

**FRANKLIN PATROCÍNIO REZENDE**

**ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS NAS FOLHAS E  
NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS DE *Cedrela fissilis* VELL. (MELIACEAE) EM  
RESPOSTA À CHUVA ÁCIDA SIMULADA**

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

Orientadora: Luzimar Campos da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2020**

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

T

R467a  
2020  
Rezende, Franklin Patrocínio, 1994-  
Alterações morfoanatômicas e fisiológicas nas folhas e  
nectários extraflorais de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) em  
resposta à chuva ácida simulada / Franklin Patrocínio Rezende. –  
Viçosa, MG, 2020.  
49 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Luzimar Campos da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.41-49.

1. Plantas - Efeito da poluição. 2. Indicadores biológicos.  
3. Secreções vegetais. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação  
em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.77

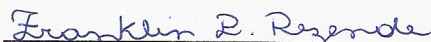
FRANKLIN PATROCÍNIO REZENDE

ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS NAS FOLHAS DE  
*Cedrela fissilis* VELL. (MELIACEAE) E NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS EM  
RESPOSTA À CHUVA ÁCIDA SIMULADA

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

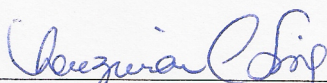
APROVADA: 19 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Franklin Patrocínio Rezende

Autor



Luzimar Campos da Silva

Orientadora

Dedico esta conquista a minha mãe, que me amou,  
guiou e me apoiou em tudo que fiz desde sempre

## AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, por todo o conhecimento a mim proporcionado.

A minha orientadora e amiga Luzimar Campos da Silva, que aceitou me orientar na graduação, num momento difícil, e desde então tem contribuído para o meu crescimento como profissional e também como pessoa. Obrigado pela confiança no meu trabalho e por ter se tornado uma grande amiga.

As professoras da Anatomia Vegetal, Aristéa Azevedo e Renata Strozi, pelos conhecimentos compartilhados durante o curso e pelos momentos de descontração no cafezinho.

A Aurora e Rosana, por todo o apoio dado no laboratório nos momentos em que precisei.

A Deus, por ter me proporcionado todas as condições necessárias para concluir mais essa etapa.

A minha mãe, Silvânia Patrocínio, pelo amor, carinho, apoio e que sempre fez o possível e o impossível para que eu pudesse estudar e chegar até aqui.

A minha irmã Liriana Patrocínio Rezende, pelo amor e companheirismo.

A minha família, em especial a Dinha por sempre me colocar em suas orações, acreditar e torcer por mim.

Ao Henrique César Batista, pelo amor, amizade, apoio e por sempre acreditar em mim.

Aos meus amigos do laboratório Elienai (Barata), Analu, Miller, Wenita, Hugo e Danizete pelos momentos de descontração (e dupla coloração) na hora do almoço.

Ao meu grupo de estudos, Iara, Daniel, Adriana, Caio, Esneider e um agradecimento especial a Thamires e ao Michel pelo imenso apoio nos (muito) longos momentos que compartilhamos fazendo análises e trabalhando juntos.

Aos demais colegas do laboratório por compartilharem a correria do dia-a-dia e fazerem dela mais leve.

A Clara e a Joelma (Cuscuta, Ana Maria e por aí vai) por todos os momentos (estresse, brigas, mas principalmente risadas) proporcionados durante o mestrado e pela grande amizade.

A Kassiana Mafra pela amizade desde o primeiro dia da graduação e pelos resumos (indispensáveis).

A Maria Bevilacqua pela amizade, pelas risadas e por me aguentar 24 horas por dia.

A Renata Basílio pelo carinho de irmã, amor e loucuras de todo dia.

As vencedoras em 7º lugar, as Mimosinhas e aos Cortadores de Pezinho por todo apoio, carinho, amor, risadas, festas e todos os bons momentos durante a graduação e o mestrado.

A todos os amigos que fizeram do mestrado um momento da minha vida em que eu pude crescer, amadurecer e me tornar uma pessoa melhor, seja pela companhia, conversas, festas, desabafos, ou mesmo por aquela cervejinha gelada para melhorar o dia. Amo vocês demais!

## RESUMO

REZENDE, Franklin Patrocínio, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Alterações morfoanatômicas e fisiológicas nas folhas e nectários extraflorais de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) em resposta à chuva ácida simulada.** Orientadora: Luzimar Campos da Silva.

A chuva ácida é um problema ambiental de escala Global. Este fenômeno promove alterações florísticas e é um dos problemas associados à degradação de florestas tropicais. A Mata Atlântica brasileira é um dos mais ricos hotspots de biodiversidade do mundo e a mesma está sujeita ao impacto da chuva ácida. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar as alterações morfoanatômicas e fisiológicas de *Cedrela fissilis* à chuva ácida simulada. Essa espécie possui nectários extraflorais nas folhas que são de extrema importância nas relações planta-inseto. Mudanças de *C. fissilis* foram expostas à chuva ácida simulada durante 19 dias consecutivos em casa de vegetação. A solução ácida foi preparada utilizando-se solução estoque de ácido sulfúrico 1N diluído em água destilada, até se obter pH 3,0. O controle foi realizado utilizando-se água destilada. Foram aplicados 50 ml de solução em casa planta diariamente utilizando-se borrifadores manuais. Os efeitos visuais foram avaliados em folhas; os anatômicos, micromorfológicos e histoquímicos foram avaliados em folhas e nectários extraflorais. Foram avaliados, também, trocas gasosas, teor de pigmentos e atividade de enzimas do sistema antioxidativo dessas plantas. O tratamento induziu menos de 30% de dano visual, caracterizado por pequenos pontos necróticos na lâmina foliar. Os sintomas anatômicos e micromorfológicos consistiram em alterações no formato das células epidérmicas, rompimento das mesmas, hipertrofia celular, rompimento e alteração no padrão de divisões das células do mesófilo. Em testes histoquímicos, *C. fissilis* apresentou acúmulo de compostos fenólicos na epiderme abaxial em ambos os tratamentos, e maior acúmulo na face adaxial das plantas expostas à chuva ácida. Maior acúmulo de carboidratos também foi observado na epiderme da face adaxial das folhas do tratamento. Os nectários extraflorais apresentaram flacidez e rompimento de células da epiderme secretora e retração de protoplasto no parênquima nectarífero. Houve reação positiva para carboidratos e compostos fenólicos em todo o nectário nos testes histoquímicos. A chuva ácida induziu aumento significativo nas taxas de transpiração (E) e redução na eficiência no uso da água (EUA) e na eficiência de carboxilação da Rubisco nas plantas do tratamento. O teor de clorofila B foi menor nas plantas do

tratamento, enquanto o de carotenoides aumentou nas mesmas. A atividade da superóxido dismutase (SOD) aumentou nas plantas do tratamento com chuva ácida, enquanto houve redução da atividade da catalase (CAT). Esses resultados indicam que *C. fissilis* possui diferentes estratégias na neutralização do estresse causado pela chuva ácida, como defesas antioxidativas enzimáticas e não enzimáticas. Dessa forma, *C. fissilis* apresentou diferentes graus de dano nas diferentes variáveis analisadas.

**Palavras-chave:** Bioindicadores. Poluição atmosférica. Estruturas secretoras. Alterações anatômicas. Alterações fisiológicas.

## ABSTRACT

REZENDE, Franklin Patrocínio, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Morphoanatomical and physiological changes in leaves and extrafloral nectaries of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) in response to simulated acid rain.** Adviser: Luzimar Campos da Silva.

Acid rain is a global scale environmental problem. This phenomenon promotes floristic changes and is one of the problems associated with the degradation of tropical forest. The Brazilian Atlantic Forest is one of the most biodiverse hotspots in the world and is under effect of acid rain. Thus, the object of this work was to investigate the morphoanatomical and physiological changes in *Cedrela fissilis* to simulated acid rain. This species has extrafloral nectaries (EFNs) on the leaves that are extremely important in plant-insect relations. *C. fissilis* seedlings were exposed to simulated acid rain for 19 consecutive days in a greenhouse. The acidic solution was prepared using 1N sulfuric acid solution diluted in distilled water, until pH 3.0 was obtained. The control was performed using distilled water. 50 ml of solution were daily applied on each plant, using manual sprayers. Visual effects were assessed on leaves; anatomical, micromorphological and histochemical were evaluated in leaves and extrafloral nectaries. Gas exchange, pigment content and the activity of the enzymes from the antioxidant system were also measured. The treatment induced less than 30% of visual damage, which was characterized by small necrotic spots on the leaf blade. The anatomical and micromorphological symptoms consisted of changes in the shape and disruption of epidermal cells, cell hypertrophy, disruption and alteration in the pattern of divisions of the mesophyll cells. In histochemical tests, *C. fissilis* showed an accumulation of phenolic compounds in the abaxial epidermis of the abaxial face in both treatments, and greater accumulation in the adaxial face of plants exposed to acid rain. Greater accumulation of carbohydrates was also observed in the epidermis of the adaxial face of the leaves from the treatment. The extrafloral nectaries showed flaccidity and rupture of the secretory epidermis cells and retraction of protoplast in the nectariferous parenchyma. There was a positive reaction for carbohydrates and phenolic compounds in the nectary in histochemical tests. Acid rain induced a significant increase in transpiration rates (E) and reduction in water use efficiency (EUA) and in Rubisco's Carboxylation Efficiency in the treatment plants. The amount of chlorophyll B was lower in the treatment plants, while the carotenoids increased with the acid rain.

Superoxide dismutase (SOD) activity increased in plants treatment with acid rain, while there was a reduction in catalase activity (CAT). These results show that *C. fissilis* has different strategies in order to neutralize the stress caused by acid rain, such as enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses. Thus, *C. fissilis* presented different levels of damage in the different variables analyzed.

**Keywords:** Bioindicators. Air pollution. Secretory structures. Anatomical alterations. Physiological alterations.

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	11
2 - OBJETIVOS.....	14
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 - Obtenção e cultivo das plantas .....	15
3.2 - Aplicação da chuva ácida simulada.....	15
3.3 - Caracterização visual.....	15
3.4 - Caracterização anatômica e micromorfológica .....	16
3.5 - Caracterização histoquímica da lâmina foliar .....	16
3.6 - Caracterização anatômica, micromorfológica e histoquímica dos nectários extraflorais .....	17
3.7 - Avaliação de trocas gasosas .....	18
3.8 - Teores de clorofila a, b e carotenoides .....	18
3.9 - Avaliação da atividade das enzimas do sistema antioxidativo.....	18
4 - RESULTADOS .....	21
5 - DISCUSSÃO.....	24
6 - CONCLUSÕES.....	31
7 - ANEXOS.....	32
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## 1 – INTRODUÇÃO

O crescente processo de industrialização é um dos principais responsáveis pela emissão de poluentes atmosféricos. Atividades como a queima de petróleo e derivados e utilização de veículos promovem a liberação de compostos como dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) e óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ) em altas quantidades na atmosfera (Larssen et al., 2006). Estes compostos podem reagir com vapor d'água, formando ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), diminuindo o pH da água da chuva e contribuindo para a ocorrência de um fenômeno conhecido como chuva ácida (Mirlean et al., 2000).

A chuva ácida é considerada um problema ambiental de escala global. Em Regiões da Ásia e Índia, as emissões de gases precursores da chuva ácida crescem continuamente (Burns et al., 2016). De acordo com Sheng e Tang (2016), a China é o país que mais emite dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) na atmosfera. Ainda, segundo Li et al. (2017), as emissões de  $\text{SO}_2$  na Índia aumentaram cerca de 50% desde 2007, se equiparando à China e tornando-os os dois países com maiores taxas de emissão desse poluente. No Brasil, a chuva ácida também é um problema, principalmente em regiões com alta atividade industrial e grande frota de veículos (Martins et al. 2013; Vieira-Filho et al. 2015). Em cidades brasileiras altamente industrializadas como São Paulo, Cubatão, Piracicaba, Belo Horizonte e Rio de Janeiro existem diversos registros de precipitações ácidas (Figueiredo, 1999; Lara et al., 2001; Mello, 2001; Leal et al., 2004). Além de danificar construções feitas pelo homem, as chuvas ácidas apresentam grande impacto em sistemas ecológicos (Likens et al., 1972; Hutchinson e Havas, 2012).

A Mata Atlântica brasileira é considerada um dos mais ricos hotspots de biodiversidade do mundo. Este domínio apresenta aproximadamente 20.000 espécies vegetais, sendo 8.000 delas endêmicas e corresponde a aproximadamente 2,7% da flora mundial (Myers et al., 2000). Além disto, o mesmo abriga 72% da população brasileira e três dos maiores centros urbanos do continente sul americano. Além do aumento contínuo do desmatamento (Fundação SOS Mata Atlântica, 2014), um dos grandes problemas associados à degradação de florestas, por vezes, próximas a centros industriais, é a chuva ácida que promove alterações acentuadas na sua composição florística, causando danos severos ao ecossistema (Hutchinson e Havas, 2012; Wondyfraw, 2014).

Uma das maiores unidades de conservação do Brasil, o Parque Estadual do Rio Doce (PERD) está localizado no estado de Minas Gerais, sendo o maior fragmento de floresta tropical do estado (Instituto Estadual de Florestas, 2019). O PERD possui 35.970

hectares e sua vegetação é classificada como Floresta Estadual Semidecidual Submontana ou Floresta Tropical Subcaducifólia, e abriga flora extremamente diversa (Veloso et al., 1991). A porção Norte do parque é circundada por siderúrgicas de grande porte como ACESITA, USIMINAS e USIMEC, de onde são liberados compostos que podem levar a ocorrência de chuva ácida, como já registrado na região (Silva et al., 2000; Scudeller, 1997; Castro, 1987). A vegetação adjacente a tais fontes de poluição é impactada, apresentando modificações anatômicas e fisiológicas (Andrade, 2015; Silva, 2015).

A utilização de espécies vegetais bioindicadoras é uma alternativa relativamente simples e que tem se mostrado bastante eficaz na avaliação da qualidade de variáveis ambientais, apresentando vantagens como a ausência de aparelhagem sofisticada e eficiência na análise de áreas amplas a baixo custo (Carneiro, 2004). Alguns estudos já evidenciaram a sensibilidade de plantas da Mata Atlântica às precipitações ácidas. Tais espécies podem apresentar sintomas visuais, anatômicos e micromorfológicos que incluem necrose foliar, acúmulo de compostos fenólicos e grãos de amido nas células parenquimáticas, deformação nos estômatos, ruptura das cristas estomáticas, senescência dos primórdios foliares, descamação das ceras epicuticulares, alteração no formato das células epidérmicas, ruptura da epiderme e das células do mesofilo, hipertrofia nas células do mesofilo e formação de tecido de cicatrização (Andrade e Silva, 2017; Sant'Anna-Santos et al., 2006a; 2006b; Silva et al., 2005a; 2005b). Além destes, essas espécies podem apresentar alterações fisiológicas como abscisão foliar, aumento na temperatura foliar, alterações nos teores de pigmentos, modificações nos parâmetros de trocas gasosas, diminuição da permeabilidade de membranas, alterações na fluorescência da clorofila A e mudanças na atividade das enzimas do sistema antioxidativo (Silva et al., 2005; Kuki et al., 2008; Dias et al., 2010; Liang e Wang, 2013; Hu et al., 2014; Ren et al., 2017).

A análise de alterações anatômicas foliares em plantas expostas a poluentes representa uma importante ferramenta na detecção de impactos, uma vez que antecedem as alterações visuais e morfológicas. E ainda, trabalhos que investigam os efeitos da chuva ácida em estruturas secretoras foliares, em especial as estruturas externas como os nectários foliares são escassos. Nectários são estruturas secretoras de néctar que é predominantemente constituído por açúcares (sacarose, glicose e frutose), embora carboidratos, mucilagem, íons minerais, aminoácidos, proteínas, vitaminas, lipídios, ácidos orgânicos e enzimas possam estar presentes de forma minoritária (Roy et al.,

2017). Quanto a anatomia, os nectários são formados por uma epiderme com ou sem tricomas, com um parênquima especializado subepidérmico. Esse tecido é composto por células pequenas e com paredes delgadas, e pode ou não ser vascularizado (Fahn, 1979).

A função reportada aos nectários foliares é a defesa contra herbívoros por meio de uma associação mutualística com formigas e outros insetos que ao se alimentar do néctar fornecem proteção a planta (Heil, 2008). Tal relação é utilizada como modelo nos estudos de evolução das relações mutualísticas planta-inseto (Trager et al., 2010). Portanto, impactos causados pela chuva ácida na estrutura dos nectários extraflorais bem como em sua secreção podem causar desequilíbrio nas relações ecológicas entre planta e inseto, assunto ainda pouco explorado na ciência.

*Cedrela fissilis* Vell., popularmente conhecida como “cedro”, “cedro-rosa” ou “acaiacá” é uma planta de porte arbóreo, pertencente à família Meliaceae. Suas folhas são compostas e possuem de 10 a 17 folíolos oblongos e opostos. A folha de *C. fissilis* apresenta nectários na face abaxial dos folíolos, na superfície da ráquis e no pecíolo (Paiva et al., 2007). Essa espécie é nativa da Mata Atlântica e possui ampla distribuição, estando presente em todas as regiões do Brasil (Flora do Brasil 2020), incluindo o PERD (Gonçalves e Lombardi, 2004). Devido à sua alta importância econômica, essa espécie vem sendo fortemente explorada pela indústria madeireira. A madeira de *Cedrela fissilis* possui alto valor comercial devido ao seu uso nobre em marcenaria, carpintaria, fabricação de instrumentos musicais, decoração de interiores, dentre outros (Rizzini, 1978). A exploração madeireira tem levado ao declínio de muitas populações, sendo essa espécie assim classificada como ameaçada de extinção (Martinelli e Moraes, 2013).

Deste modo, a hipótese a ser testada no presente trabalho é a de que *Cedrela fissilis* é uma espécie sensível a chuva ácida simulada. Para testar a hipótese, foram avaliadas alterações visuais, microscópicas e fisiológicas nas folhas, bem como alterações nos nectários foliares. Tais dados podem ser de grande importância na seleção de espécies bioindicadoras de poluição atmosférica, bem como no estabelecimento de parâmetros preditivos para a detecção de perturbações nas relações ecológicas das plantas.

## **2 – OBJETIVOS**

Investigar as alterações morfoanatômicas e fisiológicas de *C. fissilis* em resposta à chuva ácida simulada.

### **2.1 – Objetivos específicos**

- Avaliar as respostas morfoanatômicas, micromorfológicas e histoquímicas das folhas de *C. fissilis* expostas à chuva ácida simulada.
- Caracterizar morfoanatômica, micromorfológica e histoquimicamente os nectários extraflorais de *C. fissilis* expostos à chuva ácida simulada.
- Avaliar as respostas quanto às trocas gasosas, o teor de pigmentos e a atividade das enzimas do sistema antioxidativo de *C. fissilis* à chuva ácida simulada.

### **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – Obtenção e cultivo das plantas**

Mudas de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae), com aproximadamente 4 meses de idade foram obtidas no Instituto Estadual de Florestas (IEF) localizado no município de Viçosa, Minas Gerais e transferidas para a casa de vegetação localizada na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' 37" S 42° 52' 04" O). As mudas foram mantidas em vasos plásticos de 3,5 l preenchidos com substrato MogiFertil®. Foram adicionados 100 ml de solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) a cada 7 dias, sendo as plantas mantidas em casa de vegetação por aproximadamente 30 dias para aclimatação.

#### **3.2 – Aplicação da chuva ácida simulada**

A aplicação da chuva ácida foi realizada durante 19 dias consecutivos por volta das 10 da manhã, em 6 plantas. No décimo dia, ainda não foram observados sintomas visuais ou alterações em trocas gasosas, o que ocasionou o prolongamento do experimento por mais 9 dias. Antes e depois de cada aplicação, as plantas foram retiradas da casa de vegetação e foram expostas ao sol por aproximadamente 15 minutos para aclimatação. As plantas foram expostas a um spray contendo solução de ácido sulfúrico 1N adicionada a água destilada até que se obteve solução com pH 3.0. Este valor representa o mínimo registrado nas precipitações no Vale do Aço, região onde está localizado o Parque Estadual do Rio Doce (Castro et al, 1987). Foram aplicados 50 ml de solução na superfície foliar de cada planta utilizando-se um borrifador plástico manual. O controle foi realizado em 6 plantas que foram pulverizadas utilizando-se apenas água destilada.

#### **3.3 – Caracterização visual**

Diariamente, antes da aplicação dos tratamentos, as plantas foram fotografadas com o auxílio de uma câmera digital (Cyber-Shot DSC-W310, Sony Corporation, Japão) para a documentação dos sintomas visuais causados pela chuva ácida em *C. fissilis*.

As folhas foram classificadas de acordo com os danos visuais utilizando-se escala descrita por Silva et al. (2000) e modificada por Louback et al. (2016): sem danos (0% de dano), pouco danificada (menos de 30%), moderadamente danificada (30 a 50%), muito danificada (50 a 70%) e extremamente danificada (mais de 70% de dano foliar).

#### **3.4 – Caracterização anatômica e micromorfológica**

Para análises anatômicas, ao final do período de aplicação, folíolos com sintomas visuais foram coletados de folhas completamente expandidas do terceiro nó partindo do ápice. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, (adaptado de Karnovsky, 1965) seguido de desidratação em série etílica. Posteriormente, as amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) e seccionadas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA) com utilização de navalhas de vidro. Após a microtomia, as secções foram coradas com azul de toluidina (O'brien e Mccully, 1981) e as lâminas, montadas em permount (Permount, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA). As observações e o registro das imagens foram feitos em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com o sistema de captura de imagens (modelo Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha).

Para a análise micromorfológica, folíolos com sintomas visuais do terceiro nó a partir do ápice foram coletados ao final do experimento, fixados em glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato de sódio 0,1M (adaptado de Karnovsky, 1965), desidratados em série etílica e secos ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> (modelo CPD 030; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram fixadas em "stubs" e metalizadas com ouro (modelo Quorum Q150RS). Após a metalização, a documentação foi realizada utilizando-se Microscópio Eletrônico de Varredura acoplado com sistema de captura de imagens (modelo 1430 VP; LEO, Cambridge, England) localizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### **3.5 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar**

Folíolos com e sem sintomas visuais foram coletados em folhas localizadas a partir do terceiro nó a partir do ápice e fixados em formalina neutra tamponada (FNT) (Clark, 1981), seguido de desidratação em série etílica. Posteriormente, as amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) e seccionadas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA) com utilização de navalhas de vidro. Os cortes obtidos foram submetidos aos seguintes testes histoquímicos: Reação com ácido periódico - Reagente de Schiff (PAS) para a detecção de carboidratos totais (O'brien e Mccully, 1981); Vermelho de Rutênio (Johansen, 1940) para a detecção de pectinas;

Xilidine Ponceau (XP) (Vidal, 1970) para detecção de proteínas e Cloreto férrico (Johansen, 1940) para a detecção de compostos fenólicos não estruturais.

As observações e o registro das imagens foram feitos em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com o sistema de captura de imagens (modelo Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha) localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

### **3.6 – Caracterização anatômica, micromorfológica e histoquímica dos nectários extraflorais**

Folíolos localizados em folhas do terceiro nó a partir do ápice foram coletados, fixados em formalina neutra tamponada (FNT) (Clark, 1981), seguido de desidratação em série etílica. Posteriormente, as amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) e seccionadas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA) com utilização de navalhas de vidro. Foram obtidos cortes transversais da nervura principal e das nervuras de segunda ordem dos folíolos, regiões onde são encontrados os nectários (Paiva et al., 2007). Após a microtomia, as secções foram coradas com azul de toluidina (O'Brien e McCully, 1981) e as lâminas, montadas em permount para análise anatômica (Permount, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA). As observações e o registro das imagens foram feitos em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com o sistema de captura de imagens (modelo Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha).

Para a análise micromorfológica, folíolos foram coletados de folhas completamente expandidas do terceiro nó partindo do ápice, fixados em formalina neutra tamponada (FNT) (Clark, 1981) e desidratados em série etílica e secos ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> (modelo CPD 030; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram fixadas em "stubs" e metalizadas com ouro (modelo Quorum Q150RS). Após a metalização, a documentação foi realizada utilizando-se Microscópio Eletrônico de Varredura acoplado com sistema de captura de imagens (modelo 1430 VP; LEO, Cambridge, England).

Para análise histoquímica, os cortes foram submetidos aos seguintes testes: Reação com ácido periódico - Reagente de Schiff (PAS) para a detecção de carboidratos totais (O'Brien e McCully, 1981); Cloreto férrico (Johansen, 1940) para a detecção de compostos fenólicos não estruturais e Lugol (Johansen, 1940) para detecção de amido.

As lâminas foram montadas em água glicerinada e as observações e o registro das imagens foram feitos em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com o sistema de captura de imagens (modelo Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha).

### **3.7 – Avaliação de trocas gasosas**

A avaliação das trocas gasosas foi iniciada por volta das 7 horas da manhã, 24 horas após a última aplicação da solução ácida. A análise foi realizada em folhas completamente expandidas do 3º nó a partir do ápice, de todos os indivíduos do controle e do tratamento com chuva ácida.

Os parâmetros de trocas gasosas: taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gS), concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci), respiração (Rd) e transpiração (E) foram obtidos com o uso de um analisador portátil de gás a infravermelho IRGA (LCpro-SD ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK). A taxa de eficiência no uso da água (EUA) foi definida utilizando-se os valores obtidos através de A/gS, e para Eficiência da carboxilação da Rubisco, utilizou-se A/Ci.

### **3.8 – Teores de clorofila a, b e carotenoides**

Os teores de clorofila a, b e carotenoides foram quantificados utilizando-se o extrator dimetilsulfóxido (DMSO) (Wellburn, 1994). Três discos foliares foram obtidos de folhas coletadas a partir do 3º nó, contendo 5mm de diâmetro. Os discos foram imersos em 4ml de DMSO saturado com carbonato de cálcio. Os valores de absorbância do extrato foram obtidos após 24 horas utilizando-se espectrofotômetro (modelo Genesys 2 PC, Thermo Spectronic, Rochester, USA). Os valores estipulados para absorbância de clorofila a, b e carotenoides foram de, respectivamente, 663,2, 646,8 e 470 nm.

### **3.9 – Avaliação da atividade das enzimas do sistema antioxidativo**

Foram mensuradas as atividades das seguintes enzimas do sistema antioxidativo de *C. fissilis*: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX).

Amostras de 0,3 g de massa fresca de folhas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido, seguido da adição de 2,0 mL de meio de homogeneização constituído de HCl 0,1M contendo EDTA 1 mM (Anderson, 1985). Depois de filtrado através de quatro

camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000  $xg$  por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática, conforme Peixoto et al. (1999).

A atividade da SOD (E.C. 1.15.1.1) foi determinada pela adição de 50  $\mu$ L do extrato enzimático bruto a 5 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75  $\mu$ M, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2  $\mu$ M. A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual tempo, serviu de branco e foi subtraída da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

A atividade da CAT (E.C. 1.11.1.6) foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e  $H_2O_2$  12,5 mM (Havir e 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  $mol\ L^{-1}\ cm^{-1}$  (Anderson et al., 1995) e expresso em  $\mu$ moles de  $H_2O_2\ min^{-1}\ mg^{-1}$  proteína.

A atividade da POX (E.C. 1.11.1.7) foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47  $mM\ L^{-1}\ cm^{-1}$  (Chance e Maehley, 1955) e expressa em  $\mu$ moles de  $H_2O_2\ min^{-1}\ mg^{-1}$  proteína.

O teor de proteínas foi quantificado através do método de Bradford (1976). Para o preparo do reagente de Bradford, 50mg de Azul de Comassie foi dissolvido em 50ml de etanol e em seguida foram adicionados 100ml de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a 85%. Essa solução foi adicionada a 850ml de água, até se obter a dissolução completa do corante. O reagente foi estocado em frasco âmbar. Para preparo da solução padrão 1 de BSA (1mg BSA/ml) foram pesados 10 mg de BSA, que foram diluídos em 10 ml de água

deionizada. A solução padrão 2 foi preparada utilizando-se uma alíquota de 1ml da solução 1, que foi diluída em 10ml de água deionizada. A construção da curva padrão para proteínas totais foi realizada utilizando-se 6 diferentes alíquotas de BSA (0, 2, 4, 6, 3 e 10  $\mu\text{g}$ ), diluídas em concentrações proporcionais de solução padrão 2 de BSA (0, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{l}$ ). O volume de cada solução foi completado até 1ml com água deionizada, ao qual foram adicionados 1ml do Reagente de Bradford e foi feita a leitura a 595 nm. Para a determinação do teor de proteínas das amostras foram utilizados 100  $\mu\text{l}$  o extrato enzimático bruto, ao qual foi adicionado 1ml do Reagente de Bradford e a leitura foi feita a 595 nm. Os valores obtidos foram aplicados à curva padrão construída a partir das leituras realizadas com BSA.

### **3.10 – Análise estatística**

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição normal, foi realizado Teste T de Student ( $p < 0.05$ ). Para dados com distribuição não normal, foi realizado Teste de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). As análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

## **4 – RESULTADOS**

### **4.1 – Caracterização visual das folhas**

As folhas de *C. fissilis* expostas à chuva ácida simulada não apresentaram injúrias visuais acentuadas após a exposição (Fig.1 A-B). Quando analisadas em nível de folíolo, algumas folhas apresentaram pequenos pontos necróticos espalhados por diferentes regiões das folhas (Fig.1 C-F). Entretanto, as folhas analisadas foram classificadas como pouco danificadas (menos de 30% de dano).

### **4.2 – Caracterização anatômica e micromorfológica da lâmina foliar**

A folha de *C. fissilis* é dorsiventral, hipostomática e apresenta epiderme unisseriada. O mesófilo é formado por uma camada de parênquima paliçádico e de 3 a 4 camadas de parênquima lacunoso, com drusas e monocristais.

Nas regiões de ocorrência visual dos pontos necróticos, anatomicamente, foram verificados mesófilo compacto, com poucos espaços intercelulares e retração do protoplasto nas células epidérmicas. Com a progressão espacial da necrose, ocorreu rompimento das células da epiderme, hipertrofia de algumas células do parênquima lacunoso e posteriormente, das células do parênquima paliçádico e lacunoso, formaram grandes espaços, devido ao colapso de suas células. Ocorreu colapso do floema, que alterou a morfologia dos feixes vasculares (Fig. 2B-F).

Em microscopia eletrônica de varredura das amostras com sintomas visuais das plantas expostas à chuva ácida, quando comparadas às amostras do controle (Fig 3A, C, E e G), foram observadas células da epiderme da face adaxial com aspecto flácido (Fig. 3B); descamação das ceras epicuticulares (Fig. 3F e H) e rompimento das células epidérmicas, ocorrendo liberação de cristais e exposição do parênquima lacunoso (Fig. 3D).

As alterações observadas em microscopia de luz e eletrônica de varredura nas folhas das plantas expostas à chuva ácida não foram observadas nas plantas do controle.

### **4.3 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar**

As amostras da lâmina foliar de *C. fissilis* expostas à chuva ácida e as do tratamento controle apresentaram reação positiva para compostos fenólicos nas células parenquimáticas e na epiderme das duas faces da folha (Fig. 4C e D). No entanto, as células da epiderme da face adaxial do tratamento com chuva ácida apresentaram maior

intensidade de coloração (Fig. 4D). O mesmo ocorreu no teste para detecção de carboidratos totais (PAS), em que as células da epiderme da face adaxial das folhas do tratamento com chuva ácida apresentaram coloração mais intensa quando comparadas às folhas do controle (Fig. 4I e J).

Não houve diferenças entre os tratamentos nos testes para detecção de proteínas (XP) e pectinas (Vermelho de Rutênio), onde, em ambos, observa-se reação positiva nos cloroplastos e nas paredes celulares, respectivamente (Fig. 4E, F, G e H).

#### **4.4 – Caracterização anatômica, micromorfológica e histoquímica dos nectários extraflorais**

Os nectários extraflorais de *Cedrela fissilis* possuem dois morfotipos: achatados e elevados, com aproximadamente 180  $\mu\text{m}$  (Paiva et al., 2007). São estruturas isoladas do tecido vascular e o tecido secretor apresenta células pequenas e alongadas com citoplasma denso. A epiderme secretora é unisseriada com células compactadas e cutícula fina, com ausência de estômatos ou tricomas.

Nos nectários das plantas expostas à chuva ácida, quando comparados aos do controle (Fig. 6A – B) foram observados rompimento das células da epiderme secretora e retração de protoplasto nas células do parênquima nectarífero (Fig. 6C). Foram observadas também células da epiderme e do parênquima com aspecto flácido, além do acúmulo de compostos fenólicos (Fig. 6D). Em estágios mais avançados de dano, é possível observar rompimento de células do parênquima nectarífero, formando uma estrutura desorganizada de células mortas e colapsadas (Fig. 6E).

Em análises histoquímicas, tanto no controle quanto no tratamento, observou-se reação positiva para carboidratos (Fig. 6F) e compostos fenólicos (Fig. 6H) e negativa para amido (Fig. 6G).

Em microscopia eletrônica de varredura dos nectários expostos à chuva ácida, observou-se o aspecto flácido das células da epiderme secretora (Fig. 5D).

#### **4.5 – Avaliação de trocas gasosas**

As plantas expostas à chuva ácida simulada apresentaram maior taxa de transpiração foliar (E) do que as plantas do controle (Fig 7E), menor eficiência no uso da água (EUA) (Fig. 7F) e menor eficiência na carboxilação da Rubisco (Fig. 7G). Os demais parâmetros de trocas gasosas analisados, como fotossíntese líquida (A),

respiração ( $R_d$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e concentração interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ) não foram alterados com o tratamento de chuva ácida.

#### **4.6 – Teores de clorofila a, b e carotenoides**

As médias do teor de clorofila b encontrados apresentaram valores menores nas plantas do tratamento (Fig. 7). Já a média de carotenoides foi maior nas plantas expostas à chuva ácida (Fig. 7). As médias dos teores de clorofila a e clorofilas totais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos.

#### **4.7 – Avaliação da atividade das enzimas do sistema antioxidativo**

As médias obtidas para a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da peroxidase (POX) nas plantas do tratamento com chuva ácida foram maiores que nas plantas do tratamento controle; enquanto para a catalase (CAT), as plantas do controle apresentaram maior atividade enzimática (Fig. 8). No entanto, apenas os valores obtidos para superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) apresentaram diferença estatisticamente significativa.

## 5 – DISCUSSÃO

A chuva ácida simulada, mesmo em um curto período de aplicação, foi capaz de induzir alterações morfoanatômicas e fisiológicas nas folhas e nectários extraflorais de *Cedrela fissilis*.

A sintomatologia visual observada, que consiste em pontos necróticos distribuídos pela lâmina foliar, já foi relatada em trabalhos realizados com chuva ácida simulada (Silva et al., 2005a, b; Sant’Anna Santos et al, 2006; Andrade e Silva, 2016). Nesses trabalhos, espécies nativas de porte arbóreo apresentaram também baixo grau de injúria foliar (< 5%) em períodos exposição de 10 até 40 dias à solução ácida (pH 3.0). Isso indica que essas plantas apresentam diferentes estratégias de defesa, a estrutura morfoanatômica e mecanismos fisiológicos.

Os pontos necróticos encontrados visualmente nas folhas foram caracterizados microscopicamente por alteração no formato das células da epiderme em ambas as faces da folha, ruptura das células da epiderme e exposição do mesofilo ao ácido. Esta exposição provocou o colapso do mesofilo, reduzindo sua espessura. Sant’Anna Santos et al. (2006) relatou o aspecto plasmolisado das células da epiderme e o rompimento das células do mesofilo em *Gallesia integrifolia* após 10 dias de exposição à chuva ácida simulada (pH 3.0).

O rompimento das células do floema nas regiões necróticas pode ter ocasionado o acúmulo de fotoassimilados nessas regiões na forma de grãos de amido, como observado em análises histoquímicas pelo reagente de Schiff. Sant’Anna Santos et al. (2006) relataram, também, a presença de grãos de amido no tecido adjacente à necrose em *Spondias dulcis* exposta ao mesmo tratamento. O acúmulo de carboidratos por plantas é comum em situações de estresse hídrico, uma vez que os mesmos possuem papel importante no ajuste osmótico das células (Sourour et al., 2017). Além disso, Hwang et al. (2015) atribuíram o acúmulo de açúcares como defesa do sistema antioxidativo, uma vez que os mesmos podem atuar como reguladores nas reações enzimáticas do sistema.

A hipertrofia observada nas células do parênquima lacunoso neste trabalho, já foi relatada por Andrade e Silva (2016) em experimento realizado com chuva ácida simulada (pH 3.0) durante 10 dias em folhas totalmente expandidas de *Libidibia ferrea* var. *leiostachya*.

Foi possível observar descamação da cera epicuticular na epiderme abaxial das folhas expostas à chuva ácida simulada em microscopia eletrônica de varredura. Presume-se que, a descamação dessa camada facilita o contato da solução com as células epidérmicas, promovendo ruptura das mesmas e exposição das células parenquimáticas, que, por sua vez, também são colapsadas. Como demonstrado por Percy e Baker (1987), a chuva ácida simulada possui impacto na abundância, morfologia, composição e espessura das ceras epicuticulares de diferentes espécies. Esse padrão de necroses já foi relatado em plantas nativas expostas à chuva ácida simulada e também à chuva com flúor (Evans e Curry, 1979; Silva et al., 2005a, b; Sant'Anna Santos et al. 2007; Andrade e Silva, 2016).

Além da descamação da cera epicuticular na face abaxial, é possível observar também em microscopia eletrônica de varredura o aspecto flácido das células epidérmicas na face adaxial. Este dado corrobora a mudança no formato das células da epiderme adaxial observada em microscopia de luz. Em estudos realizados por Rodrigues et al. (2018) com chuva simulada contendo fluoreto de potássio durante 19 dias, *Sapindus saponaria* apresentou alterações similares na epiderme. O mesmo foi observado por Louback et al. (2016) em *Spondias dulcis* sob estresse por flúor, em condições de campo. Andrade e Silva (2016) também relataram a perda de turgor das células epidérmicas em *Paubrasilia echinata* e *Libidibia férrea* var. *leiostachya* expostas à chuva ácida durante 10 dias. Portanto, a perda de turgor das células epidérmicas pode estar associada à deposição de diferentes tipos de poluentes na parede periclinal externa das mesmas.

As folhas de *C. fissilis* possuem cera epicuticular do tipo lisa, sem ornamentações, o que pode estar relacionado com o baixo número de pontos necróticos encontrados. A "molhabilidade" da folha é definida pela afinidade da interface das folhas com fases sólidas, gasosas ou líquidas (Aliofkhazraei, 2015). Essa variável pode influenciar na deposição de poluentes como material particulado, ozônio e chuva ácida (Percy et al., 1992; Wang et al., 2013). Barthlott et al. (1998) afirmaram que a molhabilidade das folhas varia de acordo com a ultraestrutura das ceras epicuticulares. Em experimento realizado por Andrade e Silva (2016), apesar da maior molhabilidade, plantas com ceras epicuticulares "lisas", sem ornamentações, apresentaram danos foliares menores quando comparadas a plantas com ceras epicuticulares ornamentadas, com menor molhabilidade, quando expostas à chuva ácida simulada. Isso se deve, principalmente, à formação de grandes gotas de chuva que escorrem facilmente pela folha.

O teste com Cloreto Férrico realizados nas folhas de *C. fissilis* indicou a presença de compostos fenólicos na epiderme do controle e do tratamento. No entanto, a reação na epiderme da face adaxial das folhas do tratamento com chuva ácida foi mais intensa. Até o momento, não existem relatos na literatura da presença de fenólicos na epiderme de *C. fissilis*. Os compostos fenólicos são um grupo de metabólitos secundários produzidos pelas plantas e possuem alta atividade antioxidante (Balasundram et al., 2006; Kulbat, 2016). Chalker-Scott e Fuchigami (2018) afirmam que o teor destes compostos nas plantas pode ser modulado por diferentes tipos de perturbações, sendo considerado uma resposta generalizada ao estresse. Dessa forma, além de possuírem naturalmente esses compostos na epiderme abaxial, é provável que sua produção também nas células da epiderme adaxial seja uma estratégia de defesa contra o estresse oxidativo.

A Reação ao ácido periódico - Reagente de Schiff (PAS) para a detecção de carboidratos, neste estudo, apresentou maior intensidade nas células do mesofilo das plantas tratadas com chuva ácida, havendo acúmulo de estruturas semelhantes a grãos de amido. Além disso, para o mesmo teste, obteve-se reação positiva na epiderme adaxial das plantas tratadas com chuva ácida, o que não ocorreu nas plantas do controle. Sob estresse, os açúcares funcionam como reguladores osmóticos e atuam na manutenção da integridade de membranas (Sami et al., 2016). Trabalhos como o de Hwang et al. (2015) e Boriboonkaset et al. (2012) demonstram que altas concentrações de açúcares podem induzir a transcrição de enzimas do sistema antioxidativo, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) frente a diferentes tipos de estresse. Assim, pode-se associar o acúmulo de carboidratos na epiderme adaxial das plantas do tratamento como uma estratégia de redução do estresse oxidativo provocado pela chuva ácida simulada.

As alterações observadas na estrutura das células que compõem os nectários extraflorais em microscopia de luz e eletrônica de varredura foram parecidas com o que se observou na lâmina foliar. Houve perda da turgidez nas células da epiderme secretora, hipertrofia, retração de protoplasto e rompimento de células do parênquima nectarífero. Em estágios mais avançados de dano, é possível observar um arranjo extremamente desorganizado de células mortas, com colapso de toda a estrutura. Os nectários de *C. fissilis* possuem uma epiderme secretora constituída por células em um arranjo compacto e com uma cutícula fina, uma vez que sua secreção se dá através do rompimento dessa camada (Paiva et al., 2007). Dessa forma, o nectário pode ser uma estrutura ainda mais sensível

à chuva ácida simulada em relação ao restante da lâmina foliar, uma vez que o acesso desse poluente às células constituintes é facilitado devido à espessura da cutícula e ao rompimento natural da mesma.

Os nectários extraflorais de *C. fissilis* estão localizados na epiderme da face abaxial dos folíolos, ráquis e pecíolo. Nos folíolos, os mesmos ocorrem apenas na nervura mediana e em nervuras de segunda ordem (Paiva et al., 2007). O fato dessas estruturas manterem contato direto com o meio externo e possuírem estrutura proeminente pode as tornar extremamente sensíveis a poluentes como a chuva ácida.

A reação positiva para carboidratos nos nectários extraflorais de *C. fissilis* já foi relatada por Paiva et al. (2010) utilizando reativo de Fehling para detecção desses compostos. Os mesmos afirmaram que o parênquima nectarífero não possui substância de reserva, o que também foi observado nesse trabalho através da reação com Lugol. Entretanto, estruturas similares a grânulos foram observadas em nectários com alto grau de dano. A formação de grãos de amido pode ter sido resultado de alterações nas células da epiderme, o que minimiza ou inativa a sua capacidade secretora, fazendo com que as células do parênquima nectarífero armazenem os açúcares em forma de amido.

Assim como a lâmina foliar, as células que constituem o nectário extrafloral apresentaram reação positiva para compostos fenólicos. De acordo com Roy et al. (2017) aproximadamente 10% do néctar é composto por outros metabólitos como aminoácidos, vitaminas, alcaloides e compostos fenólicos. A composição e quantidade do néctar possui alta influência na especificidade nas relações planta-animal. Paiva et al. (2007) relatou a observação de formigas *Camponotus rufipes* nas folhas de *C. fissilis*. Além disso, Roy et al. (2017) afirmaram que a presença de metabólitos secundários no néctar pode estar relacionada à prevenção contra agentes exploradores do néctar.

As plantas do tratamento apresentaram uma redução de aproximadamente 17% nas taxas fotossintéticas em relação ao controle, o que é esperado devido ao estresse causado no aparato fotossintético dessas plantas. Entretanto, *C. fissilis*, provavelmente, apresenta estratégias de defesa que minimizam os efeitos danosos da chuva ácida simulada, como produção de compostos fenólicos, carotenoides e alta atividade das enzimas do sistema antioxidativo. Sabe-se que a manutenção das taxas fotossintéticas é uma resposta a diferentes tipos de estresse. De acordo com Darral (1989), plantas expostas à poluentes atmosféricos tendem a diminuir a sua taxa de fotossíntese líquida. No entanto, as plantas de *C. fissilis* expostas à chuva ácida simulada não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas às plantas do controle. Em

experimentos realizados por Qing et al. (2010), mudas de *Castanopsis sclerophylla* foram capazes de recuperar suas taxas fotossintéticas ao longo do tratamento com chuva ácida (pH 2,5) durante 3 meses. Reich et al. (1986) relataram que não houveram mudanças na taxa fotossintética e crescimento de *Acer saccharum* e *Quercus rubra* expostas ao spray ácido (pH 3) durante 10 semanas. A mesma resposta foi observada por Kuki et al. (2008) em *Schinus terebintifolius*, aplicando-se solução ácida (pH 3,0) durante 30 dias, o que pode indicar a presença de estratégias de tolerância a esse tipo de estresse. De acordo com a dinâmica do estresse sugerida por Lichtenthaler (1996), na "fase de resistência", fase que sucede o estresse, o mesmo é superado por meio de respostas direcionadas (restituição), que podem ser mais intensas do que o distúrbio inicial. Não se conhece o ponto crítico para indução da dinâmica do estresse em *C. fissilis*, sendo possível que as plantas analisadas estejam em qualquer estágio dessa dinâmica.

As plantas do tratamento com chuva ácida apresentaram cerca de 36% de aumento na condutância estomática, quando comparadas às plantas do controle. Como observado em microscopia eletrônica de varredura, parte das células da epiderme da folha se tornaram flácidas. Isso pode ter ocorrido nas células-guarda dos estômatos, acarretando na perda da capacidade de abertura e fechamento dos mesmos, causando alta significativa nas taxas de transpiração (E) e baixa na eficiência no uso da água. De acordo com Buckley (2019), a perda de turgor das células da epiderme, incluindo as células-guarda, promove maior grau de perda de água em plantas sob estresse hídrico. Borer et al. (2005) observaram um retardamento do fechamento estomático em mudas de *Picea rubens* expostas à chuva ácida simulada (pH 3,0) durante 12 semanas. Os mesmos atribuíram este retardo à acidificação do apoplasto, o que prejudica a regulação do pH intracelular, havendo impacto direto no movimento das células-guarda.

A eficiência na carboxilação da Rubisco foi significativamente reduzida nas plantas tratadas com a chuva ácida. Tal fato pode indicar alterações na estrutura dessa enzima ou mesmo a falta de substrato energético para a sua reintegração ao Ciclo de Calvin. Velikova et al. (1999), em uma única exposição de plantas de feijoeiro à chuva ácida simulada (pH 1,8) observaram um decréscimo significativo na eficiência máxima de carboxilação da Rubisco. Esses autores atribuíram este fato à inibição de algumas reações do ciclo de Calvin que dependem da regeneração de RuBP ao ciclo. Yang et al. (2010) observaram a mesma tendência em *Cucumis sativus* sob estresse por nitrato. Os autores atribuíram a limitação da cadeia transportadora de elétrons ao estresse hídrico

causado pelo nitrato nessas plantas, diminuindo a produção de NADPH e assim, limitando a regeneração de RuBP no ciclo de Calvin. O mesmo pode ter ocorrido nesse trabalho, uma vez que a eficiência no uso da água (EUA) foi comprometida no tratamento.

O teor de clorofila B foi significativamente menor nas plantas do tratamento. Tais dados são corroborados pelas baixas taxas fotossintéticas observadas para o tratamento que, embora não estatisticamente significativa, apresentou uma redução de 15%. Devido à sua estrutura instável, as moléculas de clorofila são facilmente degradadas (Streit, 2005). A Redução desses pigmentos pode estar associada à remoção do  $Mg^{+}$  das moléculas de clorofila pelo  $H^{+}$  proveniente da chuva ácida (Foster, 1990) ou pelo aumento da transpiração (Evans et al., 1997). A diminuição dos teores de clorofila A e B já foi relatada em diversos trabalhos realizados com respostas de plantas à chuva ácida (Neves et al., 2009; Dias et al., 2010; Kovacik et al., 2010; Odyhi e Bamidele, 2014). Siqueira-Silva et al. (2016) observou uma diminuição nos teores de clorofila A e B em *C. fissilis* quando exposta ao estresse por poeira de cimento, classificando-a como altamente sensível a esse tipo de estresse.

Nas plantas do tratamento com chuva ácida, observou-se aumento significativo do teor de carotenoides quando comparadas às plantas do tratamento controle. Os carotenoides são pigmentos acessórios presentes nas plantas e possuem importante papel na prevenção do estresse oxidativo (Havaux, 2013). De acordo com Barreiros et al. (2006), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) é a forma mais deletéria do oxigênio aos organismos vivos. O oxigênio singlete pode causar degradação de biomoléculas e agir como sinalizador para morte celular (Ramel et al., 2011). Os compostos naturais que mais reagem com essa forma são os carotenoides, devido às suas insaturações conjugadas. Portanto, a maior expressão desses compostos indica maior estresse oxidativo nas plantas afetadas pela chuva ácida. Além disso, os carotenoides têm papel importante na manutenção da integridade dos fotossistemas, uma vez que é capaz de dissipar o excesso de energia captado na forma de calor (Hashimoto et al., 2016). Uma vez afetadas pelo estresse causado pela chuva ácida, a intensidade luminosa pode ter se tornado um agravante para as plantas já estressadas. Dessa forma, a maior produção de compostos fenólicos pode estar relacionada com a proteção do aparato fotossintético de *C. fissilis*.

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as plantas do controle e do

tratamento. A peroxidase (POX), embora não significativa, mostrou-se mais ativa nas plantas tratadas com chuva ácida. O aumento da atividade da SOD em resposta à chuva ácida simulada já foi reportado em mudas de *Sophora tomentosa* por Kuki et al., 2008; em *Cucumis sativa* por Yu et al. (2012) e em *Betula pendula* por Koricheva et al. (1997). De acordo com Bowler et al. (1992), a SOD reage com radicais superóxidos formando  $H_2O_2$  e  $^1O_2$ , e é, provavelmente, a principal enzima no mecanismo de defesa contra estresse. A SOD está presente em todos os compartimentos intracelulares onde o estresse oxidativo pode ocorrer e a sua atividade é altamente regulada (Bowler, et al., 1994). Portanto, a sua atividade está altamente correlacionada com o estresse oxidativo induzido pela chuva ácida simulada em *C. fissilis*.

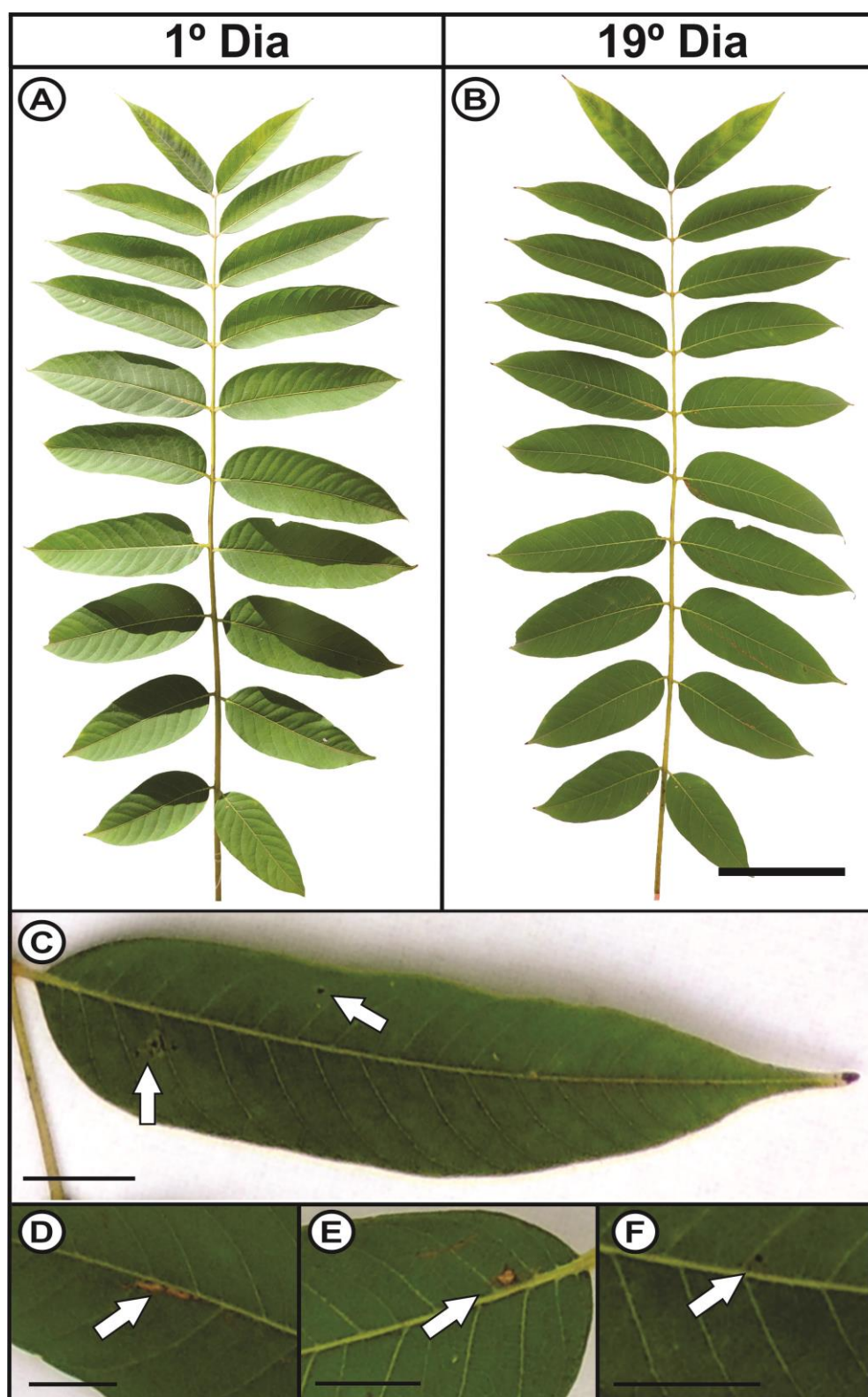
Nas mudas de *C. fissilis* expostas à chuva ácida, foi possível observar um decréscimo significativo na atividade da (CAT). A formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é bastante comum em situações de estresse em plantas, como salinidade, seca e exposição a poluentes atmosféricos (Foyer e Mullineaux, 2019). A catalase (CAT) atua na decomposição do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Resposta similar foi encontrada por Liu e Liu (2011) em *Camellia philippinense*. Em chuvas aplicadas com pH 3.0 e 2.0, a atividade da CAT foi reduzida significativamente ao longo de 15 dias de aplicação. *Cucumis sativus* expostas à chuva simulada com pH 2.0 também apresentaram menor atividade da CAT (Yu et al. 2002). De acordo com Wyrwicka e Sklodowska (2006), o decréscimo na atividade da CAT em resposta a estresses pode estar relacionado à sua compensação pela atividade da ascorbato peroxidase (APx), uma vez que as duas enzimas atuam sob o mesmo substrato. Este fato pode ter ocorrido em *C. fissilis*, entretanto, a atividade da APx não foi mensurada neste trabalho.

Portanto, *C. fissilis* apresentou respostas morfoanatômicas e fisiológicas em resposta à chuva ácida simulada. O resultado obtido indica que *C. fissilis* provavelmente apresenta mecanismos de resistência eficientes como a intensa atividade do sistema antioxidativo e defesas não enzimáticas, como a produção de compostos fenólicos. No entanto, os nectários extraflorais foram estruturalmente impactados pela aplicação da chuva ácida simulada, o que pode causar alterações nas relações ecológicas de *C. fissilis*.

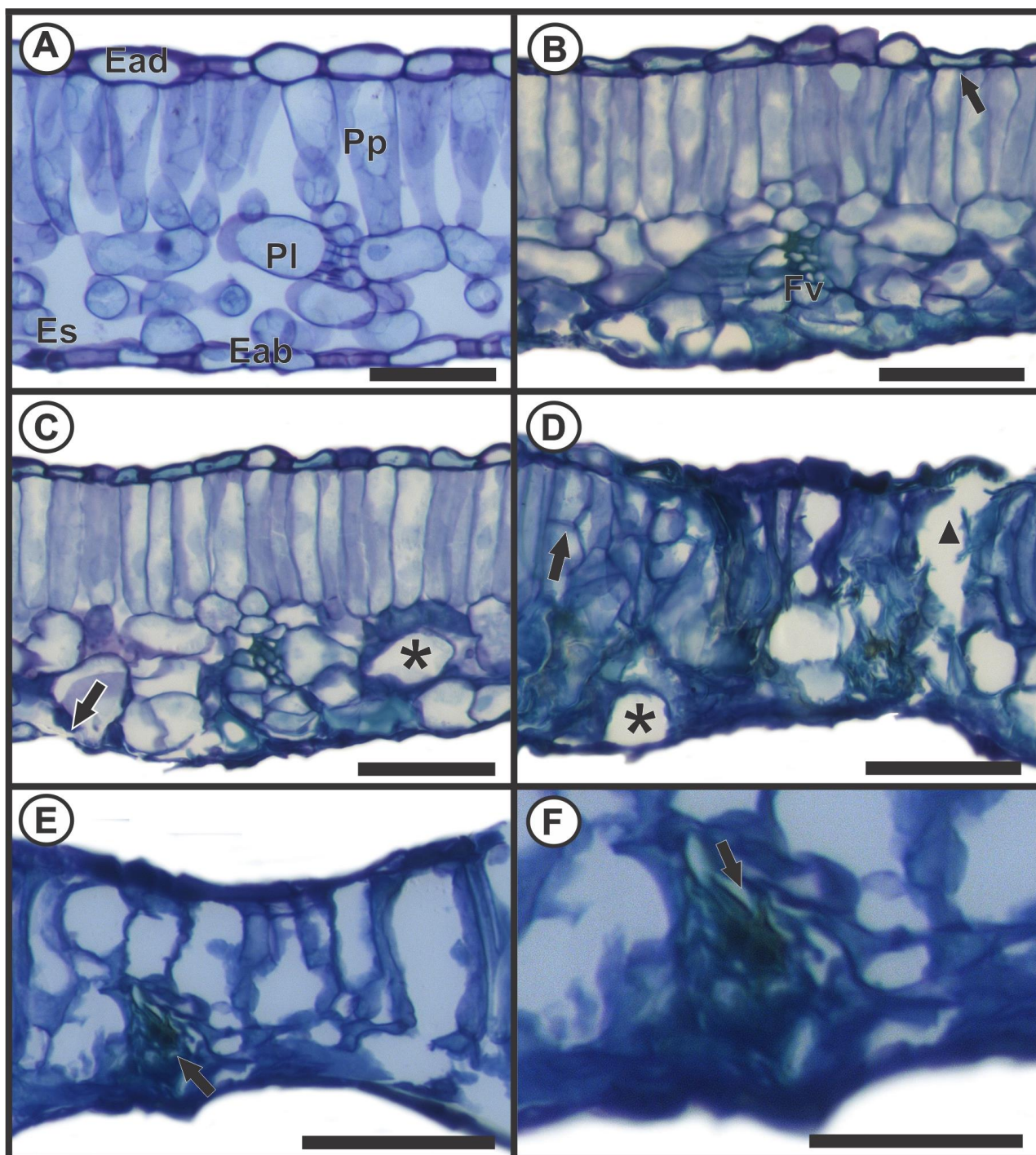
## 6 - CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho sugerem que *Cedrela fissilis* apresenta diferentes alterações morfoanatômicas e fisiológicas em resposta à chuva ácida simulada. Os danos visuais foram pequenos quando relacionados ao tamanho da folha, embora bastante severos em análise anatômica e micromorfológica. Além disso, foram detectados compostos fenólicos na epiderme dessas plantas, o que pode constituir uma defesa não enzimática da espécie ao estresse. Os nectários extraflorais apresentaram diferentes graus de alteração, podendo chegar a variação severa na estrutura, o que pode causar impacto direto na relação ecológica já estabelecida com formigas. As análises fisiológicas indicaram alterações significativas nas taxas de transpiração (E), eficiência no uso da água (EUA) e Eficiência na carboxilação da Rubisco. Houve também alteração no teor de clorofila B e carotenoides, além da atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nas plantas expostas à chuva ácida. Não foram observadas alterações nas taxas fotossintéticas e isso pode ser atribuído, principalmente, à atividade das enzimas do sistema antioxidativo, alto teor de carotenoides e também de compostos fenólicos. Desta forma, a espécie apresenta diferentes graus de dano nas diferentes variáveis avaliadas.

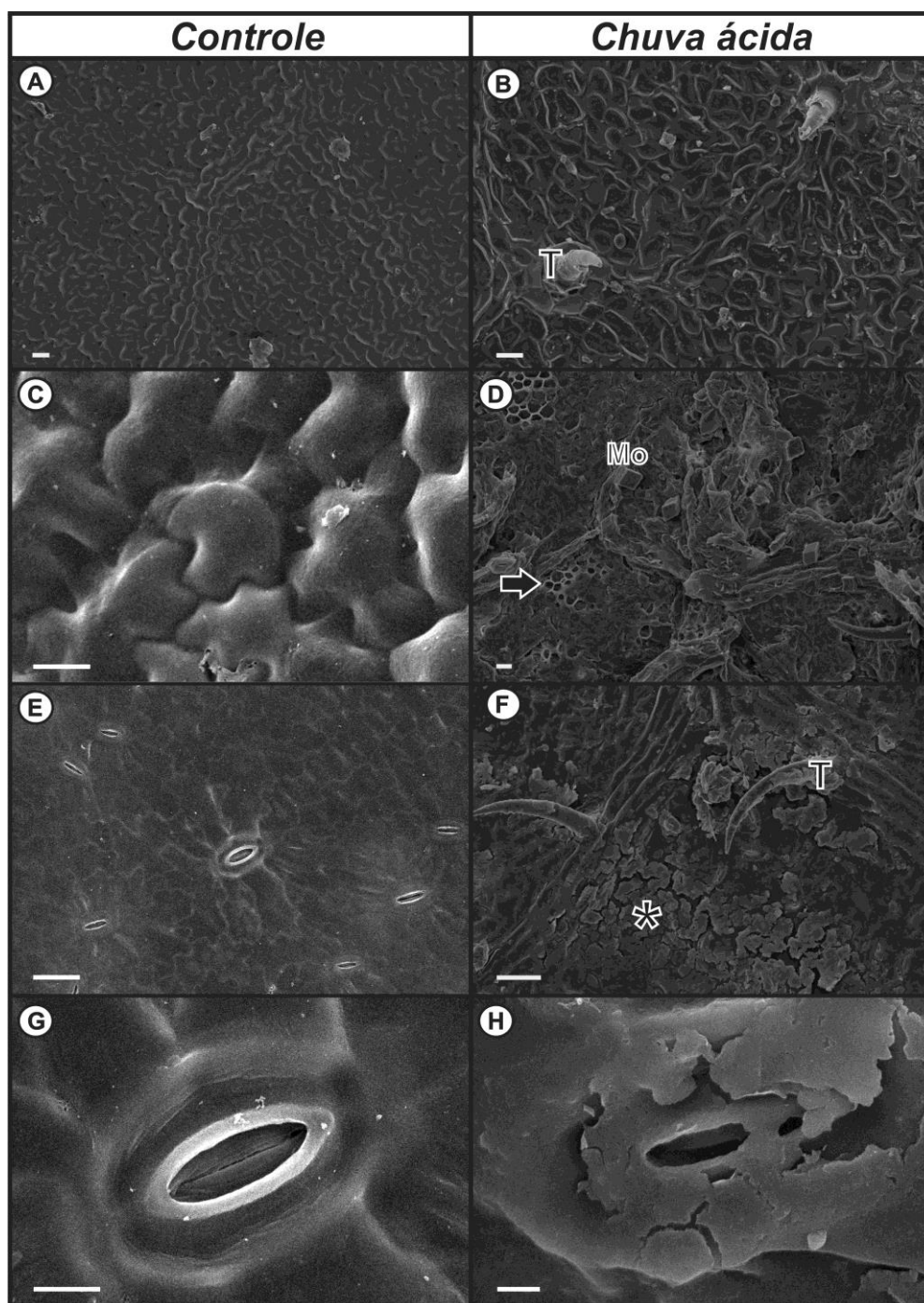
## 7 – ANEXOS



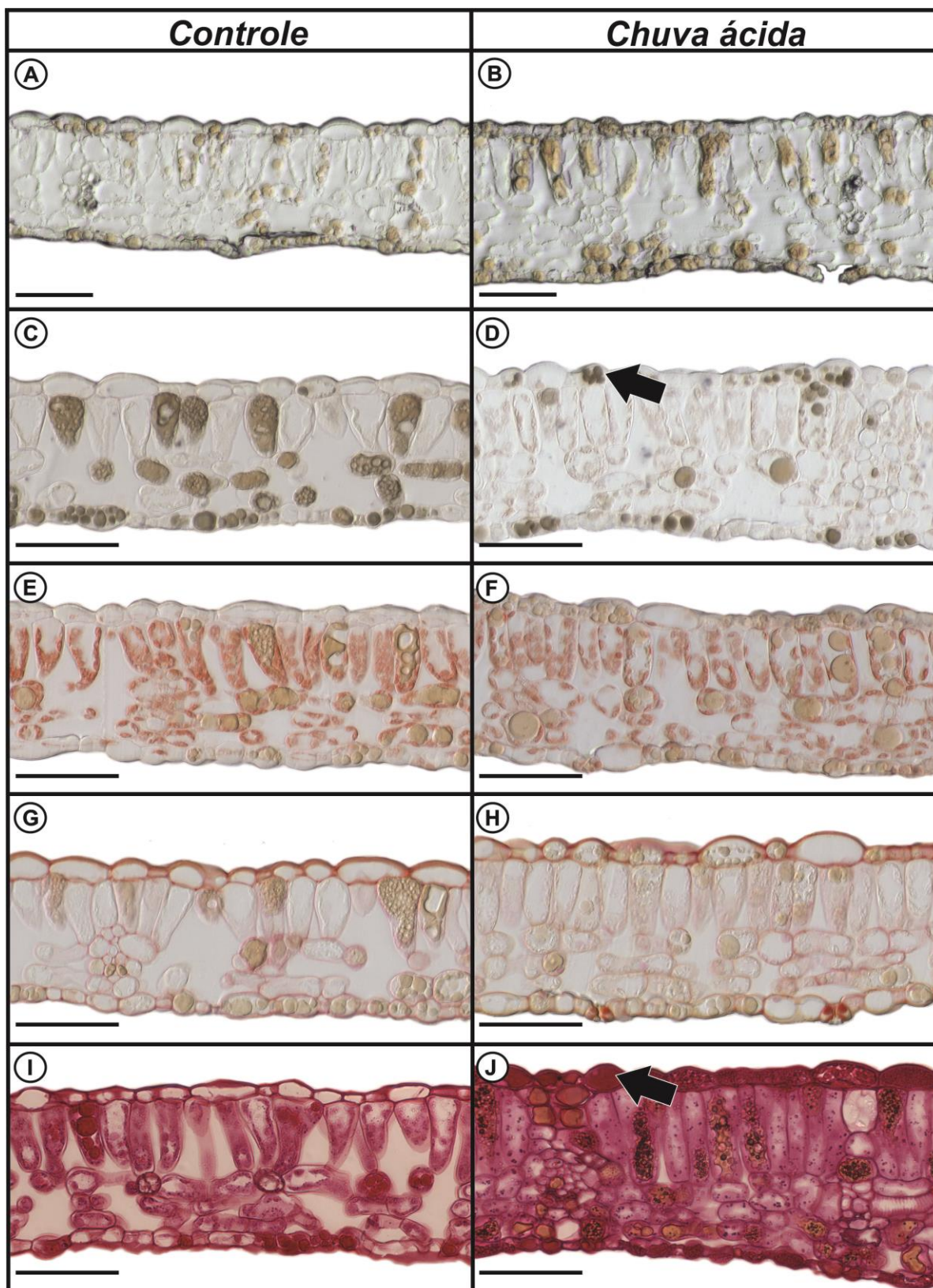
**Figura 1: Folhas de *Cedrela fissilis* expostas ao tratamento com chuva ácida simulada (pH 3,0) e tratamento controle (chuva simulada pH 6,0). A – folha antes da exposição; B- folha após o 19º dia de exposição; C-F – necroses encontradas nos folíolos (setas). Barras: A e B – 3cm; C-F – 1cm.**



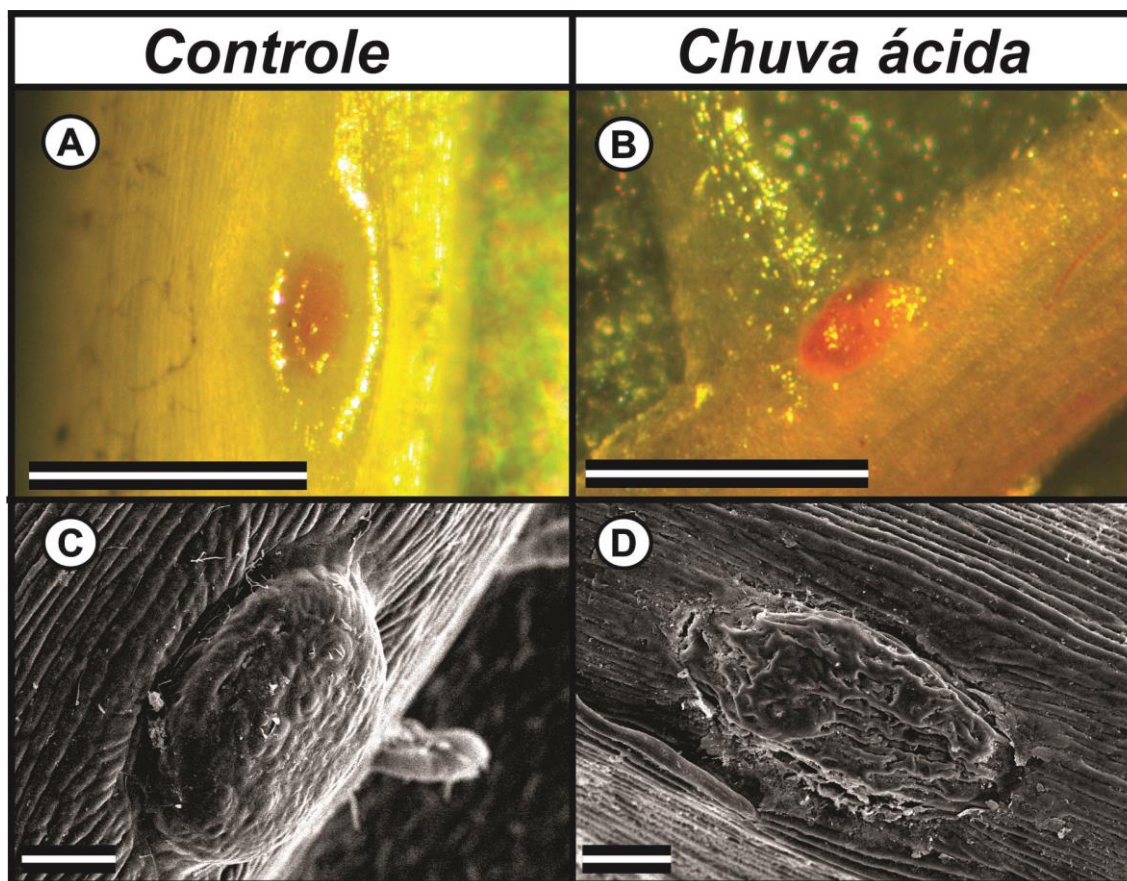
**Figura 2: Folhas de *Cedrela fissilis* expostas ao tratamento com chuva ácida simulada (pH 3,0) e tratamento controle (chuva simulada pH 6,0) (Cortes transversais) A: Controle; B - E: Progressão das necroses no tratamento com chuva ácida. B - Células da epiderme flácidas, com formato achatado (seta); C - Rompimento das células epidérmicas e descamação da parede periclinal externa (seta); hipertrofia das células do parênquima lacunoso; D - Alteração no padrão de divisão das células do parênquima paliádico (seta); hipertrofia celular (\*); formação de espaços através do rompimento das células parenquimáticas (▲); E - Floema colapsado, com alteração da morfologia do feixe vascular pela progressão da necrose (seta); F - Detalhe do feixe vascular com células da bainha colapsadas (seta). Legenda: Ep - Epiderme; Pp - Parênquima paliádico; Pl - Parênquima lacunoso; Es - Estômato; Fv - Feixe vascular. Barras: A - E: 50µm; F: 25 µm.**



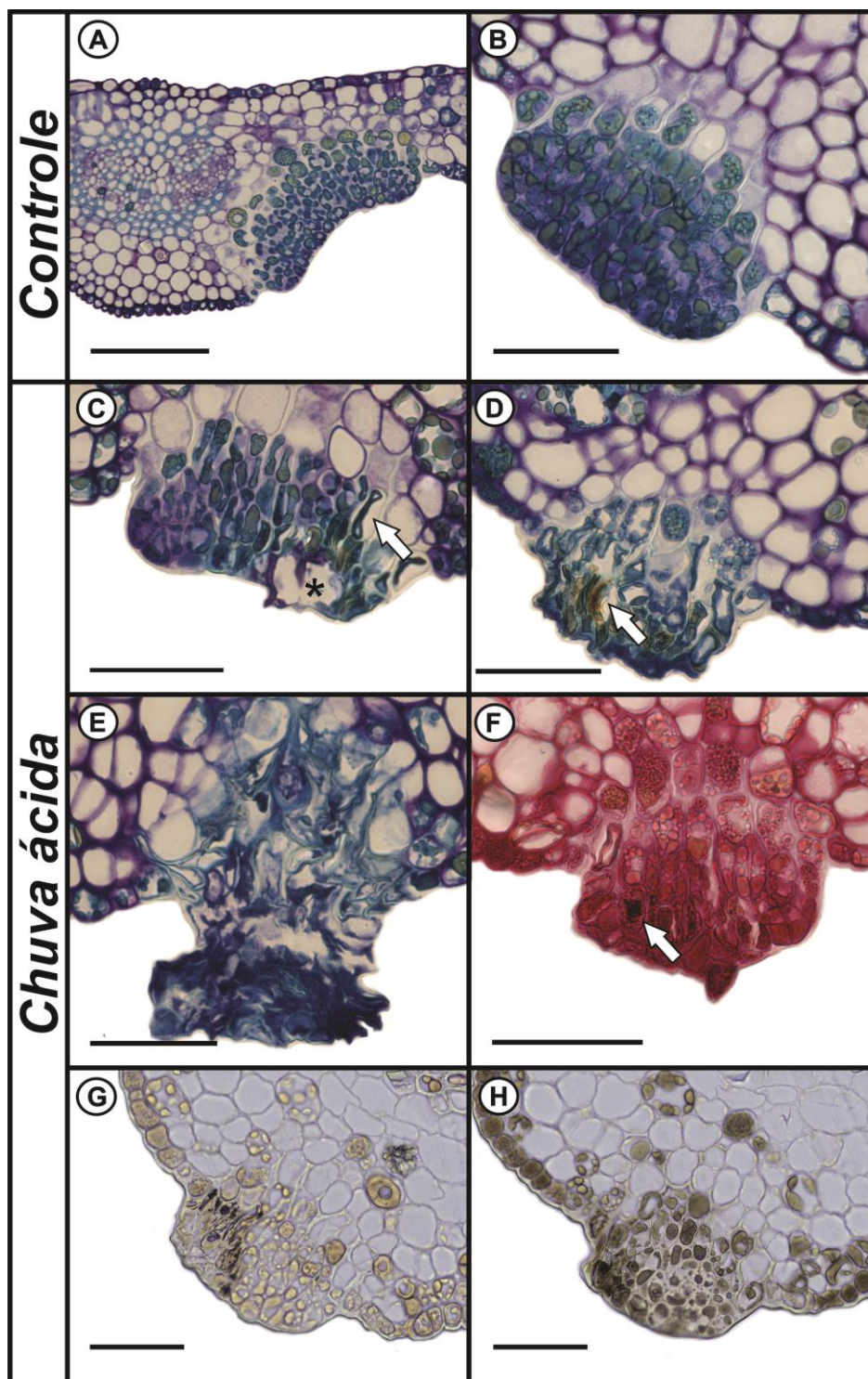
**Figura 3: Folhas de *Cedrela fissilis* expostas ao tratamento com chuva ácida simulada (pH 3,0) e tratamento controle (chuva simulada pH 6,0) (Microscopia Eletrônica de Varredura). A – C: Epiderme da face adaxial da folha; D – F: Epiderme da face abaxial da folha. A – Células epidérmicas com aspecto túrgido; B – Células epidérmicas com aspecto flácido; C – Detalhe da epiderme da face adaxial íntegra; D – Epiderme da face abaxial com descamação da cera epicuticular, exposição do parênquima e liberação de monocristais (seta); E – Epiderme da face abaxial com estômatos; F – Detalhe da epiderme da face abaxial com tricomas e descamação da cera epicuticular (\*); G – Estômato com células subsidiárias íntegras; H – Estômato e células subsidiárias com cera epicuticular descamada. Legenda: T – tricoma; Mo – monocristal. Barras: A – 20  $\mu\text{m}$ ; B – 20  $\mu\text{m}$ ; C – 10  $\mu\text{m}$ ; D – 10  $\mu\text{m}$ ; E – 20  $\mu\text{m}$ ; F – 30  $\mu\text{m}$ ; G – 5  $\mu\text{m}$ ; H – 2  $\mu\text{m}$ .**



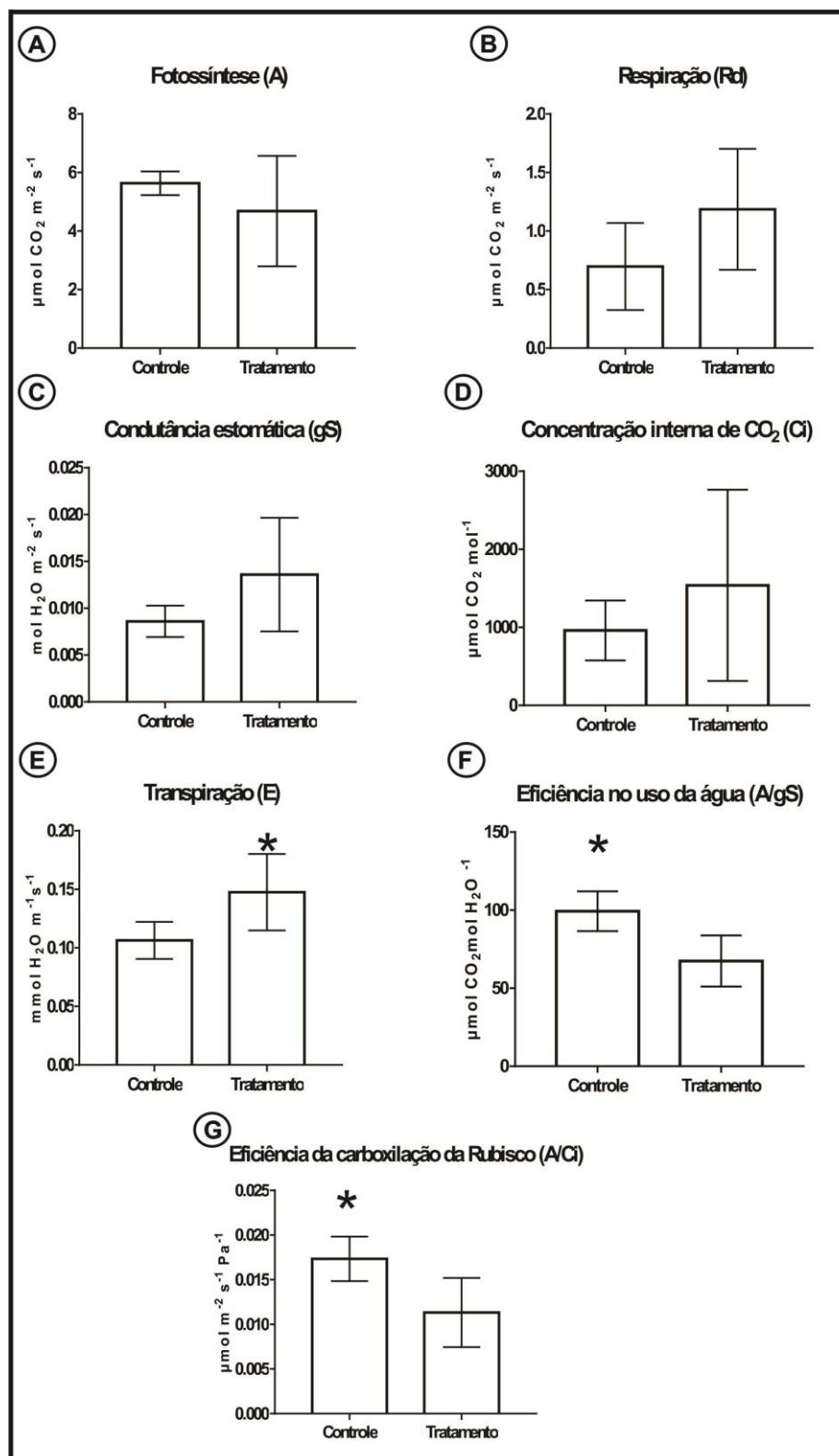
**Figura 4: Folhas de *Cedrela fissilis* expostas ao tratamento com chuva ácida simulada (pH 3,0) e tratamento controle (chuva simulada pH 6,0) (testes histoquímicos). A – B: Branco; C – D: Cloreto Férrico; Seta – compostos fenólicos na epiderme da face adaxial. E – F: Xilidine Ponceau (XP); G – H: Vermelho de Rutênio; I – J: PAS; Seta: carboidratos acumulados na epiderme da face adaxial.**



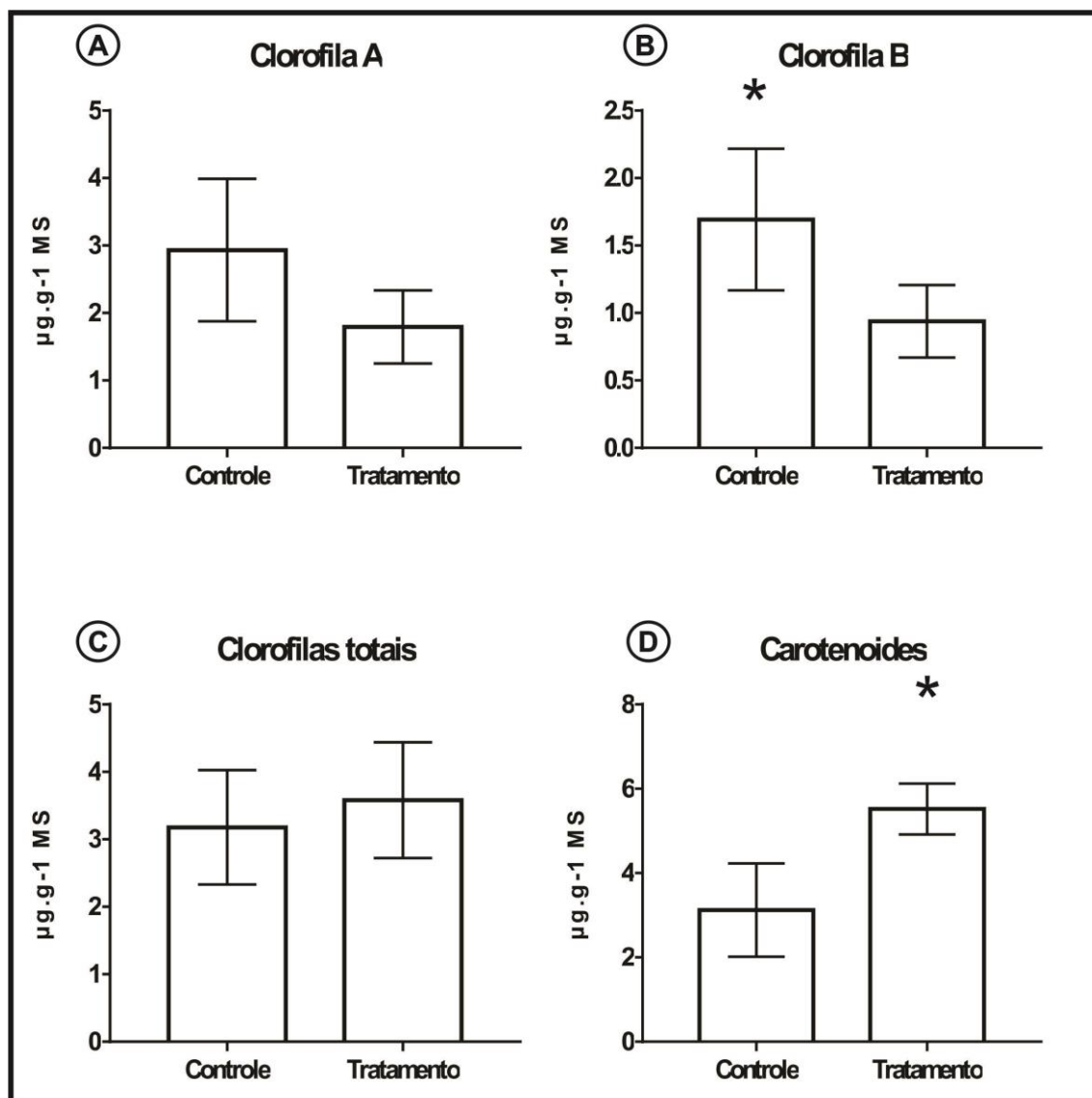
**Figura 5:** Nectários de *Cedrela fissilis* expostos ao tratamento com chuva ácida simulada (pH 3,0) e tratamento controle (chuva simulada pH 6,0) A – B: em lupa; C – D: em microscopia eletrônica de varredura. Barras: A – B: 0,5 mm; C – D: 50  $\mu$ m.



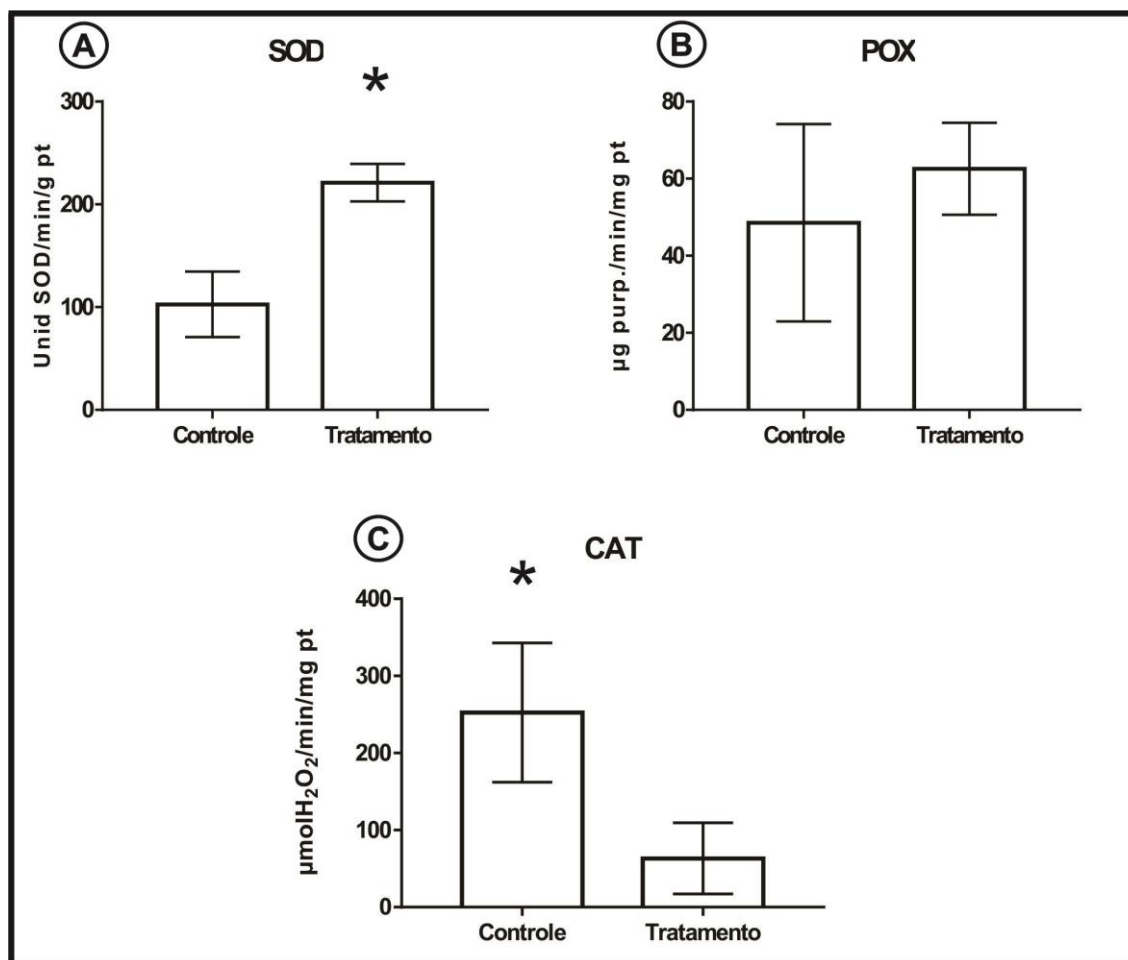
**Figura 6:** Nectários de *Cedrela fissilis* expostos ao tratamento com chuva ácida simulada (pH 3,0) e tratamento controle (chuva simulada pH 6,0) (Microscopia de luz e histoquímica). A – B: Controle; C – H: Tratamento. A – Localização dos nectários nos folíolos de *C. fissilis*; B – nectário com estrutura íntegra; C – nectário com células da epiderme secretora rompidas (\*) e retração de células do parênquima nectarífero (seta); D – Nectário com células da epiderme secretora flácidas e acúmulo de compostos fenólicos (seta); E – nectário com células constituintes rompidas e estrutura desorganizada; F – Nectário com reação positiva com PAS; acúmulo de grãos de amido (seta); G – Nectário com reação negativa com o Lugol; H – nectário com reação positiva com Cloreto Férrico. Barras: 50 μm.



**Figura 7:** Trocas gasosas em folhas de *C. fissilis* expostas ao tratamento com chuva ácida simulada (pH 3,0) e tratamento controle (chuva simulada pH 6,0). A – Fotossíntese (A); B – Respiração (Rd); C – Condutância estomática (gS); D – Concentração interna de  $\text{CO}_2$  (Ci); E – transpiração (E); F – Eficiência no uso da água (A/gS); G – Eficiência na carboxilação da Rubisco. \* - Medidas estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8:** Análises do teor de pigmentos em folhas de *C. fissilis* expostas ao tratamento com chuva ácida simulada (pH 3,0) e tratamento controle (chuva simulada pH 6,0). A – Clorofila A; B – Clorofila B; C – Clorofilas totais; D – Carotenoides. \* - Medidas estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9:** Análise da atividade enzimática do sistema antioxidativo em folhas de *C. fissilis* expostas ao tratamento com chuva ácida simulada (pH 3,0) e tratamento controle (chuva simulada pH 6,0). A – Superóxido dismutase (SOD); B – Peroxidase (POX); C – Catalase (CAT). \* - Medidas estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliofkhazraei, Mahmood (Ed.). **Wetting and Wettability**. BoD–Books on Demand, 2015.
- Anderson, M. D., Prasad, T. K.; Stewart, C. R. . Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant physiology**, v.109, n.4, p.1247-1257, 1995.
- Andrade, G. C.; Silva, L. C. Responses of tropical legumes from the Brazilian Atlantic Rainforest to simulated acid rain. **Protoplasma**, v.254, n.4, p.1639-1649, 2017.
- Andrade, G. C. **Leguminosas nativas da Mata Atlântica e seu potencial como biomonitoras de poluição aérea urbana**. Dissertação de Mestrado - Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2015.
- Anjos, T. B. O.; Louback, E.; Azevedo, A. A.; Silva, L. C. Sensibility of *Spondias purpurea* L.(Anacardiaceae) exposed to fluoride-simulated fog. **Ecological Indicators**, v. 90, p. 154-163, 2018.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food chemistry**, v.99, n.1, p.191-203, 2006.
- Barreiros, A. L. B. S; David, J. M.; David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- Bashkin, V. N.; Radojevic, M. Acid rain and its mitigation in Asia. **International journal of environmental studies**, v. 60, n. 3, p. 205-214, 2003.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- Bhering, L. L. Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.17, n.2, p.187–190, 2017.
- Brostein, J. L.; Alarcón, R.; Geber, M. The evolution of plant–insect mutualisms. **New Phytologist**, v. 172, n. 3, p. 412-428, 2006.
- Brundrett, M. C.; Kendrick, B.; Peterson, C. A. Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. **Biotechnic & Histochemistry**, v.66, p.111-116, 1991.

- Borer, C. H.; Schaberg, P. G.; Dehayes, D. H. Acidic mist reduces foliar membrane-associated calcium and impairs stomatal responsiveness in red spruce. **Tree Physiology**, v. 25, n. 6, p. 673-680, 2005.
- Boriboonkaset, T.; Theerawitaya, C.; Pichakum, A.; Cha-um, S.; Takabe, T.; Kirdmanee, C. Expression levels of some starch metabolism related genes in flag leaf of two contrasting rice genotypes exposed to salt stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 11, p. 1579, 2012.
- Bowler, C.; Van Montagu, M; Inze, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual review of plant biology**, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.
- Bowler, C.; Van Camp, W.; Van Montagu, M.; Inze, D.; Asada, K. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.13, n.3, p.199-218, 1994.
- Bradford, M. M. A rapid and Sensitive Method fo the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- Buckley, T. N. How do stomata respond to water status? **New Phytologist**, v. 224, n. 1, p. 21-36, 2019.
- Burns, D. A.; Aherne, J.; Gay, D. A.; Lehmann, C. M. . Acid rain and its environmental effects: Recent scientific advances. **Atmospheric Environment**, v.146, p.1-4, 2016.
- Carneiro, R. M. A. **Bioindicadores vegetais de poluição atmosférica: uma contribuição para a saúde da comunidade**. Dissertação de Mestrado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2004.
- Castro, P. S.; Ribeiro, J. C.; Ribeiro, G. A.; Soares, V. P.; Barros, N. F.; Gomes, L. C. L.; Valente, O. F. Estudos preliminares sobre a química da precipitação na região industrial do Vale do Rio Doce—MG. **SIF/IBDF**: Viçosa, Brazil, 1987.
- Chalker-Scott, L.; Fuchigami, L. H. The role of phenolic compounds in plant stress responses. **Low temperature stress physiology in crops**. CRC Press, p.67-80, 2018.
- Chance, B.; Maehly, A. C. Assay of catalases and peroxidases, v.136, 1955.
- Chaves, M. M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.
- Clark, G. **Staining procedures**. Baltimore, Williams & Wilkins, 4<sup>a</sup> edição, 512p, 1981.
- Figueiredo, A. C. S.; Barroso, J. M. G.; Pedro, L. M. G.; Ascensão, L. Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos. **Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal**. Primeira Edição, 2007.

- Darral, N. M. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 12, n. 1, p. 1-30, 1989.
- Dias, B. B.; Leite, M. D. L.; Farago, P. V.; Oliveira, A. V. D.; Beruski, G. C. Ação do enxofre em chuva ácida simulada sobre parâmetros morfofisiológicos de *Phaseolus vulgaris* L.(Fabaceae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, n.3, p.433-439, 2010.
- Evans, L. S.; Curry, T. M. Differential responses of plant foliage to simulated acid rain. **American Journal of Botany**, v. 66, n. 8, p. 953-962, 1979.
- Evans, L. S.; Gmor, N. F.; Dacosta, F. Leaf surface and histological perturbations of leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus* after exposure to simulated acid rain. **American Journal of Botany**, v.4, p.304-313, 1997.
- Fahn, A. **Secretory tissues in plants**. Academic Press., 1979.
- Figueiredo, D. V. Influence of Calcareous Soil Particulates on Acid Rain: Belo Horizonte Metropolitan Region, Brazil. **Ambio**, v. 28, n. 6, p. 514-8, 1999.
- Foyer, C. H; Mullineaux, P.M. **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. CRC press, 2019.
- Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica – período 2016–2017. **Fundação SOS Mata Atlântica & INPE**, São Paulo, 2014.
- Foster, J. R. Influence of pH and plant nutrients status on ion fluxes between tomato plants and simulated acid mists. **New Phytologist**, v.116, p.475-485, 1990.
- Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15411>>. Acesso em: 11 Dez. 2019.
- Genty, B.; Briantais, J. M.; Baker, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989.
- Gonçalves, M.; Lombardi, J. A. Adições ao conhecimento da composição florística de dois remanescentes de Mata Atlântica do sudeste de Minas Gerais, Brasil. **Nova**, v.1, p.2, 2004.
- Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**. v.59, p.309, 1977.
- Havaux, M.. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. **The Plant Journal**, v. 79, n. 4, p. 597-606, 2014.

- Havir, E. A.; Mchale, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**. v.84, p.450-455, 1987.
- Heil, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, v.178, n.1, p.41-61, 2008.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. The waterculture method for growing plants without soil. **Berkeley: California Agricultural Experiment Station**, p.32, 1950.
- Hu, H.; Wang, L.; Liao, C.; Fan, C.; Zhou, Q.; Huang, X. Combined effects of lead and acid rain on photosynthesis in soybean seedlings. **Biological trace element research**, v. 161, n. 1, p. 136-142, 2014.
- Huang, Y. W.; Zhou, Z. Q.; Yang, H. X.; Wei, C. X.; Wan, Y. Y.; Wang, X. J.; Bai, J. G. Glucose application protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves through modifying antioxidant enzyme activity. **Biologia plantarum**, v.59, n.1, p.131-138, 2015.
- Hutchinson, T. C.; Havas, M. Effects of acid precipitation on terrestrial ecosystems. **Springer Science & Business Media**, v.4, 2012.
- Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.ief.mg.gov.br/component/content/195?task=view>>. Acesso em: 21 mar. 2019.
- Johansen, D. A. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc.; London, 1940. Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. v27, p.137-138, 1965.
- Kar, M.; Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.
- Koricheva, J.; Roy, S.; Vranjic, J. A.; Haukioja, E.; Hughes, P. R.; Hänninen, O. Antioxidant responses to simulated acid rain and heavy metal deposition in birch seedlings. **Environmental Pollution**, v.95, n.2, p.249-258, 1997.
- Kováčik, J.; Klejdus, B.; Bačkor, M.; Štork, F.; Hedbavny, J. Physiological responses of root-less epiphytic plants to acid rain. **Ecotoxicology**, v.20, n.2, p.348-357, 2011.
- Kubalt, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnology and Food Sciences**, v.80, n.2, p.97-108, 2016.
- Kuki, K. N.; Oliva, M. A.; Pereira, E. G.; Costa, A. C.; Cambraia, J. Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. **Science of the total environment**, v.403, p.207-214, 2008.

- Larcher, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Rima, São Carlos, 2000.
- Larsen, T.; Lydersen, E.; Tang, D. G.; He, Y.; Gao, J. X.; Liu, H. Y.; Duan, L.; Seip, H. M.; Vogt, R. D.; Mulder, J.; Shao, M.; Wang, Y. H.; Shang, H.; Zhang, X. S.; Solberg, S.; Aas, W.; Okland, T.; Eilertsen, O.; Angell, V.; Liu, Q. R.; Zhao, D. W.; Xiang, R. J.; Xiao, J. S.; and Luo, J. H. Acid rain in China, **Environmental Science and Technology**, v. 40, p.418–425, 2006.
- Lichtenthaler, H. K. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. **Journal of plant physiology**, v. 148, n. 1-2, p. 4-14, 1996.
- Louback, E.; Pereira, T. A. R.; Souza, S. R.; Oliveira, J. A.; Silva, L. C. Vegetation damage in the vicinity of an aluminum smelter in Brazil. **Ecological indicators**, v.67, p.193-203, 2016.
- Sourour, A.; Afef, O.; Mounir, R.; Mongi, B. Y. A review: morphological, physiological, biochemical and molecular plant responses to water deficit stress. **The International Journal Of Engineering And Science**, v.6, p.1-4, 2017.
- Leal, T. F. M.; Fontenele, A. P. G.; Pedrotti, J. J.; Fornaro, A. Composição Iônica Majoritária de Águas de Chuva na Região Central de São Paulo. **Química Nova**, v.27, n.6, p. 855-61, 2004.
- Li, C.; McLinden, C.; Fioletov, V.; Krotkov, N.; Carn, S.; Joiner, J.; Streets, D.; He, H.; Ren, X.; Li, Z.; Dickerson, R. R. India is overtaking China as the world's largest emitter of anthropogenic sulfur dioxide. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2017.
- Liang, C.; Wang, W. Antioxidant response of soybean seedlings to joint stress of lanthanum and acid rain. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8182-8191, 2013.
- Lichtenthaler, H. K. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. **Journal of plant physiology**, v. 148, n. 1-2, p. 4-14, 1996.
- Likens, G. E.; Bormann, F. H.; Johnson, N. M. Acid rain. **Environment: Science and Policy for Sustainable Development**, v.14, n.2, p.33-40., 1972.
- Liu, E.; Liu, C.. Effects of simulated acid rain on the antioxidative system in *Cinnamomum philippinense* seedlings. **Water, air, & soil pollution**, v. 215, n. 1-4, p. 127-135, 2011.
- Louback, E.; Pereira, T. A. R.; Souza, S. R.; Oliveira, J. A.; Silva, L. C. Vegetation damage in the vicinity of an aluminum smelter in Brazil. **Ecological indicators**, v.67, p.193-203, 2016.
- Martinelli, G.; Moraes, M. A. Livro vermelho da flora do Brasil, 2013.

- Martins, R. S.; Abessa, D. M.; Fornaro, A.; Borrely, S. I. Rainwater toxicity and contamination study from São Paulo Metropolitan Region, Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v.186, n.2, p.1183-1194, 2014.
- Mello, W. Z. Precipitation Chemistry in the Coast of the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Pollution**, v.114, p. 235-42, 2001.
- Mirlean, N.; Vanz, A.; Baisch, P. R. M. Níveis e origem da acidificação das chuvas na região do Rio Grande, RS. **Química Nova**, v. 23, p. 590, 2000.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Da Fonseca, G. A.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, n.6772, p.853, 2000.
- Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p.867-880, 1981.
- Neves, N. R.; Oliva, M. A.; da Cruz Centeno, D.; Costa, A. C., Ribas, R. F.; Pereira, E. G. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: potential use in environmental risk assessment. **Science of the total environment**, v.407, n.12, p.3740-3745, 2009.
- O'Brien, T. P.; McCully, M. E. The study of plant structure principles and select methods. **Melbourne: TermarcaphiPty**, 1981.
- Odiyi, B. O.; Bamidele, J. F. Effects of simulated acid rain on growth and yield of *Cassava Manihot esculenta* (Crantz). **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 1, p. 96, 2014.
- Paiva, É. A. S.; Buono, R. A.; & Delgado, M. N. Distribution and structural aspects of extrafloral nectaries in *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v.202, n.6, p.455-461, 2007.
- Peixoto, P. H. P.; Cambraia, J.; Sant'ana, R.; Mosquim, R. R.; Moreira, M. A. Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.11 p.137-143, 1999.
- Percy, K. E.; Baker, E. A. Effects of simulated acid rain on production, morphology and composition of epicuticular wax and on cuticular membrane development. **New Phytologist**, v. 107, n. 3, p. 577-589, 1987.
- Percy, K. E.; Jensen, K. F.; Mcquattie, C. J. Effects of ozone and acidic fog on red spruce needle epicuticular wax production, chemical composition, cuticular membrane ultrastructure and needle wettability. **New Phytologist**, v. 122, n. 1, p. 71-80, 1992.

- Ramel, F.; Birtic, S.; Ginies, C.; Soubigou-Taconnat, L.; Triantaphylidès, C.; Havaux, M. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.14, p.5535-5540, 2012.
- Reich, P. B.; Schoettle, A. W.; Amudson, R. G. Effects of O<sub>3</sub> and acidic rain on photosynthesis and growth in sugar maple and northern red oak seedlings. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 40, n. 1, p. 1-15, 1986.
- Ren, X.; Zhu, J.; Liu, H.; Xu, X.; Liang, C. Response of antioxidative system in rice (*Oryza sativa*) leaves to simulated acid rain stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 851-856, 2018.
- Rizzini, C. T. **Plantas do Brasil: Árvores e madeiras úteis do Brasil; Manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgard Blücher, 1978.
- Roy, R.; Schmitt, A. J.; Thomas, J. B.; Carter, C. J. Nectar biology: from molecules to ecosystems. **Plant Science**, v. 262, p. 148-164, 2017.
- Sami, F.; Yusuf, M.; Faizan, M.; Faraz, A.; Hayat, S. Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.109, p.54-61, 2016.
- Sant'Anna-Santos, B. F.; Silva, L. C.; Azevedo, A. A.; Araujo, J. M.; Alves, E. F.; Silva, E. A. M.; Aguiar, R. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany**, v.58, n.1-3, p.158-168, 2006.
- Sant'Anna-Santos, B. F.; Silva, L. C.; Azevedo, A. A.; Aguiar, R. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L.(Rubiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.2, p.313-321, 2006.
- Scudeller, V. V. A Tribo Bignonieae Spreng. (Bignoniaceae) no Parque Estadual do Rio Doce - MG. UFV. Dissertação de Mestrado, 213p, 1997.
- Silva, D. R. **Efeitos da poluição atmosférica de Ipatinga-MG sobre *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) com ênfase nos nectários extraflorais**. Dissertação de Mestrado - Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2015.
- Silva, L. C., Azevedo, A. A., Silva, E. A. M.; Oliva, M. A. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.4, p.385-393, 2000.

- Silva, L. C.; Azevedo, A. A.; Silva, E. D.; Oliva, M. A.; Gicheru, P. T.; Gachene, C. K. K.; Mbuvi, J. P. Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). **Australian Journal of Botany**, v.53, n.8, p.789-796, 2005.
- Silva, L. C.; Oliva, M. A.; Azevedo, A. A.; Araújo, J. M.; Aguiar, R. M. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. **Water, air, and soil pollution**, v.168, n.1-4, p.129-143, 2005.
- Sheng, N.; Tang, U. W. The first official city ranking by air quality in China—a review and analysis. **Cities**, v. 51, p. 139-149, 2016.
- Siqueira-Silva, A. I.; Pereira, E. G.; Modolo, L. V.; Lemos-Filho, J. P.; Paiva, E. A. S. Impact of cement dust pollution on *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae): A potential bioindicator species. *Chemosphere*, v.158, p.56-65, 2016.
- Streit, N. M.; Canterle, L. P.; Canto, M. W.; Hecktheuer, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 748-755, 2005.
- Trager, M. D.; Bhotika, S.; Hostetler, J. A.; Andrade, G. V.; Rodriguez-Cabal, M.A.; McKeon, C.S.; Osenberg, C. W.; Bolker, B. M. Benefits for plants in ant-plant protective mutualisms: a meta-analysis. **Plos One**, v.5, n.12, 2010.
- Velikova, V.; Tsonev, T.; Yordanov, I. Light and CO<sub>2</sub> responses of photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in bean plants after simulated acid rain. *Physiologia Plantarum*, v.107, n.1, p.77-83, 1999.
- Veloso, H. P.; Rangel Filho, A. L. R.; Lima, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. **IBGE**. Rio de Janeiro, 1991.
- Vidal, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochimie**, v.15, p.289-296, 1970.
- Vieira-Filho, Ma. S.; Lehmann, C.; Fornaro, A. Influence of local sources and topography on air quality and rainwater composition in Cubatão and São Paulo, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 101, p. 200-208, 2015.
- Wang, H.; Shi, H.; Yangyang, L.; Yu, Y.; Zangh, J. Seasonal variations in leaf capturing of particulate matter, surface wettability and micromorphology in urban tree species. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 7, n. 4, p. 579-588, 2013.

- Wellburn, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**. v.144, p.307-313, 1994.
- Wondyfraw, M. Mechanisms and effects of acid rain on environment. **Journal of Earth Science & Climatic Change**, v.5, n.6, p.1, 2014.
- Wyrwicka, A.; Sklodowska, M. Influence of repeated acid rain treatment on antioxidative enzyme activities and on lipid peroxidation in cucumber leaves. *Environmental and Experimental Botany*, v.56, p.198–204, 2006.
- Yang, X.; Wang, X.; Wei, M. Response of photosynthesis in the leaves of cucumber seedlings to light intensity and CO<sub>2</sub> concentration under nitrate stress. **Turkish Journal of Botany**, v. 34, n. 4, p. 303-310, 2010.
- Yu, J. Q.; Ye, S.; F.;Huang, L. F. Effects of simulated acid precipitation on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzymes in *Cucumis sativus*. **L.Photosynthetica**. v.40, n.3, p.331–335, 2002.