tratamento controle, note a ausência de coloração azul demonstrando reação negativa ao reagente. C - H. Células do mesofilo fortemente coradas pelo reagente (asterisco amarelo), células saudáveis (asterisco branco). GT. Tricoma Glandular. Escalas. A, C, E, G: 50 µm. B, D, F, H: 20 µm.

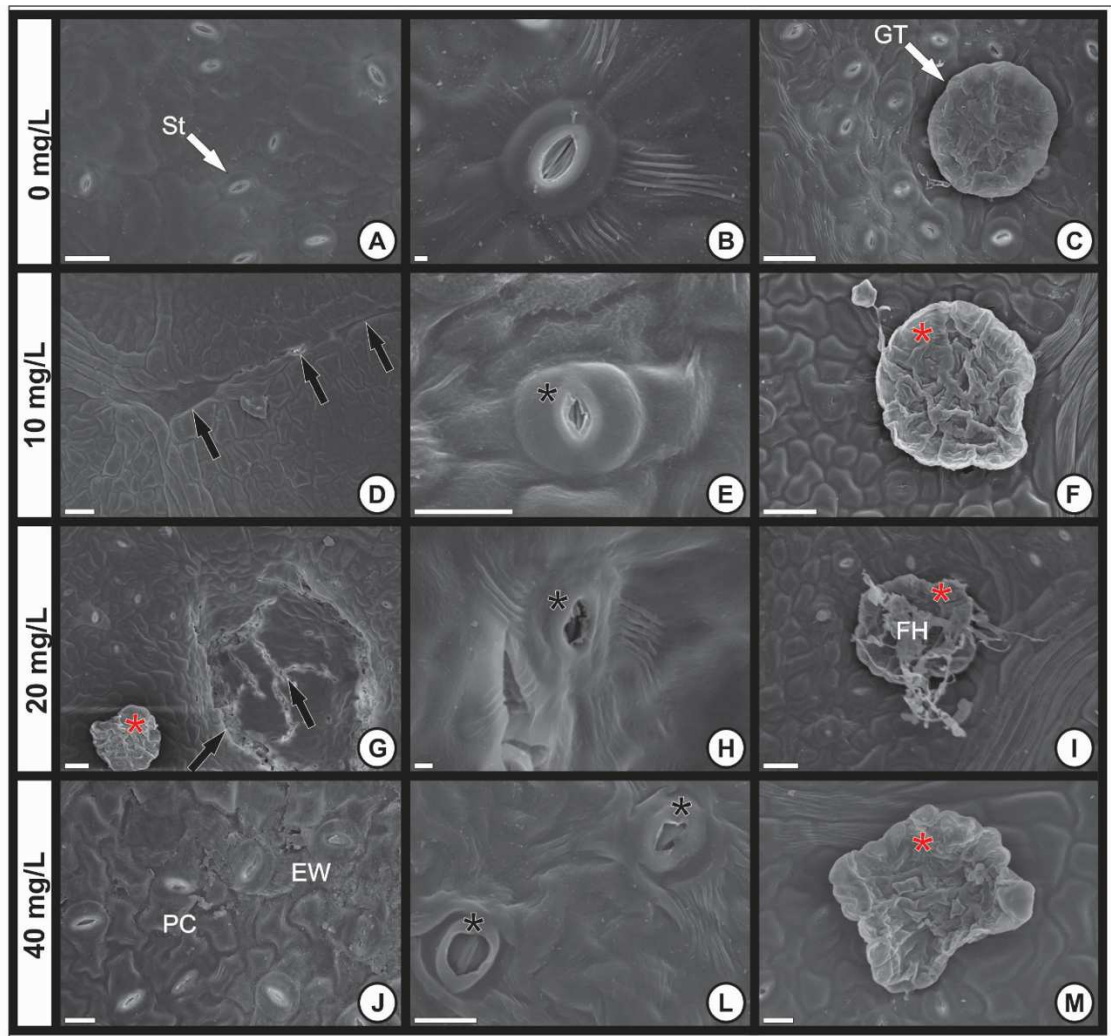


Figura 10. Superfície abaxial foliar de *Bixa orellana* exposta ao flúor (0, 10, 20, 40 mg F L⁻¹) durante 6 dias consecutivos, visualizada em microscopia eletrônica de varredura. A, B, C. Tratamento controle. D – M. Ruptura da epiderme (seta preta), cristas estomáticas rompidas (asterisco preto), tricomas glandulares flácidos (asterisco vermelho). FH. Proliferação de hifas fúngicas. EW: Cera epicuticular erodida. PC: células epidérmicas plasmolisadas. St. Estômato. GT. Tricoma Glandular. Escalas. A, C, D, F, G, I: 20 µm. B, H: 2 µm. E, J, L, M: 10 µm.

CAPÍTULO II

O Urucum (*Bixa orellana* L.) se recupera após exposição ao poluente flúor?

RESUMO

O flúor (F) é um poluente fitotóxico, amplamente difundido, altamente reativo e não biodegradável no meio ambiente. Embora se saiba alguns efeitos do F nas plantas, pouco se sabe sobre o que acontece com as plantas na ausência do poluente em período posterior à exposição. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos provocados pelo F em *Bixa orellana*, 85 dias após a última aplicação do poluente. As plantas foram submetidas à chuva simulada contendo concentrações crescentes de F (0, 20 e 40 mg/L de KF) e após o 6º dia foi interrompida a aplicação, ficando as plantas sob monitoramento. Durante este período, foram realizadas análises visuais e, ao final, foram coletadas amostras foliares para quantificação de F e biomassa, além de análise de trocas gasosas. No 6º dia de aplicação do F, as plantas já apresentavam cloroses, que foram progressivamente aumentando em extensão, e evoluindo para necroses até o 85º dia. Folhas adultas e jovens expostas a maior concentração de F apresentaram alto teor deste poluente em relação ao controle, além de redução nos valores da taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s) e queda na produção de biomassa. A partir das respostas morfológicas e fisiológicas de *B. orellana*, conclui-se que o período de 85 dias sem exposição ao F não foi o suficiente para que a espécie pudesse se recuperar, destacando assim, a longevidade dos danos provocado por este poluente nas plantas.

1. INTRODUÇÃO

Como consequência direta do avanço da industrialização e urbanização, a poluição do ar representa hoje um dos maiores problemas de saúde pública, afetando a saúde de animais e plantas (Davison & Weinstein, 2006; Mondal, 2017, Yepu et al., 2017). Assim, a vegetação próxima às áreas industriais está constantemente exposta à ação de poluentes gasosos fitotóxicos (Fornasiero, 2003; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2010; Sant'Anna-Santos et al., 2014; Louback et al., 2016; Gomes et al., 2021).

Antropogenicamente, o F é lançado para atmosfera como resultado da atividade de indústrias de cerâmica, alumínio, tijolo, vidro, carvão e liberação de resíduos de produtos odontológicos (Weinstein & Davison, 2004; Hong et al., 2018; Ron Fuge, 2019). Quando este elemento se encontra no meio ambiente, ele pode ser absorvido pelas plantas de várias maneiras. Em solução aquosa, o F pode ser absorvido por toda a superfície foliar (Rodrigues et al., 2017; Anjos et al., 2018); no solo, é absorvido pelo sistema radicular (Baunthiyal e Sharma, 2014); e em seu estado gasoso, o F é absorvido pelas folhas através dos estômatos, sendo conduzido pelo mesofilo foliar através de canais de ânions presentes nas membranas plasmáticas e/ou através do apoplasto (Rhim et al., 2016; Mondal, 2017; Anjos et al., 2018; Gomes et al., 2021).

Plantas expostas ao F podem apresentar alterações que se manifestam em níveis fisiológicos, morfológicos e anatômicos. No interior foliar, o F pode interagir com membranas, proteínas e ácidos nucleicos, induzindo o estresse oxidativo que promove a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas afetam a atividade de enzimas do metabolismo central, reduzindo as taxas fotossintéticas (Li et al., 2011; Sharma e Kaur, 2018; Rodrigues et al., 2020b). Além disso, o F pode reduzir o crescimento das plantas, pela inibição do crescimento das raízes, que reduz a absorção dos minerais, prejudicando assim, o acúmulo de biomassa (Elloumi et al., 2005; Barbier et al., 2010; Panda, 2015). O F ainda pode promover a degradação da clorofila e/ou a indisponibilidade do Mg^{2+} , que é um importante constituinte da molécula de clorofila, levando ao surgimento de cloroses e necroses foliares (Fornasiero, 2003; Sant'Anna-Santos et al., 2014; Anjos et al., 2018; Rodrigues et al., 2018b). Danos estruturais também ocorrem em decorrência da ação do F, como sinuosidades e achatamento da parede externa das células epidérmicas e/ou ruptura da mesma, redução da lâmina foliar, deformações dos estômatos e tricomas, erosão das ceras epicuticulares, além de modificações celulares como, colapso e hipertrofia (Silva et al., 2000; Pita-Barbosa et al., 2009; Louback et al., 2016; Anjos et al., 2018; Rodrigues et al., 2017, 2018b; Sant'Anna-Santos et al., 2021; Gomes et al., 2021). Por fim, o acúmulo do F nos tecidos das plantas pode causar diversos danos não só a

própria planta, como também aos animais, uma vez que o mesmo pode ser transferido através da cadeia alimentar (Valdez-Jiménez et al., 2011).

A compreensão de como os poluentes atmosféricos afetam as espécies nativas do Brasil facilita a projeção de avaliação de riscos destas espécies, podendo inclusive, influenciar decisões políticas. *Bixa orellana* L. (Bixaceae) é uma espécie nativa da América do Sul e economicamente importante, que possui ampla ocorrência na região Amazônica brasileira (Prance, 1976; Rizzini & Mors, 1995; Hakuno, 2005), onde se concentra o maior polo industrial de alumínio da América Latina (IOS, 2008). Esta espécie recebe diversas denominações em todo o mundo e, no Brasil é popularmente conhecida como urucum, urucu, colorau, colorífico, açafroa e açafroeira-da-terra (Lorenzi, 2002; Moreira et al., 2015; Dequigiovanni et al., 2018). *B. orellana* produz bixina, um pigmento que tem se destacado nas indústrias alimentícia, têxtil, de tintas e de cosméticos, importante cultural e economicamente, utilizado em todo o mundo (Lorenzi, 2002; Lorenzi & Matos, 2008; Stringheta & Silva, 2008; Silva et al., 2009). Este pigmento está presente em maior quantidade em suas sementes e é secretado por laticíferos (Fabri & Teramoto, 2015; Rivera et al., 2016; Almeida et al., 2021).

Embora existam alguns estudos sobre a contaminação de F em espécies próximas às fontes emissoras deste poluente, pouco se sabe sobre as consequências da concentração deste poluente nas plantas, quando cessa a emissão para a atmosfera e, consequentemente, a absorção pelas plantas também é interrompida. Neste contexto, o presente estudo busca revelar a longevidade da contaminação por F e a magnitude do impacto das indústrias emissoras de F em vegetações que estão frequentemente expostas a este poluente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material botânico e condição experimental

Mudas de *Bixa orellana* em estágio vegetativo, com oito meses de idade, foram fornecidas pelo viveiro do Instituto Estadual de Florestas (IEF), localizado no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. O cultivo foi realizado em vasos de 11 L, os quais foram preenchidos com substrato orgânico (Tropstrato HT®).

As plantas permaneceram em ambiente controlado, em casa de vegetação durante todo o experimento. Todos os indivíduos foram irrigados com água deionizada em dias alternados, mantendo a capacidade de campo do substrato. Semanalmente, cada planta recebeu 50 ml de solução nutritiva de Hoagland 50% (Hoagland & Arnon, 1950).

A simulação da chuva contendo F ocorreu no exterior da casa de vegetação diariamente às 8 horas, respeitando-se o tempo de 15 min antes e depois da aplicação, para a aclimação das plantas ao ambiente. O F foi aplicado na forma de uma solução de fluoreto de potássio (KF) preparada em água destilada (pH 6,0) (Silva et al., 2000). Para o tratamento controle, foi utilizado apenas água destilada (pH 6,0). A técnica de aplicação de KF simulando uma chuva, foi baseada no estudo de Pita-Barbosa et al. (2009), utilizando-se um pulverizador manual de pré-compressão. Após realização de um pré-teste de aplicação da solução nas plantas, foi determinado o volume de 30 ml como o suficiente para molhar toda a superfície da planta. As plantas foram expostas ao spray contendo flúor diariamente durante 6 dias e, a partir desse dia, finalizou-se a aplicação do poluente, e as plantas ficaram sob monitoramento por 85 dias.

2.2. Determinação do teor de flúor

Para a quantificação do flúor na matéria seca, foram coletadas folhas adultas (FA) (folhas totalmente expandidas desde o início do período experimental) e folhas jovens (FJ) (folhas que se desenvolveram após exposição ao F) dos indivíduos de todos os tratamentos, 85 dias após a última chuva simulada. As amostras foram secas em estufa, a 65 °C, e reduzidas, em moinho do tipo Wiley, em partículas com dimensões inferiores a 1 mm. Logo após, alíquotas de 0,25 g de cada repetição foram submetidas à extração em ácido sulfúrico 0,5 M (Fialho, 1997). A determinação potenciométrica do teor de flúor foi realizada com o uso de um eletrodo específico (Thermo Scientific Fluoride Ions Selective Electrode, Massachusetts, EUA) ligado ao aparelho analisador de íons (Orion Research Incorporated EA 920, Massachusetts, EUA).

2.3. Avaliação dos sintomas visuais

Durante o experimento, todas as folhas com sintomas, de cada um dos indivíduos (n=6) de todos tratamentos, foram fotografadas semanalmente com o objetivo de registrar o início dos sintomas, e a evolução das cloroses ou necroses ocasionadas pelo flúor (Silva et al., 2000; Louback et al., 2016; Anjos et al., 2018).

Para a análise visual, foi considerado o grau de injúrias foliares. Para isso, foi utilizada uma escala (Silva et al., 2000) na qual o grau de injúria é classificado de acordo com a porcentagem de área foliar danificada em relação ao tamanho da folha: levemente injuriada (com manchas necróticas e cloróticas esparsas), moderadamente injuriada (com 30 a 50% da área foliar necrosada), muito injuriada (com 50 a 70% da área foliar necrosada) e extremamente injuriada (com mais de 70% da área foliar necrosada).

2.4. Avaliação de trocas gasosas

Após 85 dias da última chuva simulada contendo F a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i) e respiração (R_d), foram obtidos com o uso de um analisador portátil de gás infravermelho (LICOR Biosciences Inc., Nebraska, USA) equipado com câmara de fluorescência integrada (LI-6400-40, Lincoln, NE, USA). As medições foram realizadas em folhas completamente expandidas do 3º nó a partir do ápice, de todos os indivíduos de cada tratamento, sob irradiância de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ e temperatura de 25°C .

2.5. Quantifica\u00e7\u00e3o de biomassa

Para a quantifica\u00e7\u00e3o de biomassa foram coletadas folhas jovens (folhas que se desenvolveram ap\u00f3s exposi\u00e7\u00e3o ao F) de todos os indiv\u00edduos dos diferentes tratamentos. As amostras foram submetidas a desidrata\u00e7\u00e3o em estufa com ventila\u00e7\u00e3o for\u00e7ada a 65°C at\u00e9 atingirem valor de massa constante. Ap\u00f3s o processo de secagem, procedeu-se a quantifica\u00e7\u00e3o da massa de m\u00e1teria seca em balan\u00e7a anal\u00edtica.

2.6. An\u00e1lise estat\u00edstica

Foram utilizadas seis unidades experimentais devidamente padronizadas para cada um dos tr\u00eas tratamentos (unidade experimental = 01 planta por vaso). Os vasos foram arran\u00e7ados em delineamento inteiramente casualizado, e os tratamentos compostos por 0; 20 e 40 mg/L de KF. Os dados foram submetidos a an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA). Quando significativos, as m\u00e9dias foram comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), com aux\u00edlio do software R (R CORE TEAM, 2014).

3. RESULTADOS

3.1. Determina\u00e7\u00e3o do teor de fl\u00f3or

Ap\u00f3s 85 dias da aplica\u00e7\u00e3o da \u00faltima chuva simulada, os indiv\u00edduos de *B. orellana* expostos a 20 mg de F apresentaram concentra\u00e7\u00e3o m\u00e9dia de F nas folhas adultas (FA) de $3,7 \mu\text{g}$ n\u00e3o diferindo significativamente do tratamento controle (Fig. 1B). No entanto, as FA expostas a 40 mg de F apresentaram uma concentra\u00e7\u00e3o deste poluente 135% maior em rela\u00e7\u00e3o ao controle (Fig. 1B). Nas folhas jovens (FJ) dos indiv\u00edduos do tratamento com 40 mg de F, a concentra\u00e7\u00e3o deste poluente foi 23% maior em rela\u00e7\u00e3o ao controle (Fig. 1A). J\u00e1 as FJ dos

indivíduos expostos a 20 mg de F apresentaram concentração média de 2,4 μg do poluente, não diferindo significativamente do tratamento controle (Fig. 1A).

3.2. Avaliação dos sintomas visuais

Bixa orellana possui folhas classificadas como alternas, simples, inteiras, cordiformes, membranáceas, ápice acuminado e base cordada, pecíolo alongado, cilíndrico, apresentando pulvino nas porções proximal e distal (Fig.2).

No 6º dia após exposição ao F (20 mg/F), indivíduos de *Bixa orellana* apresentaram folhas levemente injuriadas, com manchas cloróticas intervenais esparsas e necrose no ápice foliar (Fig. 2D). No 45º dia, a área com cloroses aumentou e em alguns pontos, as mesmas evoluíram para necroses. A necrose no ápice foliar também aumentou em extensão, levando ao encarquilhamento dessa região (Fig. 2E). Ao final do experimento no 85º dia, as folhas se mantiveram levemente injuriadas e as áreas cloróticas intervenais e a necrose apical não aumentaram em extensão (Fig. 2F).

No 6º dia após aplicação do F na maior concentração (40 mg/F), os indivíduos de *B. orellana* apresentaram folhas levemente injuriadas, com áreas necrosadas intervenais esparsadas, além da margem e ápice foliar também necrosados (Fig. 2G). No 45º dia, estas folhas já estavam muito injuriadas, ao redor das necroses surgiram extensas áreas cloróticas que tomaram 70% da área foliar, e a necrose no ápice foliar levou ao encarquilhamento dessa região (Fig. 2H). Já no final do experimento, no 85º dia após exposição ao F, estas mesmas folhas estavam extremamente injuriadas, as áreas cloróticas tomaram mais de 90% da área foliar (Fig. 2I). No tratamento controle, todas as folhas dos indivíduos apresentaram-se sadias, e se mantiveram assim até o final do experimento (Fig. 2A - C).

3.3. Avaliação de trocas gasosas

As plantas tratadas com 40 mg F L⁻¹ após 85 dias do experimento apresentaram taxa fotossintética (*A*) de 3,3 μmol , redução de 55% nos valores, em relação ao controle. A *A* do tratamento com 20 mg F L⁻¹ foi de 5,2 μmol e não diferiu do tratamento controle (Fig. 3A).

A condutância estomática (*gs*) acompanhou a redução da taxa fotossintética nos tratamentos com 20 e 40 mg de F, com valores de 0,09 e 0,07 μmol . Nessas plantas, houve redução de 30 e 85% em relação ao controle, respectivamente (Fig. 3B).

Os valores médios da respiração (*R_d*) (Fig. 3C) e concentração interna de CO₂ (*C_i*) (Fig. 3D) não diferiram significativamente entre o controle e as plantas tratadas com F.

3.4. Quantificação de biomassa

A exposição a 20 e 40 mg F L⁻¹ resultou em uma queda na produção de biomassa das plantas, que apresentaram valores de 1,5 e 1,3 g, uma redução de 44 e 51% da biomassa, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle (Fig. 4).

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho constitui o primeiro relato acerca da longevidade da contaminação por F em uma espécie nativa do Brasil, após o fim da imissão desse elemento. Os sintomas visuais observados em *B. orellana* no 6º dia após exposição ao F, foram progressivamente aumentando em extensão, com as cloroses evoluindo para necroses, sendo que no 85º dia, em alguns casos, houve a perda de algumas folhas. Nota-se que o F pode ter acelerado o processo de senescência destas folhas expostas ao poluente, visto que as plantas do tratamento controle não apresentaram senescência. Cloroses são sintomas típicos da toxidez causada pelo F, e geralmente, essas injúrias progridem para necroses, como observado em nossa pesquisa. Necroses e cloroses estão relacionadas à redução de pigmentos fotossintetizantes nas folhas, decorrente da degradação ou inibição da biossíntese pelo F (Fornasiero, 2001; Weinstein & Davison, 2003; Rodrigues et al., 2018a; Stepec et al., 2019; Rodrigues et al., 2020). Neste trabalho, as folhas com extensas formações necróticas não se recuperaram e foram eliminadas pela planta.

Estudos que relatem a contaminação do F a longo prazo nas plantas são escassos. Brougham et al. (2013) avaliaram os impactos a longo prazo da poluição por F em algumas folhas e líquens, estes, foram coletados para monitorar as mudanças no teor de F durante um período de 15 meses. Os resultados mostraram que as concentrações de F na vegetação diminuíram pronunciadamente após 8 meses, evidenciando a longevidade da contaminação pelo poluente e corroborando com os dados aqui apresentados sobre a contaminação por F.

Em nosso monitoramento foi observado que as folhas jovens (FJ) e folhas adultas (FA) do tratamento com 20 mg de F, não apresentaram acúmulo considerável do poluente. No entanto, as FA e FJ expostas a 40 mg de F apresentaram uma concentração deste poluente 135% e 23% maior em relação ao controle, respectivamente. Em seu estado gasoso, o F atinge os tecidos foliares, principalmente através dos estômatos e, no mesófilo, migra com a corrente transpiratória para as margens foliares (Arndt et al., 1995). De acordo com Ledbetter et al. (1960), depois que o F se acumula nas plantas, há pouca ou nenhuma translocação adicional de folha para folha e para outros órgãos da planta, como caules e raízes. No entanto, nosso estudo

indica que o F concentrado nas FA do tratamento com 40 mg de F foi transportado, mesmo que em pequena quantidade, para as FJ destas plantas, visto que essas folhas se desenvolveram após exposição ao F. Nota-se assim, que ainda há controvérsia sobre a translocação desse poluente dentro da planta.

O F pode ativar enzimas que degradam pigmentos fotossintéticos, ou ainda inibir a biossíntese dessas moléculas e, por consequência, reduzir a fotossíntese (Li et al., 2011). Além disso, reduções nas taxas fotossintéticas podem ocorrer devido às restrições à difusão de CO₂ pela redução da condutância estomática (Weinstein & Davison, 2003), sem que haja degradação ou limitação na produção dos pigmentos relacionados a fotossíntese (Kamaluddin & Zwiazek, 2003). Danos observados na estrutura dos estômatos em plantas de *B. orellana* (Cap. 1) podem modificar as taxas fotossintéticas, assim como observado anteriormente em outras espécies (Baunthiyal et al., 2014; Jafari et al., 2016; Sant'Anna-Santos et al., 2021; Gomes et al., 2021). Em nossa pesquisa, plantas tratadas com 40 mg F L⁻¹ apresentaram redução nos valores da taxa fotossintética (*A*) e condutância estomática (*gs*) em relação ao controle. A *A* do tratamento com 20 mg F L⁻¹ não diferiu do tratamento controle, no entanto, a *gs* foi reduzida.

O efeito do F no crescimento de *B. orellana* foi mensurado pela determinação da biomassa seca das folhas novas que surgiram após exposição das plantas ao F. Este poluente promoveu uma queda na produção de biomassa em todos tratamentos que o continham. A redução do crescimento das plantas é uma resposta comum ao estresse induzido por F. Assim, nota-se, que mesmo após 85 dias decorridos da exposição ao poluente, as plantas ainda apresentavam crescimento reduzido quando comparado ao controle. O F pode reduzir a capacidade fotossintética reduzindo, assim, a alocação de carbono, causando alterações no crescimento das plantas. De acordo com Yang et al. (2015) o F reduz o comprimento da raiz e a produção de biomassa da raiz e parte aérea de *Arabidopsis thaliana*. Reduções na produção de biomassa também foram observadas por outros autores anteriormente em *Coffea arabica*, *Tibouchina pulchra* e *Amygdalis communi* expostas ao poluente (Elloumi et al., 2005; Furlan et al., 2007; Mesquita et al., 2011).

5. CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho são inéditos, e enfatizam a sensibilidade da espécie ao F, e os impactos duradouros da exposição ao poluente, pois estudos que relatem a contaminação do F a longo prazo nas plantas são escassos, não existindo pesquisas que investiguem as concentrações de F pós-emissão com espécies nativas brasileiras.

Analisando os dados morfológicos e fisiológicos de *B. orellana* apresentados em nossa pesquisa, podemos inferir que o período de 85 dias sem exposição ao F, para plantas que foram submetidas a 40 mg F L⁻¹, não foi o suficiente para que a espécie pudesse se recuperar. No entanto, as plantas do tratamento com 20 mg F L⁻¹ não apresentaram grandes alterações morfológicas e fisiológicas após 85 dias, indicando uma tolerância e/ou adaptação ao estresse causado pelo F. Evidenciamos ainda, que, de alguma forma, esse poluente foi eliminado ou compartimentalizado nas plantas desse tratamento, visto que foram diagnosticados sintomas morfológicos de toxidez causada pelo F nestas plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A. L., Freitas, P. F., Ferreira, C. P., Ventrella, M. C. 2021. Syncytial development of annatto (*Bixa orellana* L.) pigment gland: A curious type of anastomosed articulated laticifer. *Flora*. 274, 151-727
- Anjos, T. B. O., Louback, E., Azevedo, A. A., Silva, L. C. 2018. Sensibility of *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) exposed to fluoride-simulated fog. *Ecological Indicators*. 90, 154-163
- Arndt, U., Flores, F., Weinstein, L. H. 1995. Fluoride effects on plants, diagnose of injury in the vegetation of Brazil. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS
- Barbier, O., Arreola-Mendoza, L., Del Razo, L. M. 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico Biological Interactions*. 188, 319–333
- Baunthiyal, M., Ranghar, S. 2014. Physiological and biochemical responses of plants under fluoride stress: an overview. *Fluoride*. 47, 287–293
- Brougham, K. M., Roberts, S. R., Davison, A. W., Port, G. R. 2013. The impact of aluminum smelter shut-down on the concentration of fluoride in vegetation and soils. *Environ Pollut*. 178, 89–96
- Davison, A. W., Weinstein, L. H. 2006. Some problems relating to fluorides in the environment: effects on plants and animals. In: Tressaud, A. (Ed.), *Fluorine and the Environment. Atmospheric Chemistry, Emissions & Lithosphere*. pp. 251–298
- Dequigiovanni, G., Ramos, S. L. F., Alves, P. A., Fabri, E. G., Picanco-Rodrigues, D., Clement, C. R., Gepts, P., Veasey, E. A. 2018. Highly structured genetic diversity of *Bixa orellana* var. urucurana, the wild ancestor of annatto, in Brazilian Amazonia. *PLoS ONE* 13: e0198593
- Elloumi, N., Abdallah, F. B., Mezghani, I., Rhouma, A., Boukhris, M. 2005. Effect of fluoride on almond seedlings in culture solution. *Fluoride*. 38, 193–198
- Fabri, E. G., Teramoto, J. R. S. 2015. Urucum: fonte de corantes naturais. *Horticultura Brasileira*. 33, 140
- Fialho, R. C. 1997. Acumulação foliar de fluoretos e seu significado ecológico em espécies arbóreas da Mata Atlântica, Cubatão, SP. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo

- Fornasiero, R. B. 2003. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: First field observations. Plant Sci. 165, 507–513
- Fornasiero, R.B. 2001. Phytotoxic effects of fluorides. Plant Sci. 161, 979–985
- Furlan, C. M., Domingos, M., Salatino, A. 2007. Effects of initial climatic conditions on growth and accumulation of fluoride and nitrogen in leaves of two tropical tree species exposed to industrial air pollution. Sci Total Environ. 2, 399-407
- Gomes, T. F., Lima, A. M., Marques, A. P. P., Silva, L. C. 2021. Effects of fluoride emission on the morphoanatomy of three plant species endemics to Brazil using passive biomonitoring. Environ Sci Pollut Res. 28, 33083–33095
- Hakuno, D. 2005. Materials. In.: Prance, G.; Nesbitt, M. (Ed.) The cultural history of plants. New York: Routledgecap. 17, 335-353
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station: Berkeley, pp 347
- Hong, X., Liang, H., Chen, Y., Liu, Y., Shi, Y. 2018. Distribution of fluorine in the surface dust of Wuda coal base, Inner Mongolia of Northern China. J Geochem Explor. 188, 390–397
- IOS - Instituto Observatório Social. 2008. Estudo da cadeia produtiva do alumínio na região Norte do Brasil. O caso da empresa MRN
- Jafari, M., Noori, M., Malayeri, B. E. 2016. Effects of fluoride pollution on *Medicago sativa* l. Fluoride. 49, 441
- Kamaluddin, M., Zwiazek, J. J. 2003. Fluoride inhibits root water transport and affects leaf expansion and gas exchange in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. Physiologia Plantarum. 117, 368–375
- Keller, T. 1974. Translocation of fluoride in woody plants. Fluoride. 7, 31-35
- Ledbetter, M. C., Mavrodineanu, R., Weiss, A. J. 1960. Distribution studies of radioactive fluorine-18 and stable fluorme-19 in tomato plants. Contributions. Boyce Thompson Institute for Plant Research. 20, 331-348
- Li, C., Zheng, Y., Zhou, J., Xu, J., Ni, D. 2011. Changes of leaf antioxidant system, photosynthesis and ultrastructure in tea plant under the stress of fluorine. Biologia Plantarum. 55, 563–566

- Lorenzi, H. 2002. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 368p
- Lorenzi, H., Matos, F. J. A. 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 544p
- Louback, E., Pereira, T. A. R., de Souza, S. R., de Oliveira, J. A., Da Silva, L. C. 2016. Vegetation damage in the vicinity of an aluminum smelter in Brazil. *Ecol Indic.* 67, 193–203
- Marchiol, L., Assolari, S., Sacco, P., Zerbi, G. 2004. Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multi contaminated soil. *Environmental Pollution.* 132, 21-27
- Mesquita, G. L., Tanaka, F. A. O., Cantarella, H., Mattos, D. 2011. Atmospheric absorption of fluoride by cultivated species. Leaf structural changes and plant growth. *Water, Air, and Soil Pollution.* 219, 143–156
- Mondal, N. K. 2017. Effect of fluoride on photosynthesis, growth and accumulation of four widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in India. *Ecotox Environ Safety.* 144, 36–44
- Moreira, P. A., Lins, J., Dequigiovanni, G., Veasey, E. A., Clement, C. R. 2015. The domestication of annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia, *Econ Bot.* 69, 127–135
- Panda, D. 2015. Fluoride toxicity stress: physiological and biochemical consequences on plants. *Int J Bioresour Environ Agric Sci.* 1, 70–84
- Pita-Barbosa, A., Sant’Anna-Santos, B. F, Silva, K. L. F., Azevedo, A. A., Rocha, D. I. 2009. Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). *Acta Bot Bras.* 23, 1027–1033
- Prance, G. T. 1976. Algumas flores da Amazônia. Manaus: INPA, 56p
- R CORE TEAM. 2014. R: A language and environment for statistical computing Vienna: R Foundation 5 for Statistical Computing
- Rhimi, N., Ben, A. H., Elloumi, N., Athar, H. R., Noreen, S., Ashraf, M., Ben Abdallah, F., Ben Nasri-Ayachi, M. 2016. Morpho-anatomical and physiological changes in grapevine leaves exposed to atmospheric fluoride and sulfur dioxide pollution. *Appl Ecol Environ Res.* 14, 77-89

- Rivera, M. R., Aguilar, E. M., Cárdenas, C. Y., Garza-Caligaris, L. E. 2016. Carotenoid derivatives in achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Front Plant Sci.* 7, 14-06
- Rizzini, C. T., Mors, W. B. 1995. *Botânica econômica brasileira*. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 241p
- Rodrigues, A. A., Vasconcelos-Filho, S. C., Mendes, G. C., Rehn, L. S., Rodrigues, D. A., Rodrigues, C. L., Müller, C. 2017. Fluoride in simulated rain affects the morphoanatomy and physiology of *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC. *Ecol Indic.* 82, 189–195
- Rodrigues, A. A., Vasconcelos-Filho, S. C., Müller, C., Rodrigues, D. A., Mendes, G. C., Rehn, L. S., Costa, A. C., Vital, R. G., Sales, J. F. 2018a. *Sapindus saponaria* bioindicator potential concerning potassium fluoride exposure by simulated rainfall: anatomical and physiological traits. *Ecol Indic.* 89, 552–558
- Rodrigues, D. A., de Fátima, S. J., Vasconcelos-Filho, S. C., Rodrigues, A. A., Teles, E. M. G., Costa, A. C., Reis, E. L., de Carvalho, S. T. A, Müller, C. 2020b. Bioindicator potential of *Ricinus communis* to simulated rainfall containing potassium fluoride. *PeerJ.* 8, 94-45
- Rodrigues, D. A., Vasconcelos-Filho, S. C, Rodrigues, A. A, Müller, C., Farnese, F. S., Costa, A. C., Teles, E. M. G., Rodrigues, C. L. 2018b. *Byrsonima basiloba* as a bioindicator of simulated air pollutants: morphoanatomical and physiological changes in response to potassium fluoride. *Ecol Indic.* 89, 301–308
- Ron Fuge. 2019. Fluorine in the environment, a review of its sources and geochemistry, *Applied Geochemistry.* 100, 393-406
- Sant’Anna-Santos, B. F. S., Azevedo, A. A. 2010. Toxicidade e acúmulo de flúor em hortaliças nas adjacências de uma fábrica de alumínio. *Acta Bot Brasilica.* 24, 952–963
- Sant’Anna-Santos, B. F., Azevedo, A. A., Alves, T. G., Campos, N.V., Oliva, M. A., Valente, V. M. M. 2014. Effects of emissions from an aluminium smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. *Water Air Soil Pollut.* 225, 18-17

Sant'Anna-Santos, B. F., de Freitas-Silva, L., Azevedo, A. A., Gomes, M. P. 2021. Could the fluoride-tolerant species *Panicum maximum* replace sensitive plants in fluoride biomonitoring? *Ecological Indicators*. 122, 107-308

Sharma, R., Kaur, R. 2018. Insights into fluoride-induced oxidative stress and antioxidant defences in plants. *Acta Physiol Plant*. 40, 10–181

Silva, L. C, Azevedo, A. A, Silva, E. A. M, Oliva, M. A. 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Rev Bras Bot*. 23, 385–393

Silva, P. I., Nachtigall, A. M., Stringheta, P. C. 2009. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (*Bixa orellana* L.). *Ciência e Agrotecnologia*. 33, 1892-1897

Stepec, D., Tavcar, G., Ponikvar-Svet, M. 2019. Fluorine in vegetation due to an uncontrolled release of gaseous fluorides from a glassworks: a case study of measurement uncertainty, dispersion pattern and compliance with regulation. *Environ Pollut*. 248, 958–964

Stringheta, P. C., Silva, P. I., Costa, M. G. C., Soares, V. L. F., Gesteira, A.G., Cruz, A. C. F., Otoni, W. C. 2008. Pigmentos do urucum – estrutura, química, biossíntese e degradação. p. 24-26. In: Stringheta, P. C.; Silva, P. I. (Org.). *Pigmentos do urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações*. 1. ed. Viçosa-MG: Gráfica e Editora Suprema, 166p.

Valdez-Jiménez, L., Fregozo, C. S., Beltrán, M. L. M., Coronado, O. G., Veja, M. I. P. 2011. Effects of the fluoride on the central nervous system. *Neurología*. 26, 5–8

Weinstein, L. H., Davison, A. 2004. Fluorides in the environment. I p.

Weinstein, L. H., Davison, A. W. 2003. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. *Environmental Pollution*. 125, 3–11

Yang, X., Ye, C., Liu, Y., Zhao, F. J. 2015. Accumulation and phytotoxicity of perfluorooctanoic acid in the model plant species *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution*. 206, 560–566

Yepu, L., Shengli, W., Prete, D., Suyin, X., Zhongren, X., Fei, Z., Qian, Z. 2017. Accumulation and interaction of fluoride and cadmium in the soil-wheat plant system from the wastewater irrigated soil of an oasis region in northwest China. *Sci Total Environ.* 595, 344–351

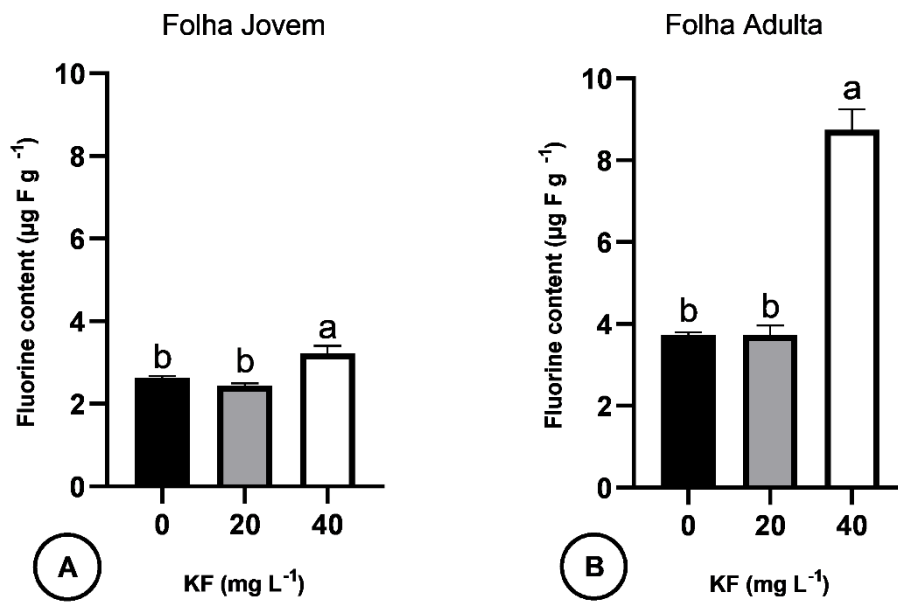


Figura 1. Teor de flúor em folhas jovens e adultas de *Bixa orellana* submetida a diferentes concentrações do poluente e coletadas após 85 dias da aplicação da chuva simulada. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o erro padrão ($n=4$).

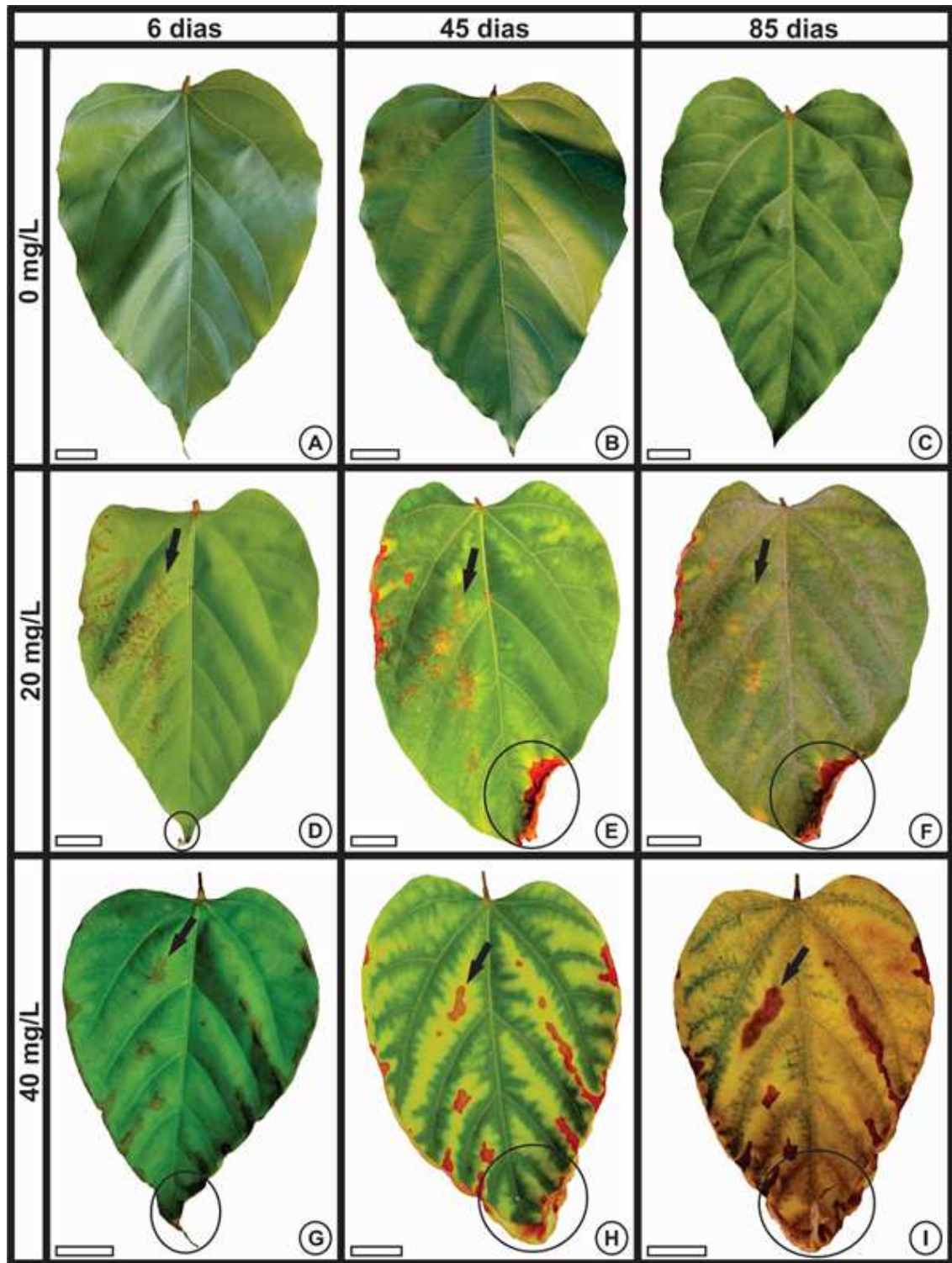


Figura 2. Sintomatologia de *Bixa orellana* após exposição ao flúor (0, 20, 40 mg F L⁻¹). A, B, C. Tratamento controle. D, E, F. Manchas cloróticas esparsas intervenais (seta) e encarquilhamento da margem e ápice foliar (elipse). G, H, I. Necroses intervenais e marginais (seta) e encarquilhamento do ápice foliar (elipse). Escala: 2cm.

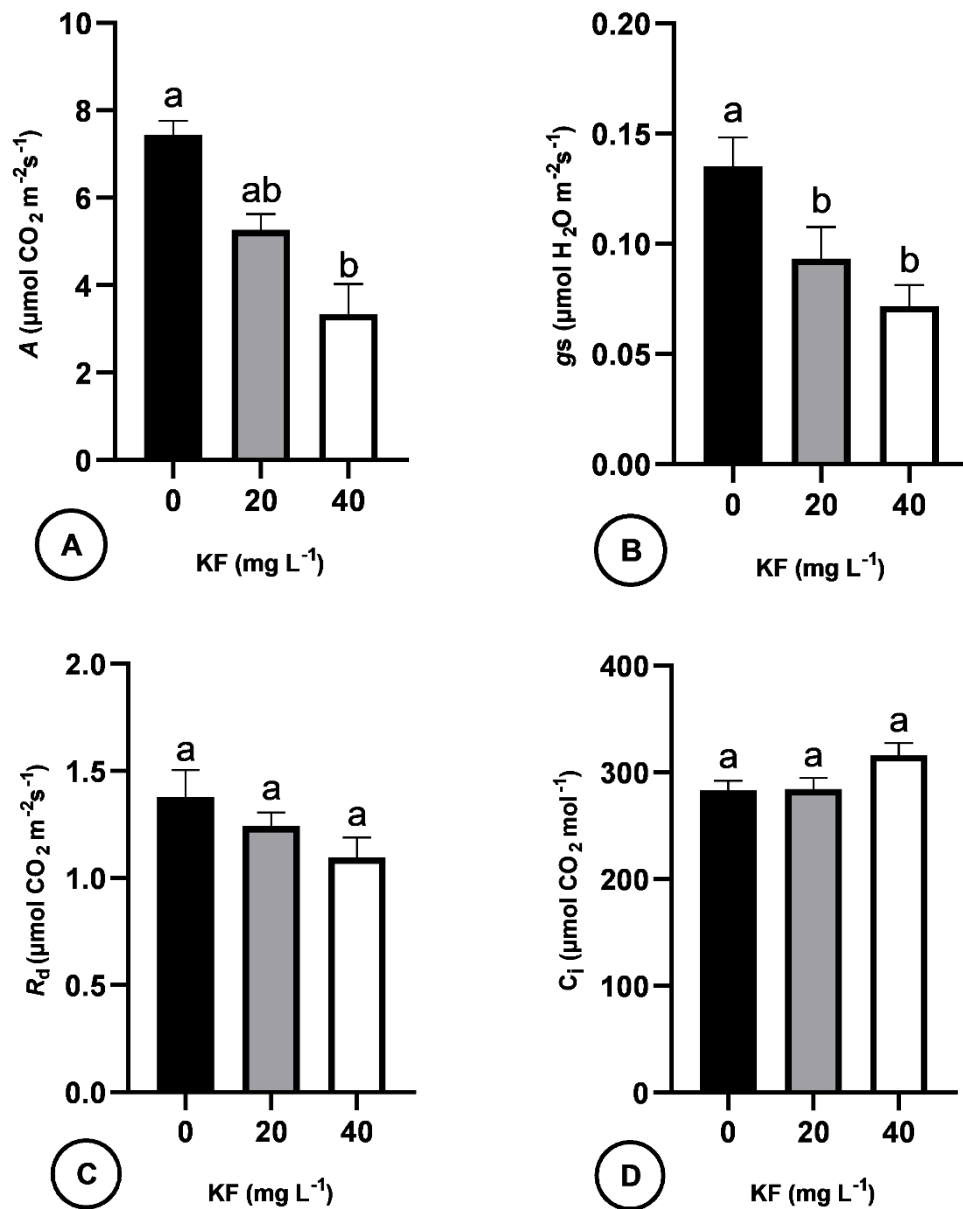


Figura 3. Parâmetros fotossintéticos avaliados em folhas de *Bixa orellana* submetida a diferentes concentrações de F, após 85 dias da aplicação da chuva simulada. A. Assimilação de CO₂ (A). B. Condutância estomática (g_s). C. Respiração (R_d). D. Concentração interna de CO₂ (C_i). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4).

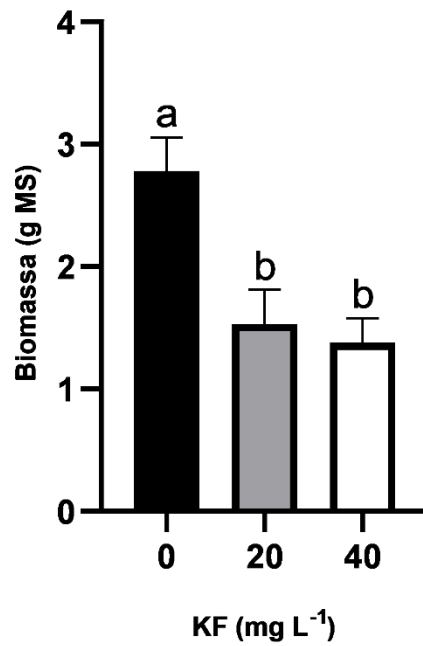


Figura 4. Massa de matéria seca das folhas jovens de indivíduos de *Bixa orellana* que foram submetidos a diferentes concentrações de F, após 85 dias da aplicação da chuva simulada. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem que *Bixa orellana* é uma espécie sensível ao flúor devido as alterações observadas em sua morfoanatomia e metabolismo. Os danos microscópicos observados em suas folhas são semelhantes aos observados em muitas outras espécies, constituindo-se excelentes indicadores para a poluição por F. Dentre as concentrações de F utilizadas, a de 40 mg F L⁻¹ foi a que gerou mais danos para a espécie, mesmo após o fim da exposição ao poluente. As plantas submetidas a 10 e 20 mg F L⁻¹ também acumularam altas concentrações do poluente, mas não apresentaram grandes alterações anatômicas e fisiológicas.

Nossos dados demonstram que os fitohormônios respondem ao estresse causado pelo poluente, configurando em uma análise inédita e importante para traçar os meios de autodefesa da planta. Concluímos que após 85 dias sem exposição ao F, a espécie ainda não pôde se recuperar dos danos provocado pelo poluente, e que devido as alterações visuais observadas, *B. orellana* é uma espécie fitoindicadora promissora em estudos de biomonitoramento de F no ambiente.