

THIAGO PEREIRA PIRES

EFEITOS DO FLÚOR SOBRE A FOTOSSÍNTESE E ESTRUTURA FOLIAR DE  
*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (ASTERACEAE)

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*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

THIAGO PEREIRA PIRES

EFEITOS DO FLÚOR SOBRE A FOTOSSÍNTESE E ESTRUTURA FOLIAR DE  
*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (ASTERACEAE)

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: 02 de julho de 2010

---

Dr<sup>a</sup>. Kacilda Naomi Kuki  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Aristéa Alves Azevedo  
(UFV) (Co-Orientador)

---

Prof. Eduardo Gusmão Pereira

---

Prof. Juraci Alves Oliveira

---

Prof. Marco Antônio Oliva Cano  
(Orientador)

“Queremos o amor como pré-requisito para o sucesso nos outros setores, quando, na verdade, o amor espera primeiro você ser feliz para só então surgir, sem mascaras e sem fantasia. É esta a condição. É pegar ou largar. Para quem acha que isso é chantagem, arrisco-me a sair em defesa do amor: ser feliz é uma exigência razoável, e não é tarefa tão complicada. Felizes são aqueles que aprendem a administrar seus conflitos, que aceitam suas oscilações de humor, que dão o melhor de si e não se autflagelam por causa dos erros que cometem. Felicidade é serenidade. Não tem nada a ver com piscinas, carros, altos salários e muito menos com príncipes encantados. O amor é o prêmio para quem relaxa.”

Martha Medeiros

*Aos meus pais Fatima Soares e Hamilto Araújo  
pelo exemplo de vida, apoio, incentivo e confiança,*

*Dedico*

*Aos meus irmãos Frederico, Matheus, Rodrigo e Marcela,*

*Ofereço*

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de realização do curso e desse trabalho, e por alguns dos melhores anos de minha vida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro fundamental para realização desse trabalho.

Ao Prof. Marco Antônio Oliva Cano, pela grande generosidade em todos os momentos, pela confiança, pela compreensão, paciência, orientação, incentivo em buscar o “novo”, exemplo de dedicação a ciência, respeito e forma clara de mostrar a “beleza” e a importância da Ecofisiologia Vegetal.

Aos Co-Orientadores Dr<sup>a</sup> Kacilda Naomi Kuki e Prof<sup>a</sup>. Aristéa Alves Azevedo, pelas dicas preciosas, pela compreensão, confiança, apoio, amizade, recepção sempre sorridente, orientação no desenvolvimento desse e de outros trabalhos e pelas críticas acerca desse estudo.

Aos professores Eduardo Gusmão e Juraci Alves pela amizade, pelas sugestões, críticas e contribuições valiosas acerca desse estudo.

Aos meus grandes amigos da UCP – Unidade de Crescimento de Plantas do DBV, Alice Godoy, Letícia Nalon, Caroline Muller, Letícia dos Anjos, Eduardo Gusmão, Clenilso Sehnen e Patrícia Mendes pelo exemplo de vida, pelas contribuições técnicas e científicas, pelo convívio harmonioso e muito descontraído e especialmente pela amizade marcada por momentos de sorrisos e lágrimas.

Aos pesquisadores e amigos da Pós-graduação em Botânica, Vanessa Terra, Valdneia Casagrande, Amanda Soares, Josiene Rossini, Vinícius Kuster, Lucimara Souza pelas valiosas informações científicas, pela amizade e pelos momentos de descontração, pelo convívio e carinho.

Aos pesquisadores e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, pelas valiosas informações científicas, auxílio nos trabalhos anatômicos, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários, Rogério Gomide, Ângelo e João Bosco pelo profissionalismo que tanto facilitou a realização desse e de outros trabalhos, pela atenção e pela amizade.

Aos melhores amigos conquistados em viçosa, Welington Clarindo, Juliano Lino, Douglas Ribeiro, Cláudio Cesar, Júlio Cesar, Vanessa Terra e Amanda Soares amigos que facilitaram minha estada, pelo apoio, amizade, momentos inesquecíveis e contribuições científicas e emocionais inigualáveis, amigos para toda a vida.

A Dr<sup>a</sup> Sylvia Meyer pelos ensinamentos, oportunidades, amizade e por mostrar a beleza fascinante da botânica, assim como todos os amigos do CETEC.

A todos os professores, especialmente a Karen Paglia e Adriano Paglia pelos valiosos ensinamentos que contribuíram enormemente para a minha formação, pela amizade e pelo exemplo de dedicação a docência e aulas de botânica e evolução fantásticas.

A Dr<sup>a</sup> Beth pelo exemplo de pesquisadora e amigos da EMBRAPA pelos ensinamentos e oportunidades.

A minha mãe Fatima Pereira e meu irmão Matheus Soares pelo apoio, carinho, reconhecimento, respeito, dedicação e exemplo de vida.

A meu pai Hamilton Araújo, sua mulher Maria de Fatima e meus irmãos Frederico Pires e Rodrigo Alves pela generosidade em financiar meus estudos, possibilitando meu crescimento profissional e pessoal, obrigado ainda pelo apoio nos momentos difíceis e exemplo de vida.

A Marcela Carraro, minha irmã por opção, pelos momentos fantásticos, amizade, dedicação, compartilhamento, carinho apoio e incondicional.

Ao Guilherme Simiqueli pela dedicação, apoio, amizade, cuidado, companheirismo e amor.

A todos os familiares, especialmente tias Sandra, Paulinha, Helma, Gracinha e Socorro pelo apoio nos momentos de dificuldade, ensinamentos, e amor dedicados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

# Sumário

<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Símbolos e Abreviaturas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>x</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xii</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivo</b> .....	<b>3</b>
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>4</b>
Material Vegetal.....	4
Nevoeiro Simulado de Flúor.....	5
Quantificação do Teor de Flúor .....	6
Avaliação das Trocas Gasosas.....	6
Determinação das Variáveis da Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....	7
Imagem da Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....	7
Quantificação do Teor de Pigmentos .....	9
Avaliação de Danos Celulares .....	9
Determinação de Ca e Mg .....	10
Avaliação Anatômica .....	11
Análise dos Dados.....	11
<b>Resultados</b> .....	<b>12</b>
Teor de Flúor na Matéria Seca.....	12
Efeitos Macroscópicos da Toxidez por Flúor .....	14
Conteúdo de Pigmentos Fotossintéticos .....	16
Permeabilidade de Membrana e Acúmulo de MDA .....	17
Trocas Gasosas.....	18
Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....	20
Imagem da Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....	23
Análise de Cálcio e Magnésio em Folhas de Candeia .....	31
Efeito do Flúor Sobre a Estrutura Foliar .....	32
<b>Discussão</b> .....	<b>38</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>50</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>51</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Área de amostragem escolhida no limbo foliar para a captura da fluorescência de imagem da clorofila a .....	8
<b>Figura 2</b> - Teor médio de flúor na matéria seca, após 55 dias de exposição ao flúor, em folhas adultas (FA) e folhas novas (FN).....	12
<b>Figura 3</b> - Médias do teor de flúor na matéria seca de FN e FA em função do tempo de experimento, em dias de exposição.....	13
<b>Figura 4</b> - Desenvolvimento gradual da necrose em decorrência do tratamento contendo flúor em FN de candeia .....	14
<b>Figura 5</b> - Desenvolvimento vegetal entre plantas do controle e expostas ao flúor .....	15
<b>Figura 6</b> - Teor de clorofila a (A), b (B), carotenóides (C) e razão Clorofila a/b (D) em folhas adultas (FA) e folhas novas (FN) de candeia submetida ao nevoeiro simulada com ou sem flúor.....	16
<b>Figura 7</b> - Permeabilidade relativa de membrana (A) e acúmulo de dialdeído malônico após 55 dias de chuva simulada em folhas adultas (FA) e folhas novas (FN) de candeia.....	17
<b>Figura 8</b> - Taxa de assimilação líquida de CO <sub>2</sub> (A) em função da concentração de flúor no tecido vegetal a cada época de experimento .....	18
<b>Figura 9</b> - Taxa de assimilação líquida de CO <sub>2</sub> (A) (A), condutância estomática (B), Ci/Ca (C) e a transpiração (D) durante todo o período experimental em folha adulta (FA) .....	19
<b>Figura 10</b> - Taxa fotossintética (A), condutância estomática (B), Ci/Ca (C) e a transpiração (D) entre 30 e 55 dias de período experimental em folha nova (FN) .....	20
<b>Figura 11</b> - Variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila a em folha adulta (FA), em todo o período experimental.....	21
<b>Figura 12</b> - Variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila a em folha nova (FN), nos últimos trinta dias de experimento .....	22

<b>Figura 13</b> - Razão $F_v/F_m$ no controle, folha adulta (FA) e folha nova (FN) de candeia, demonstrado em escalas de cores .....	24
<b>Figura 14</b> - $F_0$ ou fluorescência mínima no controle, em folha adulta (FA) e folha nova (FN) de candeia, demonstrado em escalas de cores.....	25
<b>Figura 15</b> - ETR ou taxa linear de transporte de elétrons no controle, em folha adulta (FA) e folha nova (FN) de candeia demonstrado em escalas de cores .....	26
<b>Figura 16</b> - Rendimento quântico efetivo do PSII no controle, em folha adulta (FA) e folha nova (FN) de candeia demonstrado em escalas de cores .....	27
<b>Figura 17</b> - Rendimento quântico da dissipação regulada de energia no controle, em folha adulta (FA) e folha nova (FN) de candeia demonstrado em escalas de cores .....	28
<b>Figura 18</b> - Rendimento quântico da dissipação não regulada de energia no controle, em folha adulta (FA) e folha nova (FN) de candeia demonstrado em escalas de cores .....	29
<b>Figura 19</b> - Fração dos centros de reação do PSII oxidados (qL) no controle, em folha adulta (FA) e folha nova (FN) de candeia demonstrado em escalas de cores .....	30
<b>Figura 20</b> - Conteúdo de cálcio e magnésio na matéria seca de FN e FA, tratadas ou não com flúor ao final do período experimental.....	31
<b>Figura 21</b> - Cortes transversais de FN, em aumento de 4X, após sessenta dias de experimento .....	34
<b>Figura 22</b> - Cortes transversais de FN de candeia ao termino do período experimental .....	35
<b>Figura 23</b> - Seqüência de cortes transversais de FA e FN de candeia ao termino do período experimental .....	36
<b>Figura 24</b> - Seqüência de cortes transversais de FA e FN de candeia ao termino do período experimental avaliados sob luz polarizada .....	37

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

$A$	Taxa de Assimilação Fotossintética Líquida
AOI	Área de interesse
$C_a$	Concentração Atmosférica de $CO_2$
$C_i$	Concentração de $CO_2$ nos Espaços Intercelulares
DMSO	Dimetilsulfóxido
$E$	Taxa de Transpiração
ETR	Taxa Linear de Transporte de Elétrons no PSII
$F_0$	Fluorescência mínima da folha após adaptação ao escuro
FA	Folhas totalmente expandidas desde o início do período experimental
FN	Folhas que se desenvolveram durante o período experimental
$F_m$	Fluorescência máxima
$F_v/F_m$	Medida de máximo potencial no rendimento quântico do PSII
$q_L$	Fração dos centros de reação do PSII que estão oxidados
$g_s$	Condutância estomática ao vapor de água
HF	Ácido fluorídrico
PSII	Fotossistema II
$Q_A$	Quinona A
$\phi_{II}$	Rendimento quântico efetivo do fluxo linear de elétrons no PSII
$\phi_{NPQ}$	Rendimento quântico de dissipação regulada de energia não-fotoquímica no PSII
$\phi_{NO}$	Rendimento quântico da dissipação não-regulada de energia não-fotoquímica no PSII

## Resumo

PIRES, Thiago Pereira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010. **Efeitos do flúor sobre a fotossíntese e estrutura foliar de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (ASTERACEAE)**. Orientador: Marco Antonio Oliva Cano. Co-orientadores: Kacilda Naomi Kuki e Aristéa Alves Azevedo.

Este estudo teve como objetivo de avaliar a tolerância e os efeitos do fluoreto sobre a fisiologia e anatomia, de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mcleish). Para isso, folhas desenvolvidas durante o período experimental (FN) e folhas completamente expandidas ao início do experimento (FA), foram diariamente submetidas a nevoeiro simulado com concentração de  $45\text{mg L}^{-1}$  de flúor por 55 dias. Foram avaliados ao longo do período experimental, as trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e o teor de flúor nas folhas. Ao final do período experimental foram avaliados a fluorescência da clorofila *a*, permeabilidade de membrana, peroxidação de lipídeos, conteúdo de cálcio, magnésio e anatomia foliar de candeia. O teor de flúor no tecido vegetal foi cerca de 70 vezes maior que o verificado no controle. O desenvolvimento das plantas expostas ao flúor e os primórdios foliares de todos os ramos, e grande parte das FN, foram severamente afetados. Houve desenvolvimento de necrose marginal das FN. Após 35 dias de experimento, o crescimento caulinar foi interrompido, devido a desidratação do meristema apical. A concentração de pigmentos fotossintéticos, permeabilidade de membrana e peroxidação de lipídeos não sofreram alterações na comparação entre folhas tratadas com flúor e o controle, assim como entre FN e FA. A fluorescência da clorofila *a* e a fotossíntese líquida de FN e FA expostas ao flúor, avaliada na porção não necrosada do limbo foliar, foi estatisticamente igual aos valores mensurados nas plantas controle. As imagens da fluorescência da clorofila *a* mostraram alterações nos parâmetros  $F_v/F_m$ ,  $F_0$ , ETR,  $\phi_{II}$ ,  $\phi_{NPQ}$ ,  $\phi_{NO}$  e  $q_L$  apenas na porção marginal do limbo foliar. Alterações na anatomia das folhas de candeia tratadas com flúor, ficaram evidentes após o término do período experimental, tanto em FN como em FA. Em FN houve desestruturação do mesofilo, na porção aparentemente sadia. Constatou-se que FN tratadas com flúor apresentaram menores teores de cálcio quando comparadas com FN do controle. Alterações anatômicas, como colapso de células do parênquima paliádico e das

células guarda foram as principais alterações das FA expostas ao flúor. O flúor pode ter interferido na fixação do cálcio nas células de FN expostas a esse poluente. Com base nos resultados e nas condições experimentais, Candeia se mostrou fortemente tolerante a altas concentrações de flúor em seu tecido foliar.

## Abstract

PIRES, Thiago Pereira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2010. **Fluorine effects on the *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (ASTERACEAE) photosynthesis and foliar structure.** Adviser: Marco Antonio Oliva Cano. Co-Advisers: Kacilda Naomi Kuki and Aristéa Alves Azevedo.

This study was conducted in order to analyze the tolerance and fluoride effects on the leaf physiology and anatomy of *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish. In this sense, plants were daily treated with simulated mist of  $45\text{mg L}^{-1}$  fluoride or deionized water mist (control) for 55 days. The leaves developed during the experimental period (new leafs – NL) and the completely expanded leaves at the begging the experiments (old leafs – OL) were exposed and evaluated. The gas exchange, *a* chlorophyll fluorescence and fluoride concentration in the leaves were measured during the experimental exposure to the simulated mist. After this period, chlorophyll *a* fluorescence, membrane permeability, lipids peroxidation, anatomy, calcium and magnesium leaf concentration were analyzed. The fluoride concentration was approximate 70 times higher than control plants. The development of the *E. erythropappus* plants, NL and leaf primordium of all the branches was hindered due to fluoride exposure. A marginal necrosis was observed in the NL. After 35 days of exposure to the mists, the stem development, in all plants treated with fluoride, was delayed due to shoot apical meristem dehydration. No significant differences were found on the photosynthetic pigments, membrane permeability and lipids peroxidation between fluoride-treated leaves and control. The net photosynthesis and chlorophyll *a* fluorescence did not differ between the control and fluoride-treated leaves. However, these results can be partially attributed to the sampling areas of the fluoride treated leaves, which were those morphologically normal. Alterations on  $F_v/F_m$ ,  $F_0$ , ETR,  $\Phi_{II}$ ,  $\Phi_{NPQ}$ ,  $\Phi_{NO}$  e  $q_L$  fluorescence parameters were only observed in the leaf marginal portion of fluoride-treated leaves. Leaf anatomy changes of the NL and OL of *E. erythropappus* fluoride-treated were observed at the end of the experimental period. The central portion of the NL leaves showed intense mesophyll collapse. These same plants also showed smaller calcium concentration comparing to control plants. Cellular alterations, as palisade

parenchyma and guard-cell destruction, were visualized in the OL fluoride-treated. The results suggested that the fluoride can interfere in the calcium fixation of the cells, especially of NL fluoride-treated. Based on these results and experimental conditions, the *E. erythropappus* showed stronger tolerance to the higher concentrations of fluoride presented in the leaf tissue

## Introdução

Diversas atividades industriais como o processo de produção do alumínio, fertilizantes fosfatados, cerâmicas, vidros e a queima de carvão produzem fluoreto como efluente atmosférico. O fluoreto é lançado à atmosfera na forma de ácido fluorídrico (HF), tetrafluoreto de silício (SiF<sub>4</sub>) ou material particulado (Klumpp *et al.* 1996) e se deposita no solo e na vegetação como deposição seca ou dissolvido na água da chuva (Arndt *et al.* 1995). O HF é um poderoso agente fitotóxico, níveis tão baixos quanto 0,8 µg m<sup>-3</sup> no ar podem causar injúrias em plantas sensíveis. Essa concentração é cerca de 10 a 1000 vezes menor do que a de outros poluentes atmosféricos (SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, NO e NO<sub>2</sub>) capazes de causar efeitos similares em plantas (Moraes 2000; Weinstein 2003; Swaminathan 2003).

A principal via de entrada do flúor gasoso nas plantas é a folha, sendo também este órgão o mais afetado pela ação deste poluente (Fornasiero 2001). Quando na forma gasosa, a entrada do flúor ocorre através dos estômatos (Miller 1993), porém, em solução, este elemento pode ser absorvido por toda a superfície foliar. Uma vez absorvido, o flúor é acumulado em suas folhas podendo entrar na cadeia alimentar através do processo de herbivoria (Sun e Su 1985). Plantas contendo altas concentrações de flúor em seu tecido foliar podem causar distúrbios metabólicos severos em herbívoros, quando ingeridas em grande quantidades (Sun e Su 1985).

O flúor pode causar danos morfológicos em folhas aparentemente saudáveis, atribuindo-se esse efeito ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Peixoto 2005). Um dos primeiros sintomas de níveis elevados de fluoreto em tecidos vegetais vivos são alterações do funcionamento bioquímico celular, por inibir diversas enzimas e alterar a estrutura das membranas biológicas (Bustamante *et al.* 1993; Arndt 1995; Machoy-Mokrzyńska 1995; Fornasiero 2001; Fornasiero 2003; Kamaluddin 2003; Reddy e Kaur 2008). Fortes *et al.* (2003) observaram inibição da fotossíntese em milho, causada pelo efeito do flúor. Moraes (2000) verificou que *Tibouchina pulcra* apresentou redução da taxa de fotossíntese líquida por consequência da toxidez de flúor. Sendo assim, o flúor parece poder diminuir a

produtividade de espécies de interesse agrônomo como cana-de-açúcar e milho (Fortes *et al.* 2003; Otto *et al.* 2007).

Azevedo (1995), Fornasiero (2001) e Sant'anna-Santos *et al.* (2007), ao submeter diversas espécies vegetais ao flúor, observaram danos severos na epiderme de folhas jovens não sintomáticas. Em altas concentrações de flúor as injúrias podem ser severas, afetando a folha inteira e tornando-se generalizadas (Arndt 1995; Fornasiero 2001; Fornasiero 2003; Fortes *et al.* 2003; Peixoto 2005; Oliva e Figueiredo 2005). Quando presente no limbo foliar, o flúor parece interferir no conteúdo de cálcio e magnésio, havendo relatos da formação de sais de fluoreto de cálcio e fluoreto de magnésio como produto da interação entre estes dois elementos (Garrec *et al.* 1974 e Abdallah 2006).

A sensibilidade das plantas ao flúor depende de fatores genéticos, edáficos, climáticos, dentre outros (Weinstein e Davison 2003). Pesquisas recentes (Ribeiro 2008), com quatro espécies da mata atlântica, concluíram que *Eremanthus erythropappus* (Asteraceae) é capaz de suportar alta concentração de flúor mantendo inalterados diversos parâmetros fisiológicos como conteúdo de pigmento, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*. Assim, Ribeiro (2008) concluiu que *E. erythropappus* foi a espécie mais tolerante aos efeitos do flúor, dentre quatro espécies florestais estudadas, e comparativamente acumulou a menor quantidade desse poluente nas folhas.

*E. erythropappus*, popularmente conhecida como candeia, pertence ao grupo ecológico das pioneiras e é considerada precursora na invasão de campos (Carvalho 1994; Pedralli *et al.* 1997; Pedralli *et al.* 2000; Pérez *et al.* 2004). O nome “candeia” refere-se a uma variedade de espécies do gênero *Eremanthus*, que ocorrem principalmente no cerrado e mata atlântica: *E. arboreus* (Gardner) McLeish, *E. brasiliensis* (Gardner) McLeish, *E. polycephalus* (DC.) McLeish, *E. glomerulatus* Less., *E. erythropappus* (DC.) McLeish e *E. incanus* (Less.) Less. Dentre estas as duas últimas são as espécies de maior ocorrência em Minas Gerais e com maior potencial econômico (Carvalho 1994; Pedralli *et al.* 1997; Pedralli *et al.* 2000; Pérez *et al.* 2004). São espécies que se desenvolvem rapidamente em campos abertos, formando povoamentos mais ou menos puros. Isto também acontece dentro da floresta quando há alguma perturbação, como abertura de clareiras, pois são

heliófilas, sendo beneficiadas pela entrada de luz. Sua altura varia de 2 a 10 m, podendo o diâmetro do tronco atingir 35cm (CETEC 1994; Carvalho 1994; Pedralli *et al.* 1997; Pedralli *et al.* 2000; Pérez *et al.* 2004).

Nesse contexto é importante conhecer com maior detalhe o nível de tolerância de *E. erythropappus* à presença de fluoretos, reunir mais evidências do seu potencial como espécie tolerante ao flúor, para eventual utilização em programas de recuperação de áreas degradadas pela poluição por fluoreto atmosférico. Para isso, candeia foi submetida a altas concentrações de flúor, por período relativamente prolongado, a fim de acelerar os processos de acúmulo e intoxicação. Vários trabalhos têm sido desenvolvidos na Universidade Federal de Viçosa, abordando alterações anatômicas e, ou, fisiológicas decorrentes da exposição de plantas nativas a poluentes atmosféricos como o fluoreto (Bustamante *et al.* 1993; Azevedo 1995; Oliva e Figueiredo 2005 e Sant'anna-Santos *et al.* 2007 e Ribeiro 2008). Nesses trabalhos, o fluoreto foi fornecido principalmente, na forma de nevoeiro simulado tendo sido estabelecidos, os graus de sensibilidade, as alterações fisiológicas e anatômicas das espécies.

Esse teve como objetivo obter informações básicas acerca da espécie *E. erythropappus*, nativa do Estado de Minas Gerais, gerando informações que poderão ser utilizadas na conservação dos recursos naturais e recuperação de áreas impactadas ou afetadas por emissão industrial.

## **Objetivo**

Este estudo teve como objetivo determinar os efeitos do fluoreto, aplicado na forma de nevoeiro, em *E. erythropappus* e determinar seu grau de tolerância a alta concentração de flúor. Para tanto, foram avaliados parâmetros fisiológicos relacionados à fotossíntese, por metodologia não invasiva, caracterizados os danos celulares e estruturais em folhas e determinados os teores de flúor, magnésio e cálcio.

## Material e Métodos

### Material Vegetal

Devido à tolerância ao flúor, constatada por Ribeiro (2008), foi selecionada a espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae), candeia, nativa e de ampla ocorrência na vegetação existente na Estação Ecológica do Tripuí – EET e Parque estadual do Itacolomi (Pedralli *et al.* 1997). Estes locais são próximos a indústria cuja atividade se concentra no refino de alumina (óxido de alumínio  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), reprocessamento e fundição eletrolítica de alumínio, instalada desde 1940 na cidade de Ouro Preto, MG, sendo este processo industrial, uma fonte de emissão de fluoretos atmosféricos.

Sementes de candeia foram germinadas e cultivadas em tubetes no viveiro do IEF, localizado no Parque Estadual do Itacolomi (Ouro Preto - MG). Mudas de candeia, na forma de plântulas, com cerca de dois meses de idade e 30 cm de altura, portando cotilédones e três pares de folhas, foram transferidas para vasos de 5 litros, contendo solo adubado de acordo com recomendação de Venturini *et al.* (2005) específica para candeia. Após transplântio, as plantas permaneceram por 60 dias em casa de vegetação na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa, para aclimação às condições experimentais e desenvolvimento da planta. Ao longo destes 60 dias, pragas e doenças fúngicas foram controladas com duas doses do inseticida CONFIDOR<sup>®</sup> ( $0,40 \text{ gL}^{-1}$ ) e duas doses do fungicida ROSVRAL<sup>®</sup> ( $1 \text{ gL}^{-1}$ ), com 15 e 45 dias de transferência. Neste período as plantas foram irrigadas três vezes por semana, o suficiente para garantir um suprimento adequado de água. A temperatura média do período foi de  $24^\circ\text{C}$  e a irradiância média de  $30 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Durante o experimento, a superfície do solo foi recoberta com sacolas de plástico, a fim de impedir que a solução de flúor, se depositasse e se infiltrasse no solo.

Para as avaliações, foram utilizadas folhas com duas idades distintas, denominadas folha adulta (FA) e folha nova (FN), uma de cada idade por planta, ficando permanentemente marcadas. Como folhas adultas (FA), consideraram-se as folhas do 4º ou 5º nós, com área foliar definida, expandida e sadia, escolhida no dia 0

do experimento. Como folhas novas (FN) consideraram-se aquelas que se desenvolveram durante os 55 dias da aplicação de nevoeiro. As FN foram escolhidas e marcadas no 30º dia após o início do período experimental, estando no 2º ou 3º nó neste momento do experimento. Após 55 dias ininterruptos de aplicação do nevoeiro simulado, avaliações foram realizadas em amostras de FA e FN para a quantificação do teor de flúor no tecido vegetal, do conteúdo de pigmentos fotossintéticos, mensuração do extravasamento de eletrólitos celulares, danos celulares pelo acúmulo de dialdeído malônico e verificação anatômica, em todos os tratamentos.

### **Nevoeiro Simulado de Flúor**

O flúor foi aplicado nas plantas, em alta concentração, na forma de nevoeiro simulado, durante um período de 55 dias. Adicionou-se fluoreto de sódio (NaF) em água desionizada, nas concentrações de 0 mg L<sup>-1</sup> (Controle), e 45 mg L<sup>-1</sup> de flúor (pH=6,5). A concentração de 45 mg L<sup>-1</sup> de flúor foi definida visando uma resposta eficaz à toxidez de candeia ao flúor, no menor período de tempo possível, uma vez que Ribeiro (2008) concluiu tolerância desta espécie utilizando concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> por 15 dias de exposição.

As simulações de nevoeiro foram realizadas em uma câmara fechada, com um volume interno de 2,16 m<sup>3</sup> (1,80 m de altura, 1,20 m de largura e 1,0 m de profundidade), com quatro bicos pulverizadores, presentes no centro do teto em ângulo de pulverização de 60º e com vazão de 0,55 L min<sup>-1</sup>, o que proporciona uma distribuição homogênea da aspersão do nevoeiro. As plantas foram expostas diariamente a nevoeiros com duração de vinte minutos, totalizando 5,22 mm dia<sup>-1</sup> de precipitação para os tratamentos controle e flúor.

Antes e depois da aplicação do nevoeiro, as plantas ficaram expostas sob um painel luminoso composto por oito lâmpadas incandescentes de mercúrio (E-27, 220-230V, 250W) por 20 minutos, sob densidade de fluxo radiante de 95 W m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> a fim de induzir a abertura estomática. Após aplicação do nevoeiro as plantas foram mantidas em casa de vegetação, sob iluminação natural.

### **Quantificação do Teor de Flúor**

Após 15, 30 e 55 dias do início da aplicação do nevoeiro, os teores de flúor foram quantificados nas FA, enquanto nas FN o teor de flúor foi determinado apenas após 55 dias. Folhas de cada planta foram coletadas e lavadas individualmente com uma solução de HCl 0,1 M e lauril sulfato de sódio 0,02% durante 30 segundos e enxaguadas com água desionizada, para remoção completa de fluoreto adsorvido pela superfície foliar (Mitchell 1986). Posteriormente foram desidratadas em estufa ventilada a 70 °C e reduzidas em moinho tipo Willey a partículas com dimensões inferiores a 1 mm. Exatamente 0,5 g do material seco e pulverizado foi submetido a lixiviação durante 12 horas em ácido perclórico 0,1 M. O teor de fluoreto foi determinado no extrato resultante da lixiviação, através do eletrodo íon-específico (García-Ciudad *et al.* 1985).

### **Avaliação das Trocas Gasosas**

As taxas de assimilação líquida de carbono ( $A$  -  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$  -  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$  -  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e a concentração de  $\text{CO}_2$  no mesofilo ( $C_i$  -  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) foram obtidas por meio de sistema de medição de trocas gasosas LI-6400 (LI-COR Biosciences Inc. Nebraska, USA) equipado com uma fonte de luz azul/vermelho modelo LI-6400-02B (LI-COR). As avaliações foram feitas sob concentração de  $\text{CO}_2$ , temperatura e vapor de água ambiental no momento e local de estudo, sendo o ar de referência coletado a 1,50 m de altura do solo e homogeneizado em um galão de 20 litros antes de alcançar a câmara foliar. As folhas selecionadas para a avaliação das trocas gasosas foram também utilizadas para determinação das variáveis da fluorescência da clorofila  $a$ .

O equipamento utilizado, possui uma câmara de medição das trocas gasosas retangular, capaz de medir 6  $\text{cm}^2$  do limbo foliar. Neste trabalho a área de medição das trocas gasosas compreendeu o centro do limbo foliar, com a nervura central passando pelo centro da câmara de mediação. Esta porção do limbo foliar, em todos os tratamentos e durante todo o período experimental, se mostrou visualmente sadia. As avaliações de trocas gasosas foram realizadas semanalmente em FA, e após 30

dias do início do período experimental em FN, entre as 9 e 11 horas da manhã, uma vez que, constatou-se maior eficiência fotossintética neste horário do dia.

### **Determinação das Variáveis da Fluorescência da Clorofila *a***

As medidas pontuais das variáveis da fluorescência da clorofila *a* foram obtidas utilizando um fluorômetro portátil modulado MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), equipado com uma pinça especial para suporte da folha modelo 2030-B. Este modelo (MINI-PAM – pinça 2030-B) possui uma área de medição circular, que foi posicionada no centro do limbo foliar, dentro da mesma área utilizada para medição das trocas gasosas. Esta porção do limbo foliar, em todos os tratamentos e durante todo o período experimental, se mostrou visualmente sadia. Foram realizadas seis avaliações das variáveis da fluorescência da clorofila *a* ao longo do período experimental em FA e após 30 dias do início do período experimental em, três avaliações em FN, imediatamente após as medições de trocas gasosas.

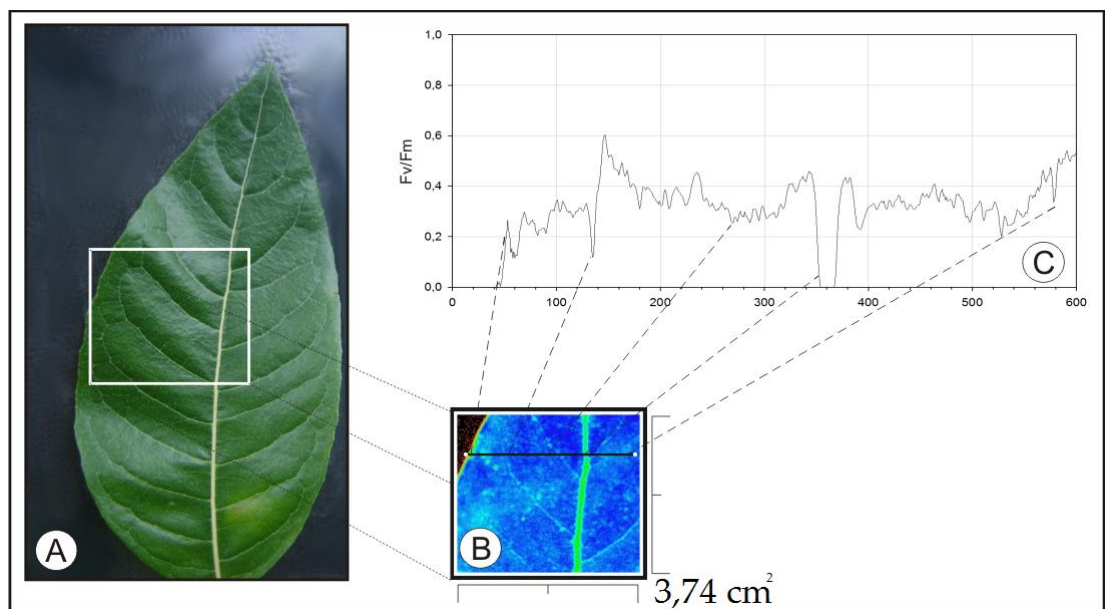
### **Imagem da Fluorescência da Clorofila *a***

A variação espacial do efeito fotoinibitório decorrente da aplicação de flúor, foi registrada ao final do período experimental, em todas as repetições de todos os tratamentos, por meio de imagens de fluorescência obtidas com fluorômetro modelo IMAGING-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), equipado com uma pinça especial para suporte da folha modelo IMAGUSH (Universal Sample Holder).

Após período de 1 hora em adaptação ao escuro, as imagens de fluorescência mínima ( $F_0$ ) obtidas pela aplicação de pulsos de luz de  $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade (1 Hz), e de fluorescência máxima ( $F_m$ ), obtida por um pulso saturante de luz azul (470 nm) de  $2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade (10 Hz), foram determinadas e utilizadas para o cálculo da eficiência quântica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ). Para uma máxima resolução espacial (640x480 pixels), as medidas foram realizadas com uma distância mínima entre a câmara (CCD) e a folha, o que corresponde a uma imagem com área de 17 x 22 mm (area of interest - AOI). Para representar a distribuição das áreas afetadas ao longo da área do limbo foliar, com o uso do programa Imaging Win v.2.25, um transecto foi traçado, atravessando a área de

interesse (AOI), indo da margem ao centro da folha. Ao longo dessa linha os valores de  $F_v/F_m$ ,  $F_0$ , ETR,  $\phi_{II}$ ,  $\phi_{NPQ}$ ,  $\phi_{NO}$  e  $q_L$ , foram calculados e, a partir deles, foram construídos gráficos com a variação dos parâmetros ao longo da linha (Figura 1).

Foram feitas medições em todas as repetições de FA e FN de todos os tratamentos ao final do período experimental. Para as análises da imagem da fluorescência foi escolhida uma folha representativa de cada tratamento e foram construídos gráficos a partir destas folhas, não havendo possibilidade de análise estatísticas destes dados.



**Figura 1**

Área de amostragem escolhida na folha para a captura da fluorescência de imagem da clorofila *a*. **B**: linha traçada na (AOI) para cálculo do parâmetro escolhido, o quadrado mede 3,74 cm<sup>2</sup>. Na AOI, foi traçada uma linha reta atravessando o limbo. **C**: Os valores de  $F_v/F_m$  foram calculados ao longo da linha. A partir desses valores, gráficos foram resultantes da análise, mostrando a variação dos parâmetros ao longo da linha traçada.

As variáveis da fluorescência da clorofila *a* utilizadas neste trabalho e suas respectivas fórmulas seguem:

$$ETR = 0,5 \cdot (F_m' - F) / F_m' \cdot PAR \cdot 0,84 \mu\text{equivalents m}^{-2}\text{s}^{-1}$$

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

$$\phi_{II} \text{ ou } \Delta F / F_m' = (F_m' - F) / F_m'$$

$$\phi_{NPQ} = F / F_m' - F / F_m$$

$$\phi_{NO} = F / F_m$$

$$q_L = (F_m' - F) \cdot F_0' / (F_m' - F_0') \cdot F$$

### **Quantificação do Teor de Pigmentos**

Ao final do período experimental os teores de pigmentos fotossintéticos foram determinados em FA e FN na mesma região do limbo utilizada nas análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*. Esta porção do limbo foliar, em todos os tratamentos e durante todo o período experimental, se mostrou visualmente sadia. Os teores de pigmentos (Clorofila *a*, *b* e carotenóides) foram determinados conforme protocolo descrito por Wellburn (1994) com a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator. Dois discos foliares de 5 mm de diâmetro foram colocados em recipientes contendo 5 ml de DMSO saturado com carbonato de cálcio. Após 48 horas sob temperatura ambiente de 26° C, as absorbâncias do extrato foram lidas e os teores dos pigmentos determinados e expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

### **Avaliação de Danos Celulares**

Ao final do período experimental amostras do tecido foliar foram coletadas em FA e FN na mesma região do limbo utilizada nas análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*. Esta porção do limbo foliar, em todos os tratamentos e durante todo o período experimental, se mostrou visualmente sadia.

Danos celulares foram avaliados por meio da quantificação da peroxidação de lipídeos, via acúmulo de aldeído malônico (MDA), conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). Depois de fragmentados em nitrogênio líquido, 200 mg de tecido foliar foram macerados com 4,0 mL da solução de extração contendo 1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). O homogeneizado resultante foi centrifugado a 12.000g por

15 min. Todas as etapas do processo de extração foram conduzidas a 4°C. Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram coletadas e adicionadas a 1,5 mL da solução de 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (preparado em 20% (p/v) de TCA). As amostras e o branco foram incubadas a 95°C, por 2 horas, sob agitação. Após o aquecimento, a reação foi paralisada em banho de gelo, seguida por centrifugação a 9.000g por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi lida a 532nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade de  $155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Heath e Packer 1968).

A permeabilidade das membranas foi determinada em discos foliares, por meio do extravasamento de eletrólitos (Tarhanen *et al.* 1999). Dez discos foliares de 5 mm de diâmetro foram colocados em tubos de ensaio com tampa rosqueável, contendo 10 ml de água desionizada. Após 12 horas, a condutividade, denominada inicial (Condut. i), foi medida com auxílio de um condutivímetro (MacCann e Solomoon 2000). Após essa medida, os tubos foram colocados em banho Maria a 90°C por duas horas e a condutividade, denominada final (Condut. f), foi medida novamente. A permeabilidade relativa foi calculada pela relação  $\text{Condut. i}/(\text{Condut. i} + \text{Condut. f}) \times 100$  (Tarhanen *et al.* 1999).

### **Determinação de Ca e Mg**

Para a quantificação do teor de cálcio e magnésio das folhas, amostras deste material a fresco após cinquenta e cinco dias de exposição ao flúor foram secas a temperatura de 75°C em estufa ventilada até atingirem peso constante, moídas em moinho do tipo Willey e peneiradas em dimensões menores que 1 mm. Após secas e moídas, 0,5 g do material vegetal foi digerido em 10 mL de solução nítrico-perclórica (3:1), seguindo metodologia proposta por Tedesco *et al.* (1995). Os teores de Ca e Mg foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica expressos em  $\text{dag. kg}^{-1}$  de matéria seca.

### **Avaliação Anatômica**

Para análise anatômica, amostras de todas as repetições de todos os tratamentos de FA e FN de candeia foram coletadas ao final do período experimental. Estas foram fixadas em FAA (preparado com etanol 70%), desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesina, Leica Instruments).

Para montagem das laminas cortes transversais das folhas, com 4 µm de espessura, obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc.), foram corados com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully 1981) e montados em Permount. As observações e documentações fotográficas foram realizadas em fotomicroscópio (modelo Olympus BX50, Olympus Optical).

### **Análise dos Dados**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos, 0 e 45 mg L<sup>-1</sup> de flúor e oito repetições por tratamento.

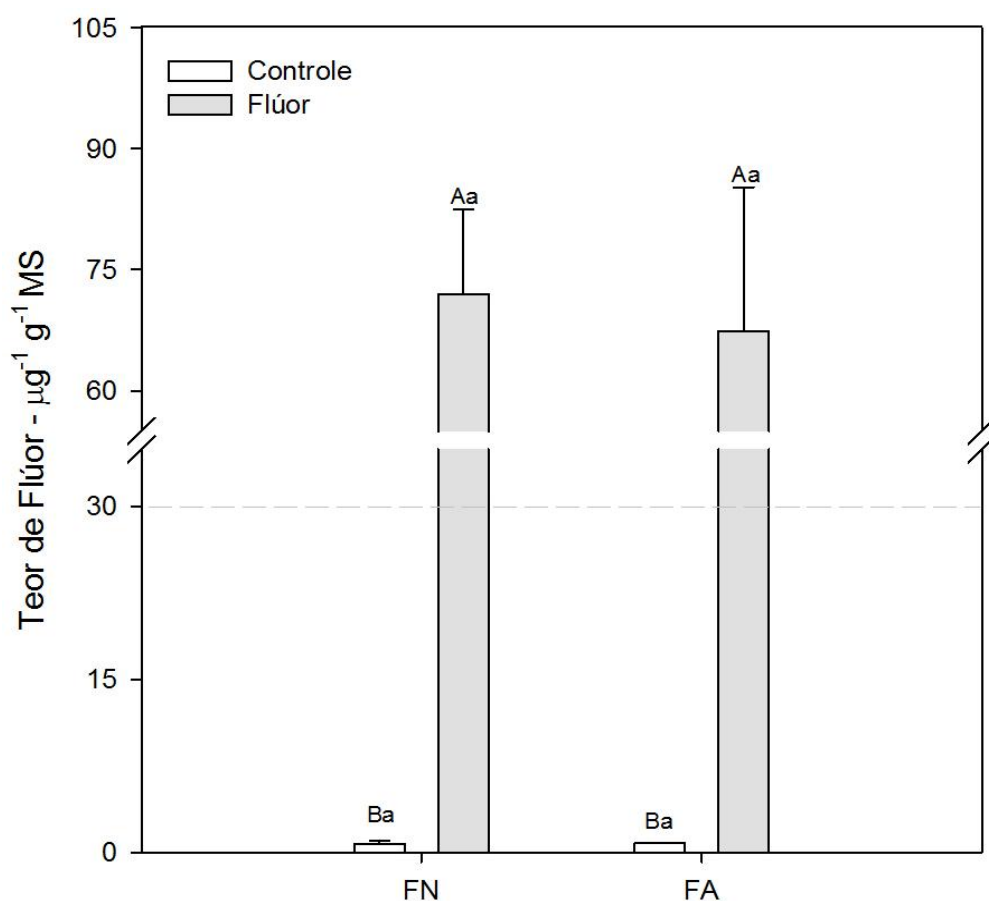
Os dados obtidos durante o período experimental, por metodologia não invasiva, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SigmaPlot 11.0 assim como para a construção dos gráficos.

Os dados obtidos ao final do período experimental, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), tratados como esquema de parcelas subdivididas (FN e FA), as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAEG e para a construção dos gráficos, utilizou-se o programa SigmaPlot 11.0.

## Resultados

### Teor de Flúor na Matéria Seca

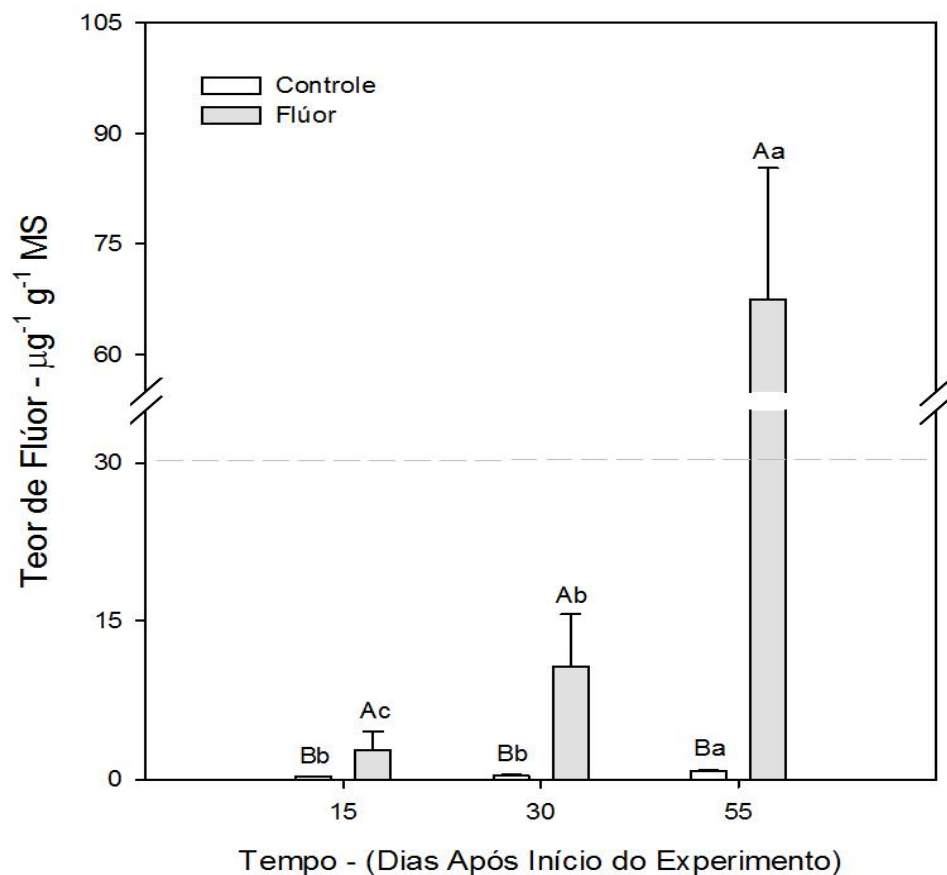
A média do teor de flúor presente na matéria seca de FN e FA ao final do experimento foi significativamente maior em plantas expostas ao tratamento de flúor em comparação ao controle ( $P < 0,05$ ). Entretanto não houve diferença estatística na quantidade de flúor acumulada entre FN ( $71,94 \mu\text{g}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MS}$ ) e FA ( $67,42 \mu\text{g}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MS}$ ) expostas ao flúor. O teor de flúor nos tecidos das FN e FA analisadas foi cerca de 70 vezes maior que o verificado no controle ( $0,788 \mu\text{g}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MS}$ ) (Figura 2).



**Figura 2**

Teor médio de flúor na matéria seca, após 55 dias de exposição ao nevoeiro simulado com flúor, em folhas adultas (FA) e folhas novas (FN). A linha tracejada indica o valor padrão de referência de plantas sensíveis para acúmulo de fluoreto (VDI-Richtline 2310, 1989). Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas indicam a comparação entre tratamentos e letras minúsculas indicam a comparação entre idades da folha de cada tratamento. Barras verticais indicam desvio padrão das médias.

Os teores médios de flúor da matéria seca de FA aumentaram ao longo do período experimental, sendo significativamente maiores nas folhas das plantas expostas ao tratamento de nevoeiro simulado contendo flúor em comparação ao controle ( $P < 0,05$ ). Houve diferença estatística na quantidade de flúor acumulado nas folhas durante o período experimental, quando se compara o controle e FA tratadas com flúor ( $P < 0,05$ ). No 15º dia após o início da aplicação de nevoeiro simulado, as folhas do tratamento contendo flúor possuíam  $2,84 \mu\text{g}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MS}$  enquanto no 30º dia haviam acumulado em sua folha  $10,75 \mu\text{g}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MS}$  e ao final do experimento, após 55 dias de exposição ao flúor as folhas haviam acumulado  $67,42 \mu\text{g}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MS}$ . O teor de flúor na folha com 15, 30 e 55 dias de exposição no controle foi de  $0,289 \mu\text{g}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MS}$ ,  $0,342 \mu\text{g}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MS}$ , e  $0,788 \mu\text{g}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MS}$  respectivamente (Figura 3).

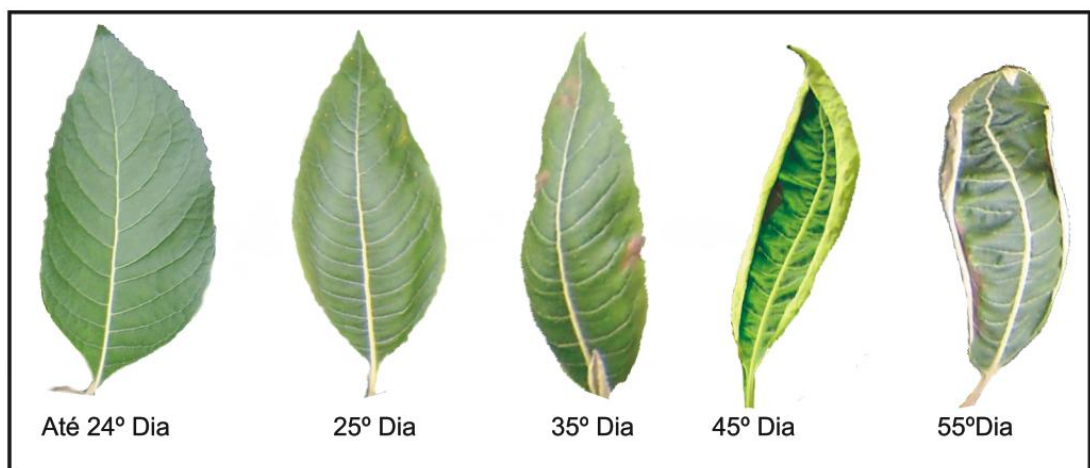


**Figura 3**

Médias do teor de flúor na matéria seca de FN e FA em função do tempo de experimento, por dias de exposição. A linha tracejada indica o valor padrão de referência de plantas sensíveis para acúmulo de fluoreto (VDI-Richtline 2310, 1980). Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas indicam a comparação entre tratamentos e letras minúsculas indicam a comparação entre idades da folha de cada tratamento. Barras verticais indicam desvio padrão das médias.

### Efeitos Macroscópicos da Toxidez por Flúor

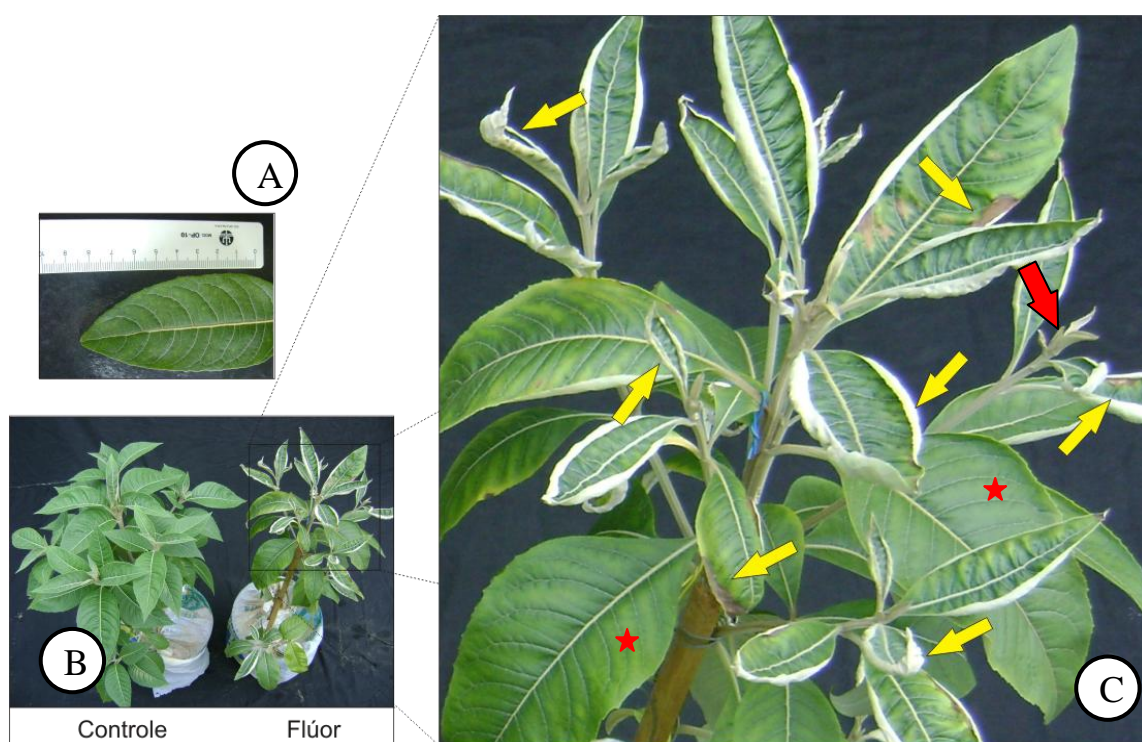
Ao final do período experimental, FA não apresentaram sintomas visuais de injúria ou alteração de coloração. Em contrapartida, em todas as unidades experimentais, FN sofreram alterações morfológicas profundas, tanto no tamanho quanto no formato do limbo foliar (Figura 4). Em 100% das plantas submetidas ao tratamento contendo flúor observou-se, em FN, o enrugamento do limbo foliar e enrolamento da borda foliar no sentido adaxial seguida de necrose marginal em adição a necrose da porção apical, comprometendo em média 20% da área foliar, na maior parte das folhas. Os sintomas foliares surgiram entre 23 e 25 dias de experimento, como pontos de clorose marginal e apical que evoluíram para necrose do ápice e borda foliar. Os pontos cloróticos progrediram de um ponto amarelo esverdeado para uma cor marrom-amarelada, se espalhando por toda a margem foliar. A clorose se tornou amarronzada, formando uma necrose única que se estendeu por toda a borda foliar, com o aspecto desidratado e quebradiço. O controle não apresentou sinais de clorose ou necrose foliar em nenhum momento.



**Figura 4**

Desenvolvimento das injúrias foliares causadas pelo flúor ao longo do tempo de experimento, em decorrência do tratamento contendo flúor em folhas novas (FN) de *E. erythropappus*. As imagens são de diferentes folhas novas (FN). No vigésimo quinto dia houve aparecimento de cloroses pontuais ao longo da margem foliar.

Em 100% das plantas submetidas ao nevoeiro contendo flúor, o desenvolvimento da porção apical por comprometimento dos primórdios foliares de todos os ramos, em grande parte das FN, foi severamente afetado. Houve desenvolvimento de necrose marginal das FN ao final do experimento. Após 35 dias de experimento, os primórdios foliares não se desenvolveram mais, devido a sua total desidratação, apresentando aspecto quebradiço (Figura 5). As plantas do controle apresentaram aspecto sadio, considerado normal, com grande desenvolvimento vegetal, estando ao final do período experimental mais frondosas, sem alterações.

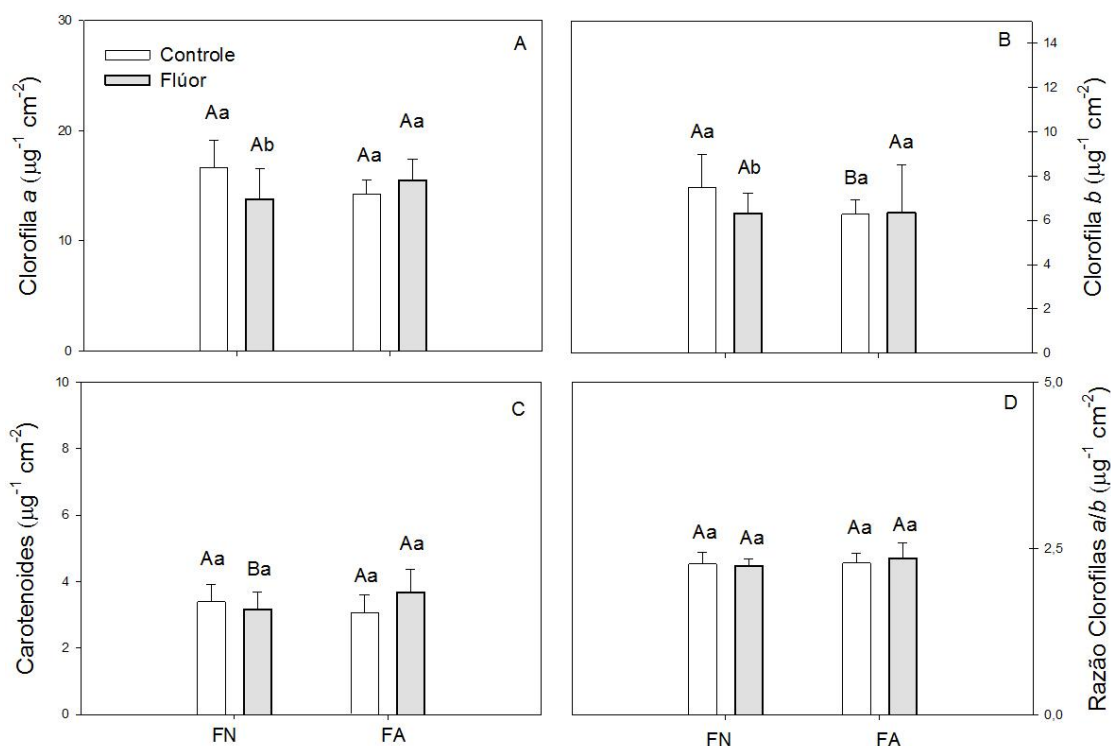


**Figura 5**

Aspecto geral da planta sadia (Controle) de *E. erythropappus* e de planta expostas por 55 dias ao nevoeiro com flúor. As imagens refletem o aspecto geral de todas as repetições. A – Folha nova (FN) do controle ao final do experimento. B – Planta controle (Esquerda) e submetida ao flúor (Direita) ao final do experimento. C – Detalhes de uma das plantas que foram expostas ao flúor por 55 dias. Setas amarelas indicam, em folhas novas (FN), necroses marginais, enrolamento da borda e enrugamento do limbo. Seta vermelha indica primórdio foliar seco. Estrelas vermelhas indicam folhas adultas (FA), sem alteração na coloração do limbo, e ausência de necrose.

## Conteúdo de Pigmentos Fotossintéticos

A concentração de clorofila *a*, *b* e relação clorofila *a/b* não apresentaram alterações significativas na comparação entre folhas tratadas com flúor e o controle. Porém conteúdo de carotenóides foi maior em FN tratada com flúor quando comparada a FN do controle. Houve significância na interação tratamento e idade da folha, onde conteúdo de clorofila *a*, *b* de FN foi afetado pelo flúor se comprado a FA ( $P < 0,05$ ) (Figura 6).

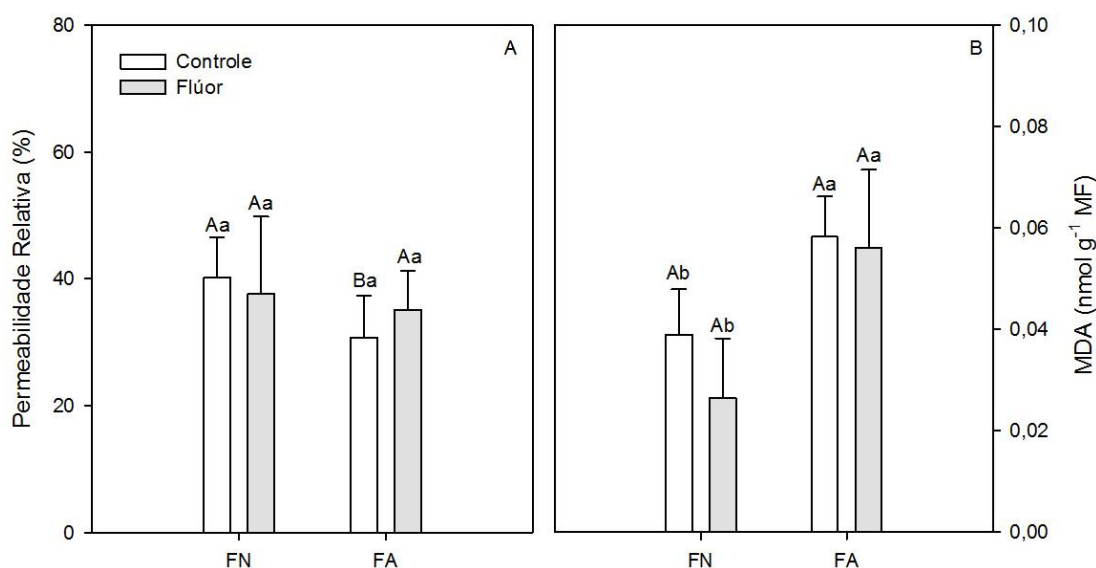


**Figura 6**

Teor de clorofila *a* (A), *b* (B), carotenóides (C) e razão Clorofila *a/b* (D) em folhas adultas (FA) e folhas novas (FN) de *E. erythropappus* submetida ao nevoeiro simulado com ou sem flúor após 55 dias de experimento. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas indicam a comparação entre tratamentos e letras minúsculas indicam a comparação entre idades da folha de cada tratamento. Barras verticais indicam desvio padrão das medias.

## Permeabilidade de Membrana e Acúmulo de MDA

A permeabilidade relativa de membranas, medida com base na perda de eletrólitos, não demonstrou alteração significativa na comparação entre flúor e controle de FN ( $P < 0,05$ ), entretanto FA tratada com flúor mostrou maior permeabilidade de membrana quando comparada com FA do controle. A medida do acúmulo de MDA, um sub-produto da peroxidação lipídica, que pode indicar formação de espécies reativas de oxigênio, foi similar entre os tratamentos controle e flúor, assim como em FA e FN (Figura 07).



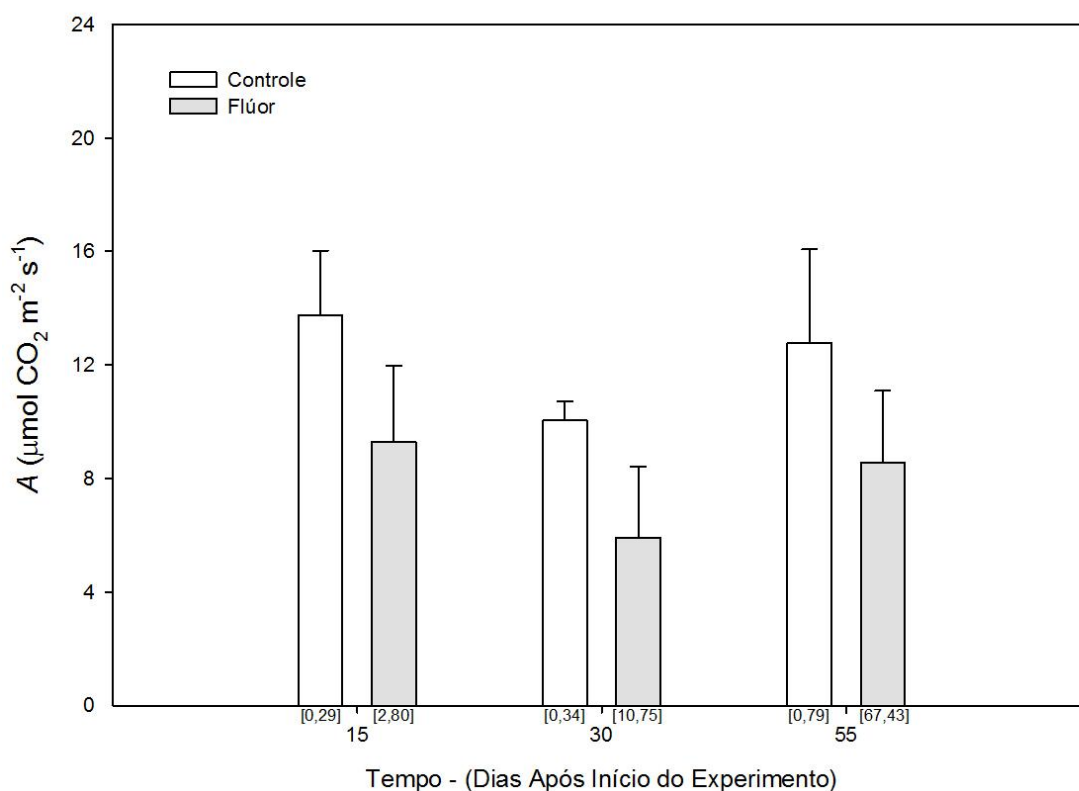
**Figura 7**

Permeabilidade relativa de membrana (A) e acúmulo de Dialdeído Malônico (MDA) após 55 dias de nevoeiro simulado contendo ou não flúor, em folhas adultas (FA) e folhas novas (FN) de *E. erythropappus*. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas indicam a comparação entre tratamentos e letras minúsculas indicam a comparação entre idades da folha de cada tratamento. Barras verticais indicam desvio padrão das médias.

## Trocas Gasosas

Observa-se tendência de queda na taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  a medida que a concentração de flúor aumenta no tecido foliar ao longo do período experimental (Figura 8).

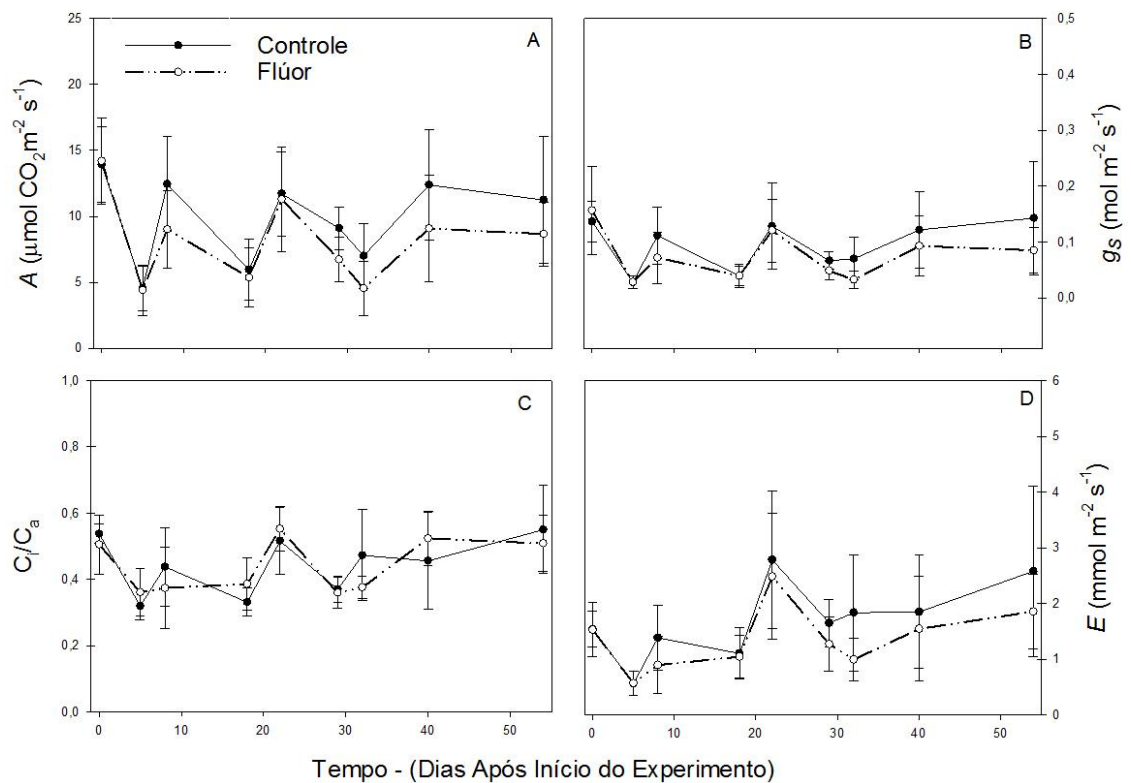
No decorrer do período experimental não houve diferenças estatisticamente significativas entre a fotossíntese líquida de FN e FA do controle em comparação ao tratamento com flúor, avaliada na porção sadia do limbo foliar ( $P < 0,05$ ) (Figura 9).



**Figura 8**

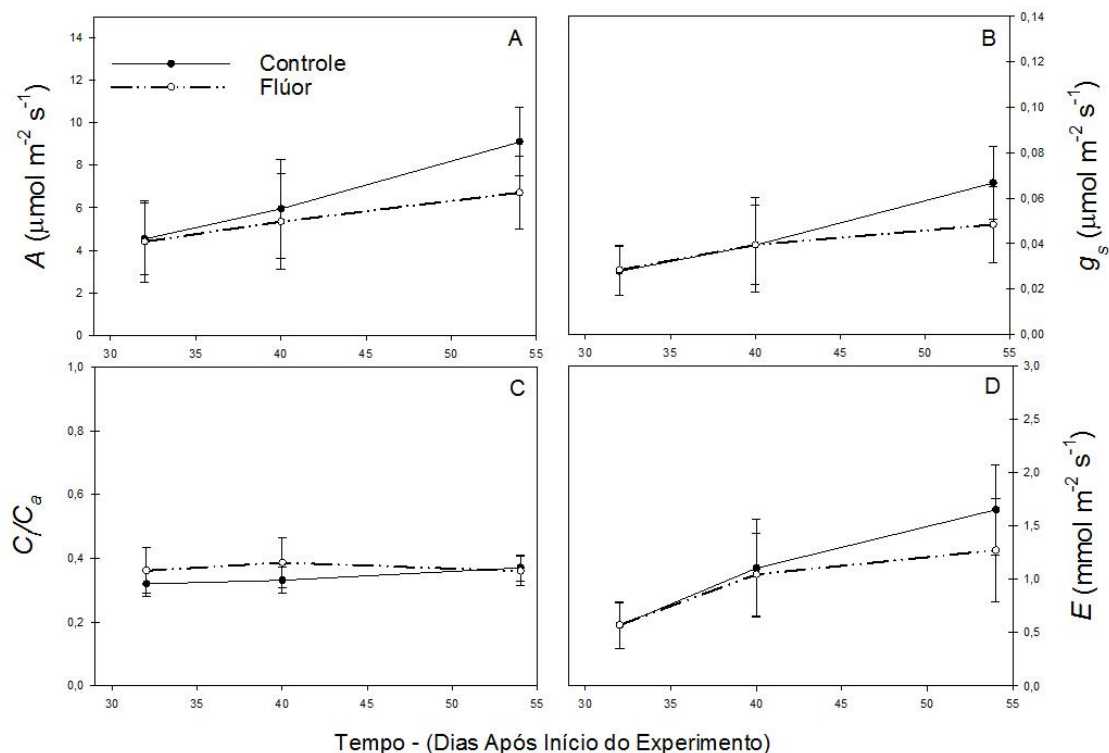
Taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) após 15, 30, e 55 dias de aplicação de flúor em folha adulta (FA) em relação a concentração de flúor no tecido foliar. Valores entre colchetes se referem ao teor de flúor nas folhas de *E. erythropappus* ao longo do período experimental. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais indicam desvio padrão das medias.

Não houve diferenças significativas na taxa fotossintética entre os tratamentos durante todo o período experimental, tanto em FA quanto em FN ( $P < 0,05$ ). Entretanto após 25 dias de experimento, houve tendência de queda da assimilação líquida de  $\text{CO}_2$ , tendência que se manteve até o final do tratamento em FA. A condutância estomática, também não diferiu significativamente durante o período experimental ( $P < 0,05$ ). Houve, tal como a taxa fotossintética, tendência de queda após 30 dias, se mantendo essa tendência até o final do período experimental em FA e FN. A transpiração e relação  $C_i/C_a$ , não variaram de forma significativa ao longo do experimento entre os tratamentos em FN e FA (Figura 9 e 10).



**Figura 9**

Taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), condutância estomática ( $B$ ),  $C_i/C_a$  ( $C$ ) e a transpiração ( $D$ ) durante todo o período experimental em folha adulta (FA) exposta ou não ao flúor. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais indicam desvio padrão das médias.



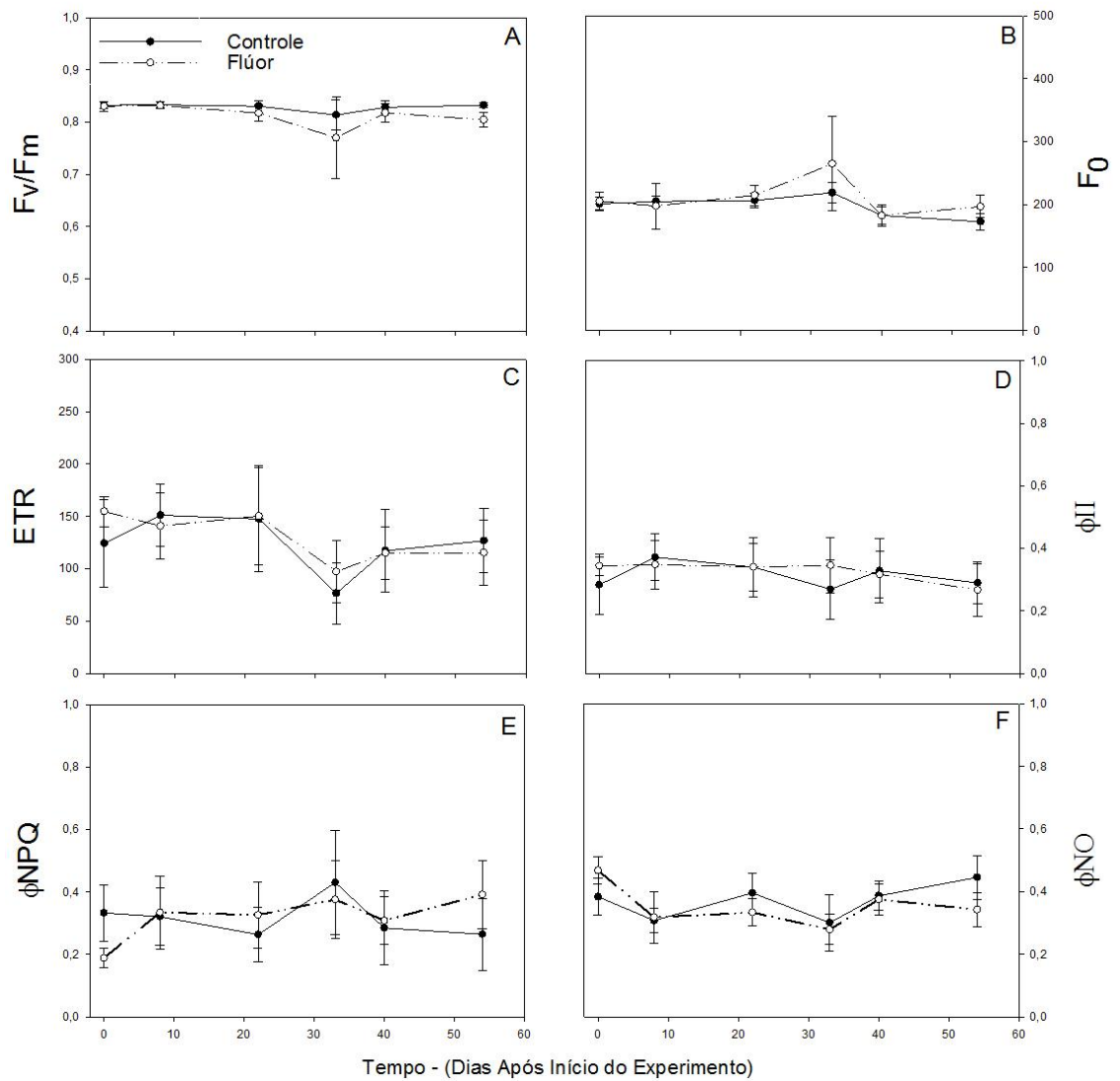
**Figura 10**

Taxa fotossintética (A), condutância estomática (B),  $C_i/C_a$  (C) e a transpiração (D) entre 30 e 55 dias de período experimental em folha nova (FN). Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais indicam desvio padrão das médias.

### Fluorescência da Clorofila *a*

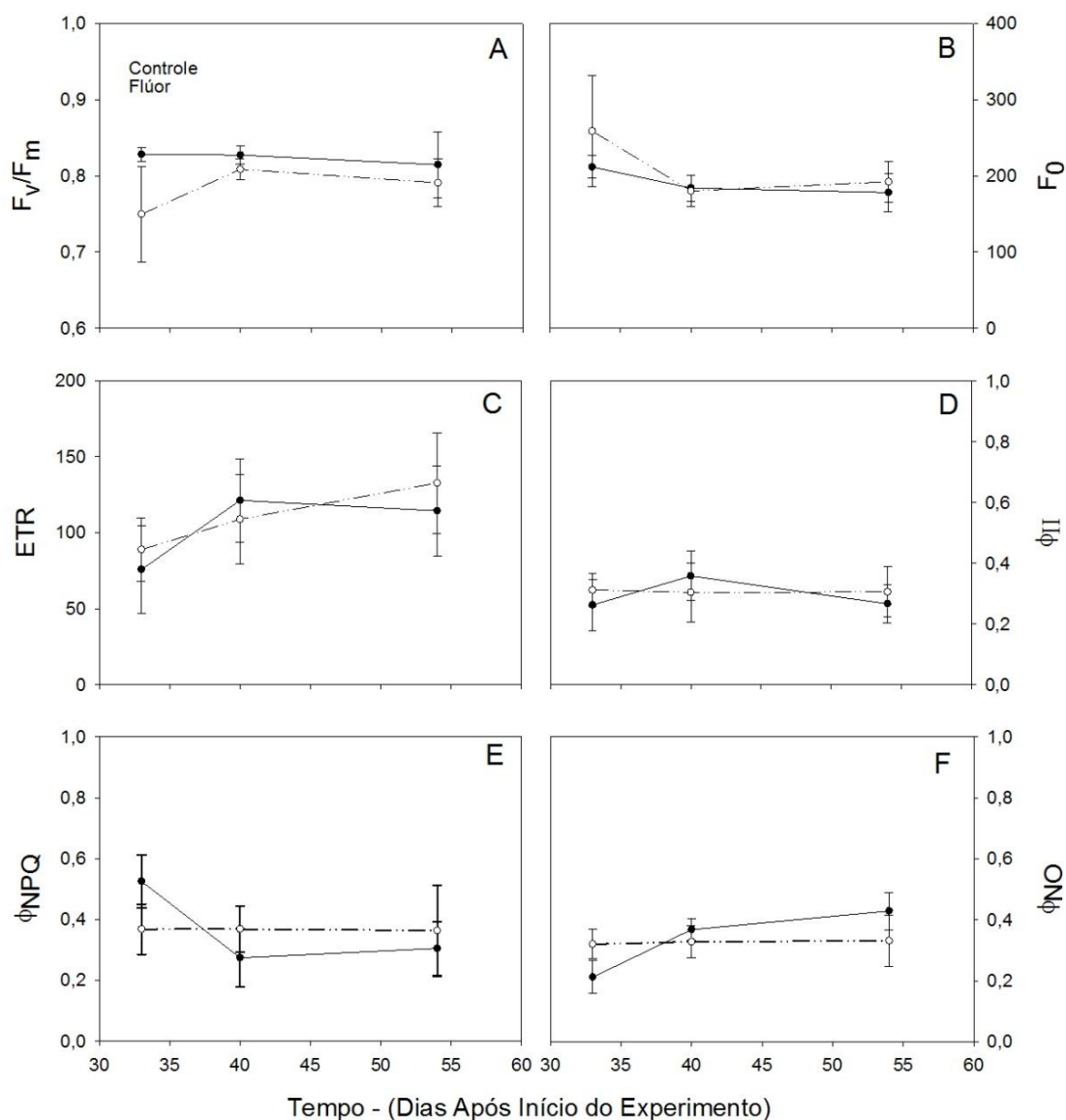
Não foi observado efeito significativo do flúor sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* avaliados durante o período experimental entre controle e tratamento por flúor e entre FN e FA ( $P < 0,05$ ) (Figura 11 e 12). Apesar da igualdade estatística entre os tratamentos, no último dia de experimenta o rendimento quântico da dissipação não fotoquímica regulado tendeu a diminuir em FA do controle e aumentar em FA exposta ao flúor ( $P < 0,05$ ) (Figura 11).

As FN de candeia tratadas com flúor apresentaram valor médio de  $F_v/F_m$  ligeiramente inferior as FN do controle em 32, 41 e 55 dias de início do experimento, diferença esta que não foi significativa ( $P < 0,05$ ) (Figura 12). Os rendimentos quânticos da dissipação não fotoquímica regulada e não regulada também não diferiram entre FN do controle e FN tratadas com flúor ( $P < 0,05$ ) (Figura 12).



**Figura 11**

Variáveis da fluorescência da clorofila *a* em folha adulta (FA), durante o período experimental, expostas ou não ao flúor. Eficiência quântica máxima do PSII -  $F_v/F_m$  (A), fluorescência mínima inicial -  $F_0$  (B), taxa de transporte de elétrons - ETR (C), rendimento quântico efetivo  $\Delta F/F_m$  ou  $\phi_{II}$  (D), rendimento quântico de dissipação não fotoquímica regulada  $\phi_{NPQ}$  (E) e rendimento quântico de dissipação não fotoquímica não-regulada  $\phi_{NO}$  (F). Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais indicam desvio padrão das medias.



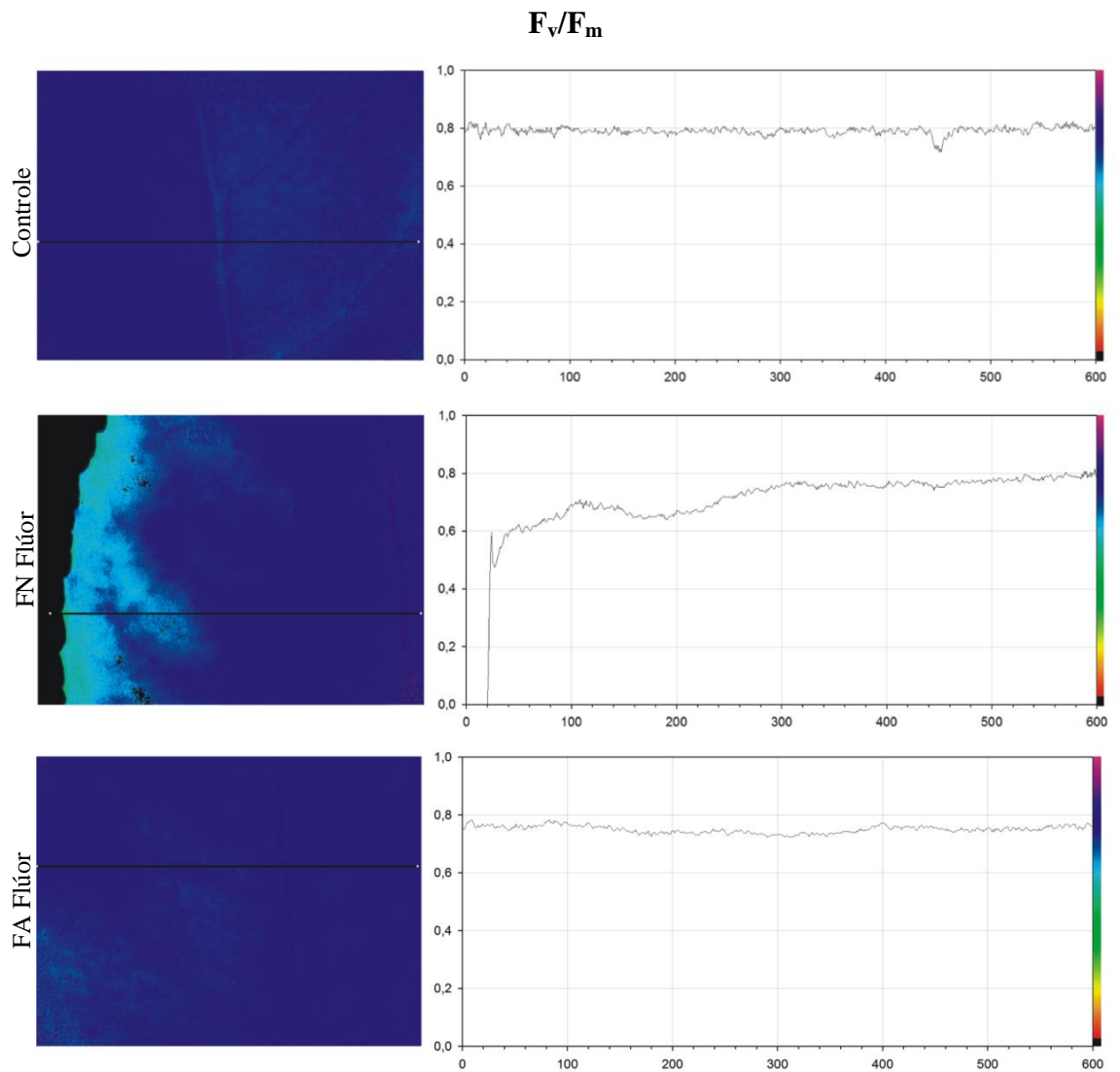
**Figura 12**

Variáveis da fluorescência da clorofila *a* em folha adulta (FN), durante o período experimental, expostas ou não ao flúor. Eficiência quântica máxima do PSII -  $F_v/F_m$  (A), fluorescência mínima inicial -  $F_0$  (B), taxa de transporte de elétrons - ETR (C), rendimento quântico efetivo  $\Delta F/F_m'$  ou  $\phi_{II}$  (D), rendimento quântico de dissipação não fotoquímica regulada  $\phi_{NPQ}$  (E) e rendimento quântico de dissipação não fotoquímica não-regulada  $\phi_{NO}$  (F). Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Barras verticais indicam desvio padrão das medias.

### **Imagem da Fluorescência da Clorofila *a***

As imagens da fluorescência da clorofila *a* mostraram alterações nos parâmetros  $F_v/F_m$ ,  $F_0$ , ETR,  $\phi_{II}$ ,  $\phi_{NPQ}$ ,  $\phi_{NO}$  e  $q_L$  de FN apenas na porção marginal do limbo foliar, entretanto na porção central do limbo foliar não observou-se alterações em nenhum dos parâmetros. Já em FA houve alteração nos parâmetros  $F_0$ , ETR,  $\phi_{II}$ ,  $\phi_{NPQ}$  e  $q_L$  por todo o limbo foliar.

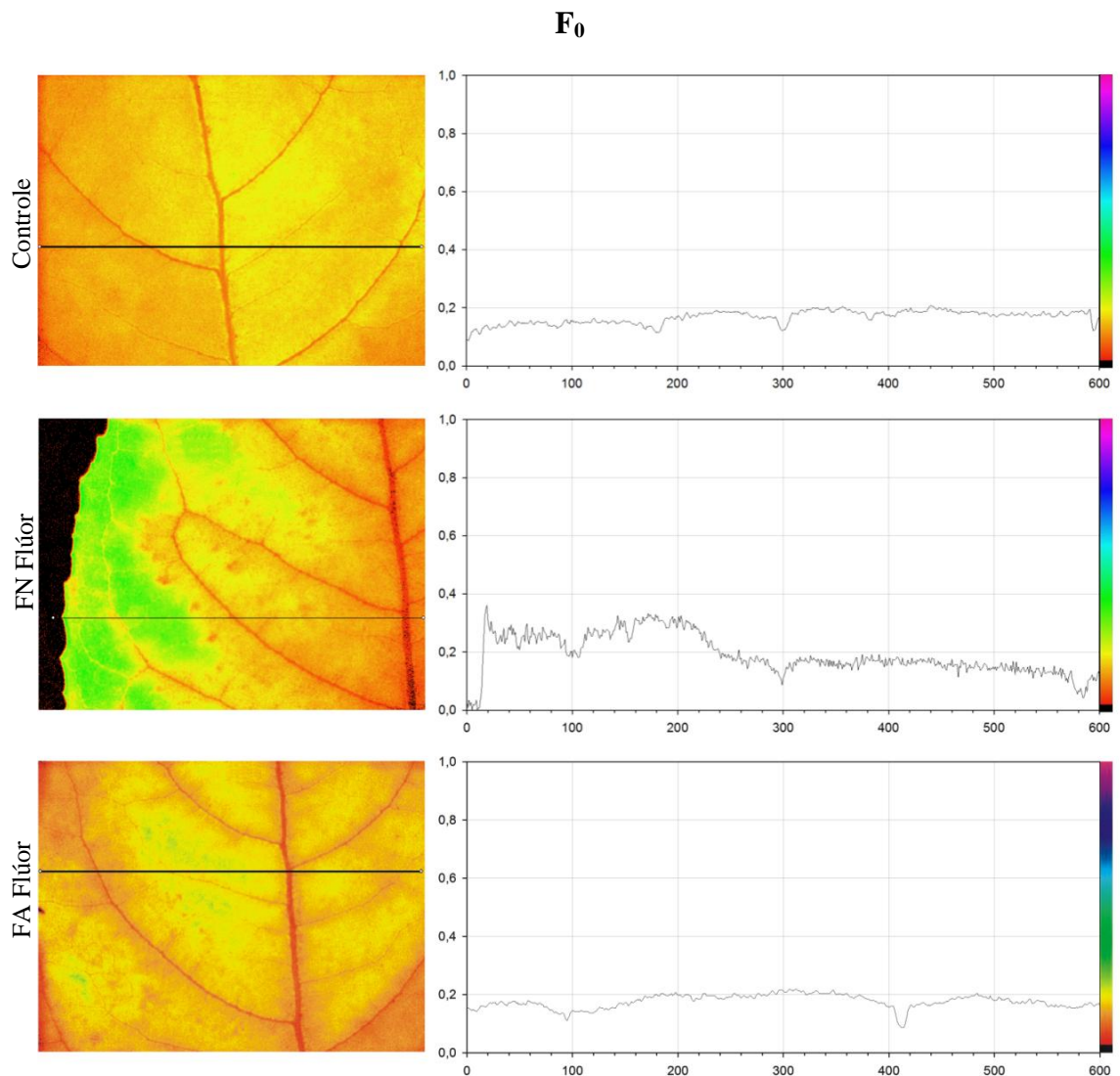
As imagens da fluorescência da clorofila *a* demonstraram diminuição dos valores de  $F_v/F_m$  na margem (0,69) de FN exposta ao flúor e porções do centro do limbo foliar (0,75) o que representa decaimento do potencial máximo de eficiência fotoquímica no PSII (Figura 13). Este decaimento pode ser verificado pelo clareamento da intensidade da cor azul tendendo ao verde em FN exposta ao flúor. A coloração e os valores de  $F_v/F_m$  não variaram ao longo da extensão do limbo em FA tratada com flúor, mas foram os valores foram ligeiramente inferiores aos do controle.



**Figura 13**

Razão  $F_v/F_m$  no Controle, folha adulta (FA) e folha nova (FN) de candeia, demonstrado em escalas de cores. O gráfico representa a emissão de fluorescência ao longo do transecto traçado em determinado local da AOI, representativa de uma porção limbo foliar. Análises realizadas ao final do período experimental.

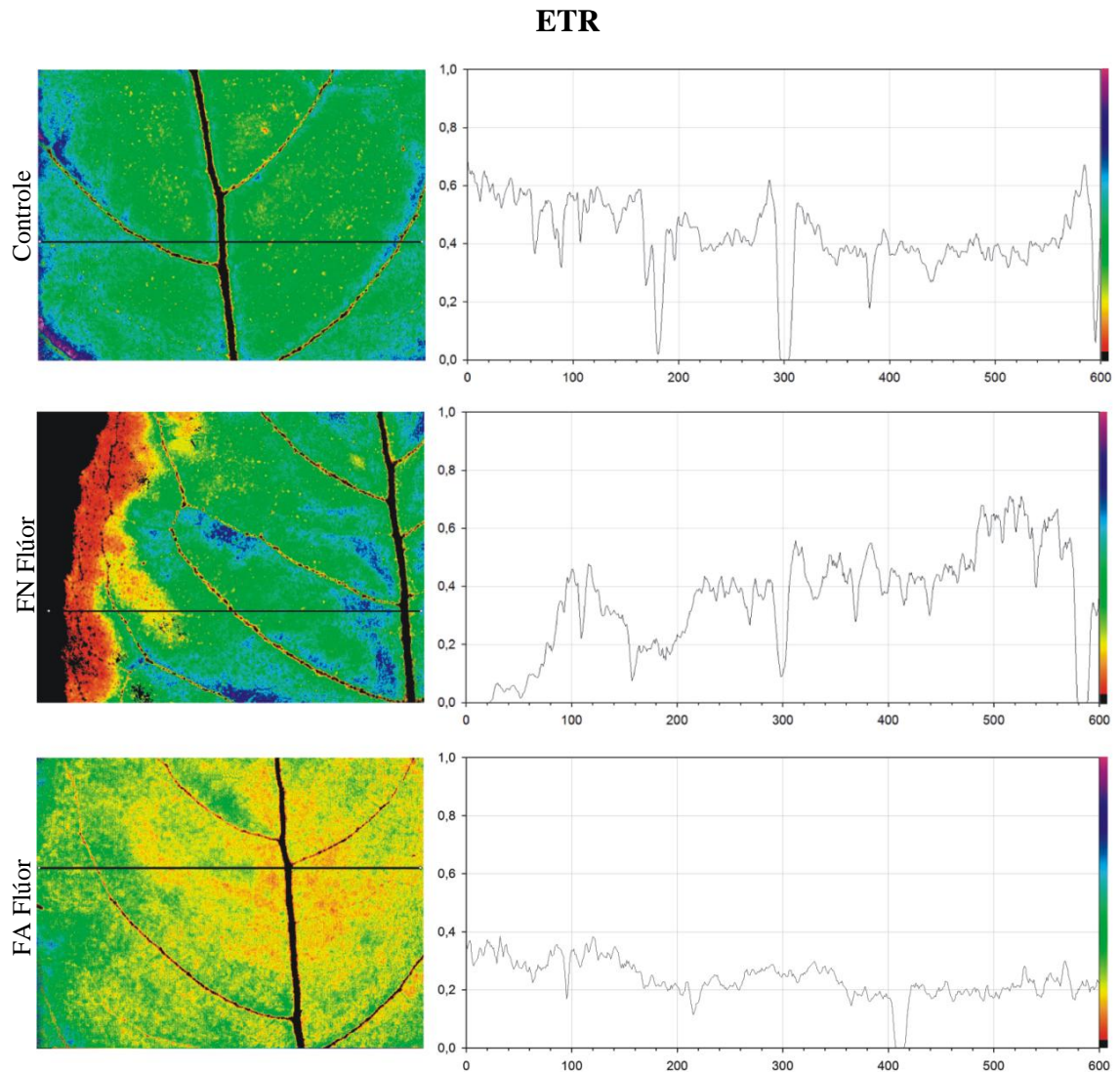
Para  $F_0$ , a coloração verde vivo observada na margem, equivalente a valores entre 0,38, em contraste ao vermelho alaranjado, equivalente a valores entre 0,18 observado tanto em FN do controle quanto no centro do limbo foliar de FN tratada com flúor, indicam aumento no valor de  $F_0$  na borda de FN exposta ao flúor. Não observamos diferenças de coloração em FA exposta ao flúor (Figura 14).



**Figura 14**

Fluorescência mínima ( $F_0$ ) do controle, de folha adulta (FA) e folha nova (FN) exposta ao flúor de *E. erythropappus*, demonstrado em escalas de cores, que vai de 0,0 a 1,0. O gráfico representa a emissão de fluorescência ao longo do transecto traçado em determinado local da AOI, representativa de uma porção limbo foliar. Análises realizadas ao final do período experimental.

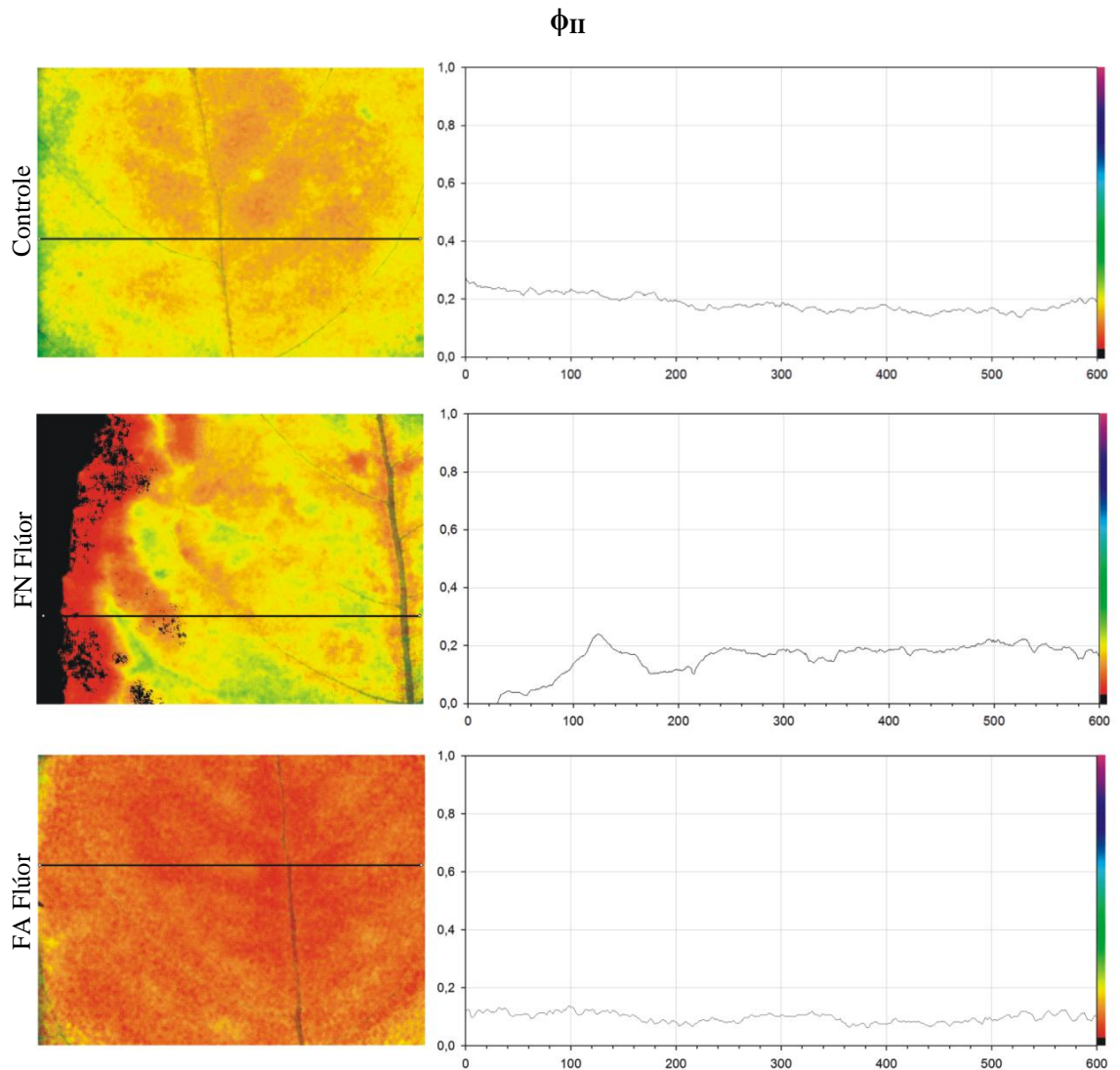
As regiões amareladas e avermelhadas, localizadas na margem do limbo foliar de FN e no centro do limbo de FA, demonstram decaimento na taxa de transporte linear de elétrons para o PSII nos tratamentos contendo flúor, ficando esta abaixo de 0,4 (Figura 15). Em contraste regiões verde e azuis indicam taxa de transporte de elétrons maiores acima de 0,6 e podem ser observadas no controle e porções centrais do limbo de FN tratadas com flúor.



**Figura 15**

ETR ou taxa linear de transporte de elétrons do controle, de folha adulta (FA) e folha nova (FN) exposta ao flúor de *E. erythropappus*, demonstrado em escalas de cores, que vai de 0,0 a 1,0.. O gráfico representa a emissão de fluorescência ao longo do transecto traçado em determinado local da AOI, representativa de uma porção limbo foliar. Análises realizadas ao final do período experimental.

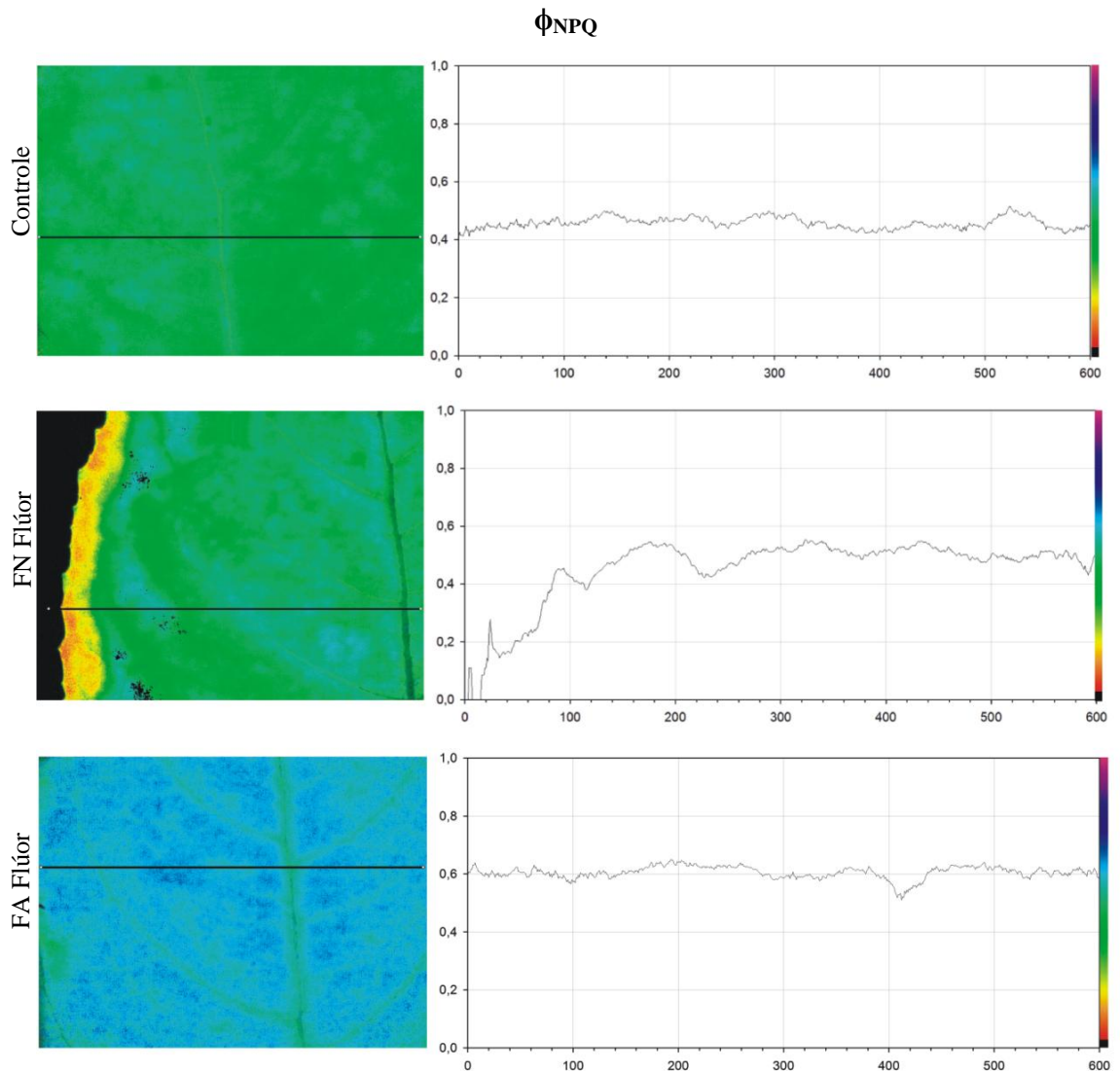
Observa-se diminuição nos valores do  $\phi_{II}$  nas bordas (< 0,1) e porção central (<0,1) de FN expostas ao flúor, assim como no centro do limbo foliar de FA (< 0,2), onde a cor vermelha e laranja são predominantes (Figura 16). Em porções do limbo que apresentam coloração amarelada e esverdeada (0,25) indicam valores maiores no rendimento quântico efetivo do PSII, observadas no tratamento controle e porção central do limbo de FN exposta ao flúor (Figura 16).



**Figura 16**

Rendimento quântico efetivo do PSII do controle, de folha adulta (FA) e folha nova (FN) exposta ao flúor de *E. erythropappus*, demonstrado em escalas de cores, que vai de 0,0 a 1,0. O gráfico representa a emissão de fluorescência ao longo do transecto traçado em determinado local da AOI, representativa de uma porção limbo foliar. Análises realizadas ao final do período experimental.

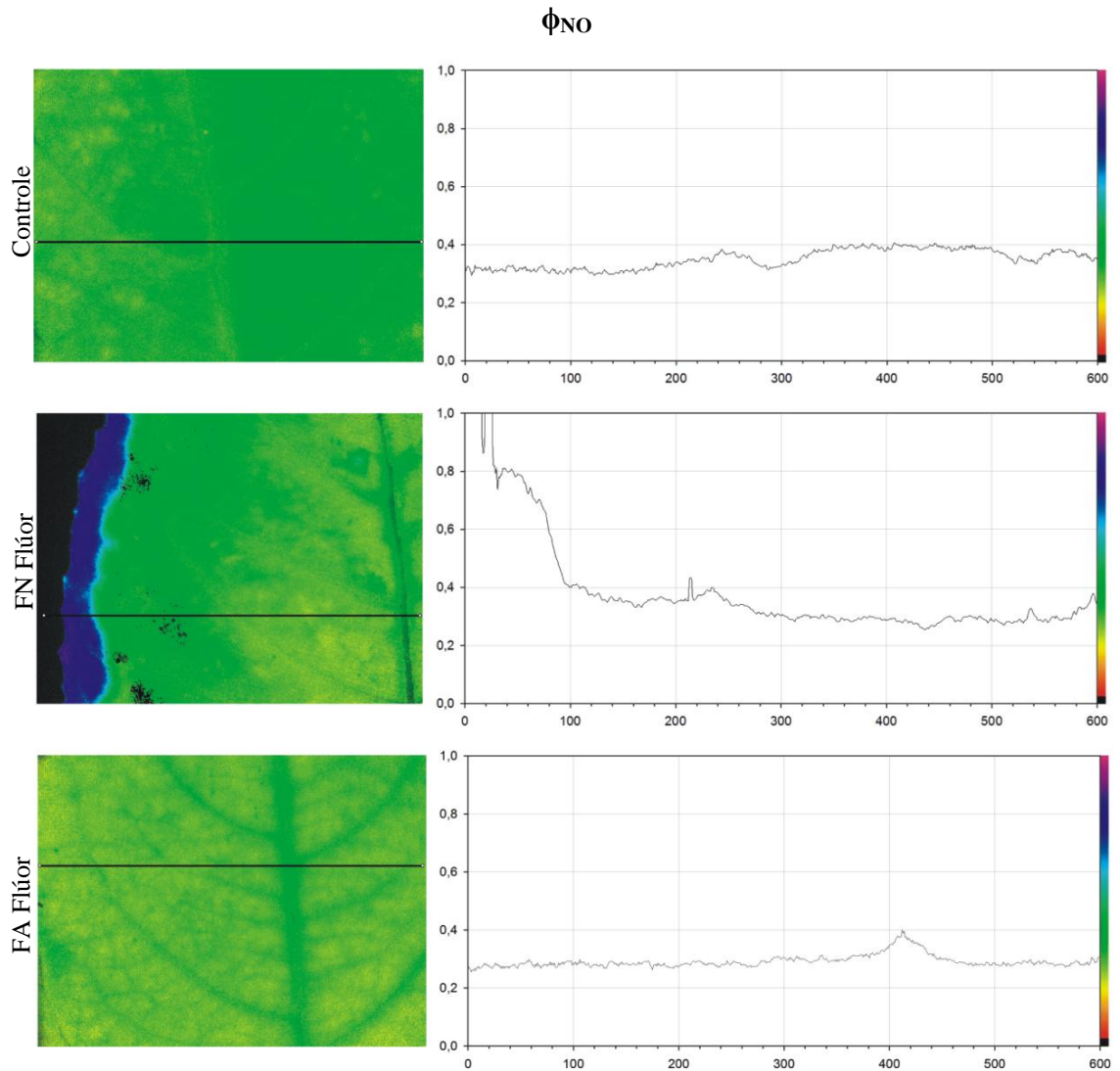
O rendimento quântico da dissipação regulada de energia  $\phi_{NPQ}$  foi relativamente maior em toda a extensão do limbo foliar de FN e FA exposta ao flúor em relação ao controle, o que pode ser observado pela predominância da sua coloração verde azulada (0,5) e azul (0,6) se comparado ao controle, que mostrou predominância de áreas esverdeadas (0,4) (Figura 17). Ao analisar apenas as bordas foliares das FN tratadas com flúor constata-se queda dos valores de  $\phi_{NPQ}$  ( $<0,2$ ).



**Figura 17**

Rendimento quântico da dissipação regulada de energia do controle, de folha adulta (FA) e folha nova (FN) exposta ao flúor de *E. erythropappus*, demonstrado em escalas de cores, que vai de 0,0 a 1,0. O gráfico representa a emissão de fluorescência ao longo do transecto traçado em determinado local da AOI, representativa de uma porção limbo foliar. Análises realizadas ao final do período experimental.

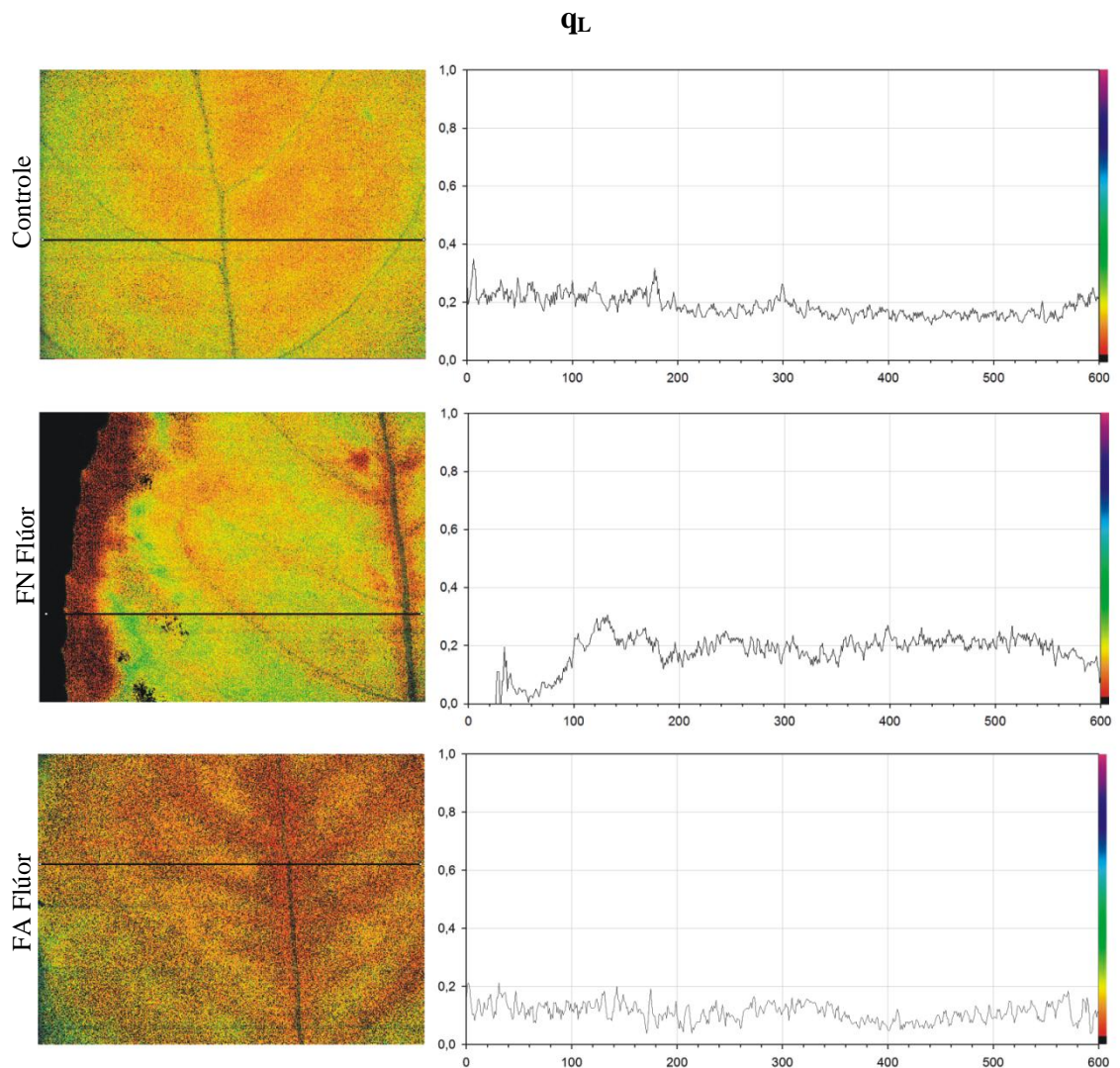
A imagem da fluorescência mostra aumento do  $\phi_{NO}$  na margem de FN exposta ao flúor, que apresenta uma coloração violeta, azulada e verde escura. Folha do controle apresenta coloração verde amarelada, assim como FA exposta ao flúor, o que representa menor rendimento da dissipação não regulada de energia (Figura 18).



**Figura 18**

Rendimento quântico da dissipação não regulada de energia do controle, de folha adulta (FA) e folha nova (FN) exposta ao flúor de *E. erythropappus*, demonstrado em escalas de cores, que vai de 0,0 a 1,0. O gráfico representa a emissão de fluorescência ao longo do transecto traçado em determinado local da AOI, representativa de uma porção limbo foliar. Análises realizadas ao final do período experimental.

A análise da imagem da fluorescência mostra diminuição do  $q_L$  na margem de FN exposta ao flúor ( $<0,1$ ) e em toda extensão do AOI de FA exposta ao flúor ( $<0,2$ ), que apresentam coloração vermelho escura, e alaranjada. O controle apresenta coloração esverdeada e amarelada na sua porção marginal (0,39), o que significa maior fração de centros de reação do PSII abertos (Figura 19).

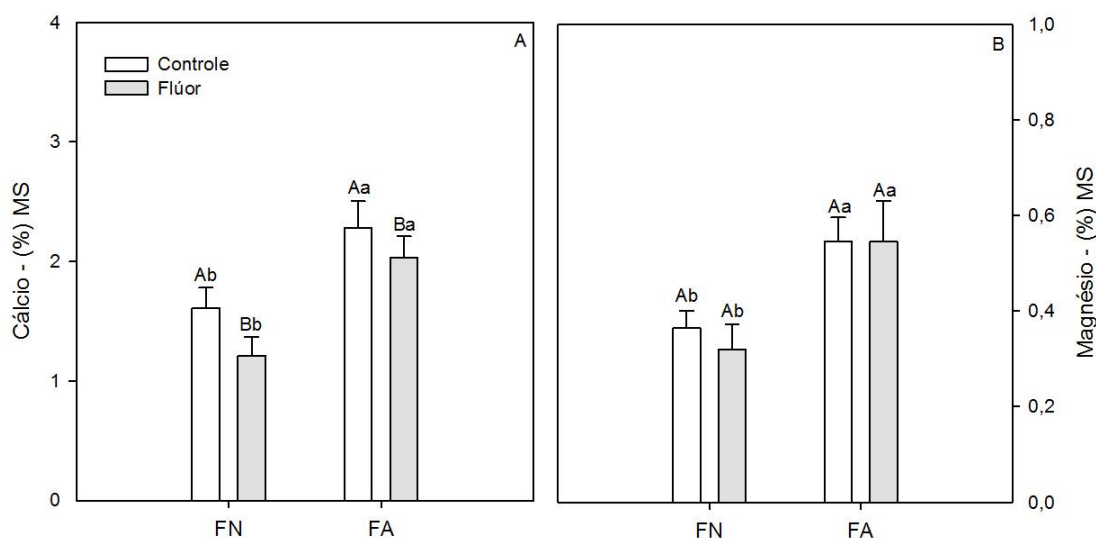


**Figura 19**

Fração dos centros de reação do PSII oxidados ( $q_L$ ) do controle, de folha adulta (FA) e folha nova (FN) exposta ao flúor de *E. erythropappus*, demonstrado em escalas de cores, que vai de 0,0 a 1,0. O gráfico representa a emissão de fluorescência ao longo do transecto traçado em determinado local da AOI, representativa de uma porção limbo foliar. Análises realizadas ao final do período experimental.

## Análise de Cálcio e Magnésio em Folhas de Candeia

A quantificação do conteúdo de cálcio e magnésio das folhas de candeia mostrou que FN tratada com flúor contém menor teor de cálcio se comparada a FN do controle ( $P < 0,05$ ). Constatou-se também que FN, tanto do controle como tratadas com flúor, possuem menores teores de cálcio e magnésio quando comparadas com FA tanto do controle quanto expostas ao flúor ( $P < 0,05$ ) (Figura 20).



**Figura 20**

Conteúdo de cálcio e magnésio na matéria seca de folhas novas (FN) e folhas velhas (FA), de *E. erythropappus* tratadas ou não com flúor ao final do período experimental. Médias seguidas de uma mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas indicam a comparação entre tratamentos e letras minúsculas indicam a comparação entre idades da folha de cada tratamento. Barras verticais indicam desvio padrão das médias.

## **Efeito do Flúor Sobre a Estrutura Foliar**

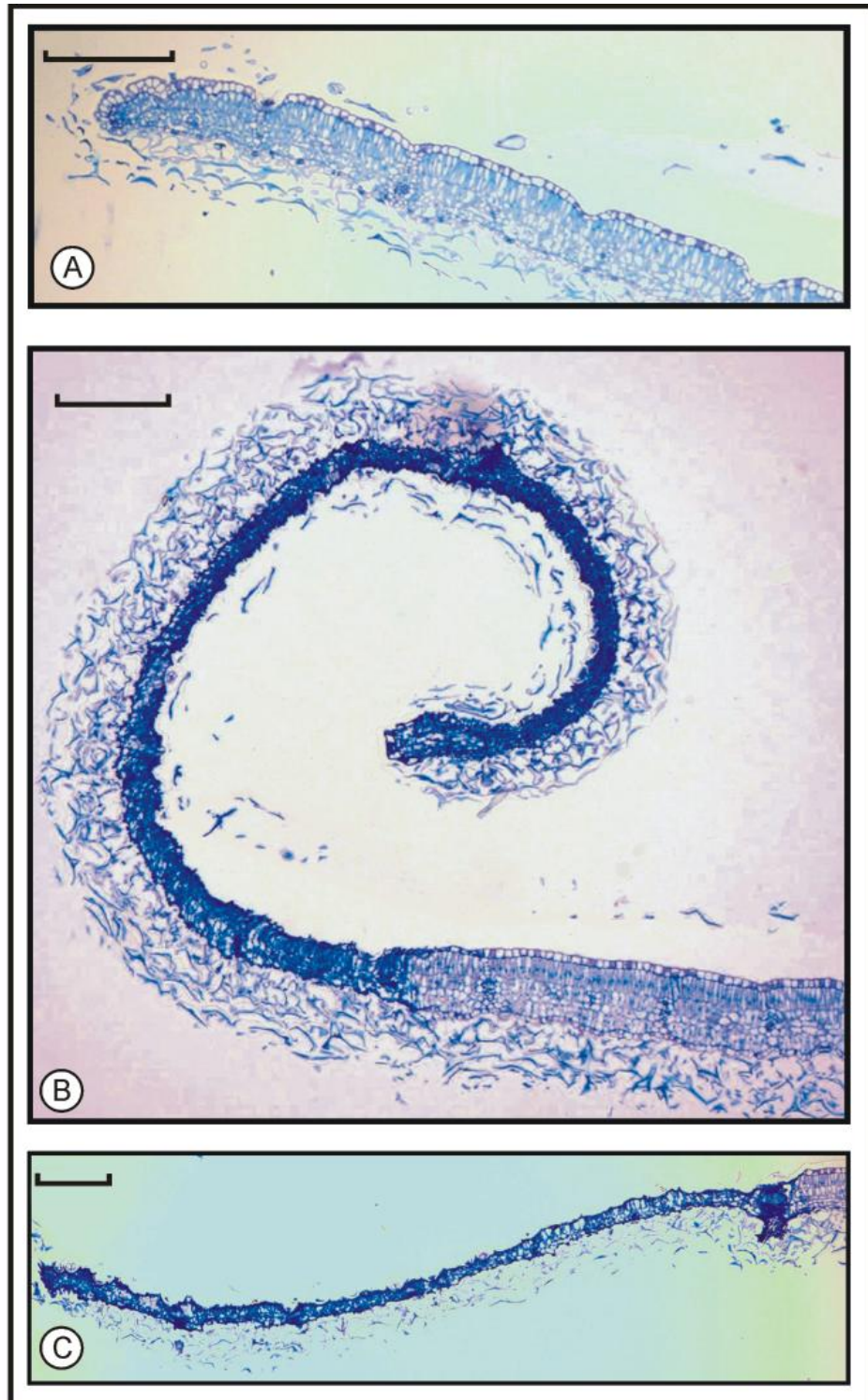
A análise anatômica das FN e FA de *E. erythropappus* do tratamento controle mostrou folhas dorsiventrais e hipoestomáticas, com única camada de células epidérmicas tanto na face adaxial quanto na face abaxial da folha (Figuras 21-A, 22-A e B, 23-A e B). Duas camadas de células no parênquima paliçádico logo abaixo da epiderme da face adaxial, seguida de parênquima lacunoso (Figuras 21-A, 22-A, 22-B, 23-A, 23-B). Na face abaxial de FN do controle constatou-se maior densidade de tricomas quando comparado a FA do controle (Figuras 21-A, 22-A e B, 23-A e B). Foi observada tanto em FA quanto em FN do tratamento controle, cristais de oxalato de cálcio, presentes em um grande número de células do mesofilo (Figura 24-A e B). Alterações na anatomia das folhas de candeia tratadas com flúor, em FN ficaram evidentes após o término do período experimental, entretanto em FA as alterações foram inconspícuas e menos acentuadas (Figura 21).

Observou-se redução da expansão celular, associada a uma alta densidade de tricomas, principalmente na face abaxial da folha, em FN tratadas com flúor, quando comparadas a folhas do controle (Figura 21-B). Constatou-se completa desestruturação do mesofilo, na porção aparentemente sadia, em FN, demonstrando a interferência do flúor no processo de diferenciação celular (Figura 22-D). Após término do período experimental, em algumas FN expostas ao flúor houve grande aumento no número de células do mesofilo (Figura 22-D), que não se diferenciaram em parênquima paliçádico e lacunoso, como observado nas folhas do controle (Figura 22-B). A hiperplasia celular com aumento na espessura da lâmina foliar e a diminuição dos espaços intercelulares no parênquima lacunoso foram constatadas no mesofilo de FN exposta ao flúor, quando comparado com FN do controle (Figuras 22-D, 23-C e 23-F). Observou-se também o surgimento de mais uma camada de células epidérmicas na face adaxial das FN, além de alterações na forma, tamanho e organização das células epidérmicas de FN tratada com flúor (Figuras 22-D e 22-F).

Nas regiões entre as áreas necrosadas e não necrosadas, em FN com flúor, não se observou uma transição gradativa, nesta região houve colapso tecidual e formação de necrose de forma abrupta. O mesofilo apresenta aspecto túrgido de um lado seguido de colapso completo do mesofilo logo em seguida sem desenvolvimento do tecido de cicatrização (Figuras 22-F e 23-D).

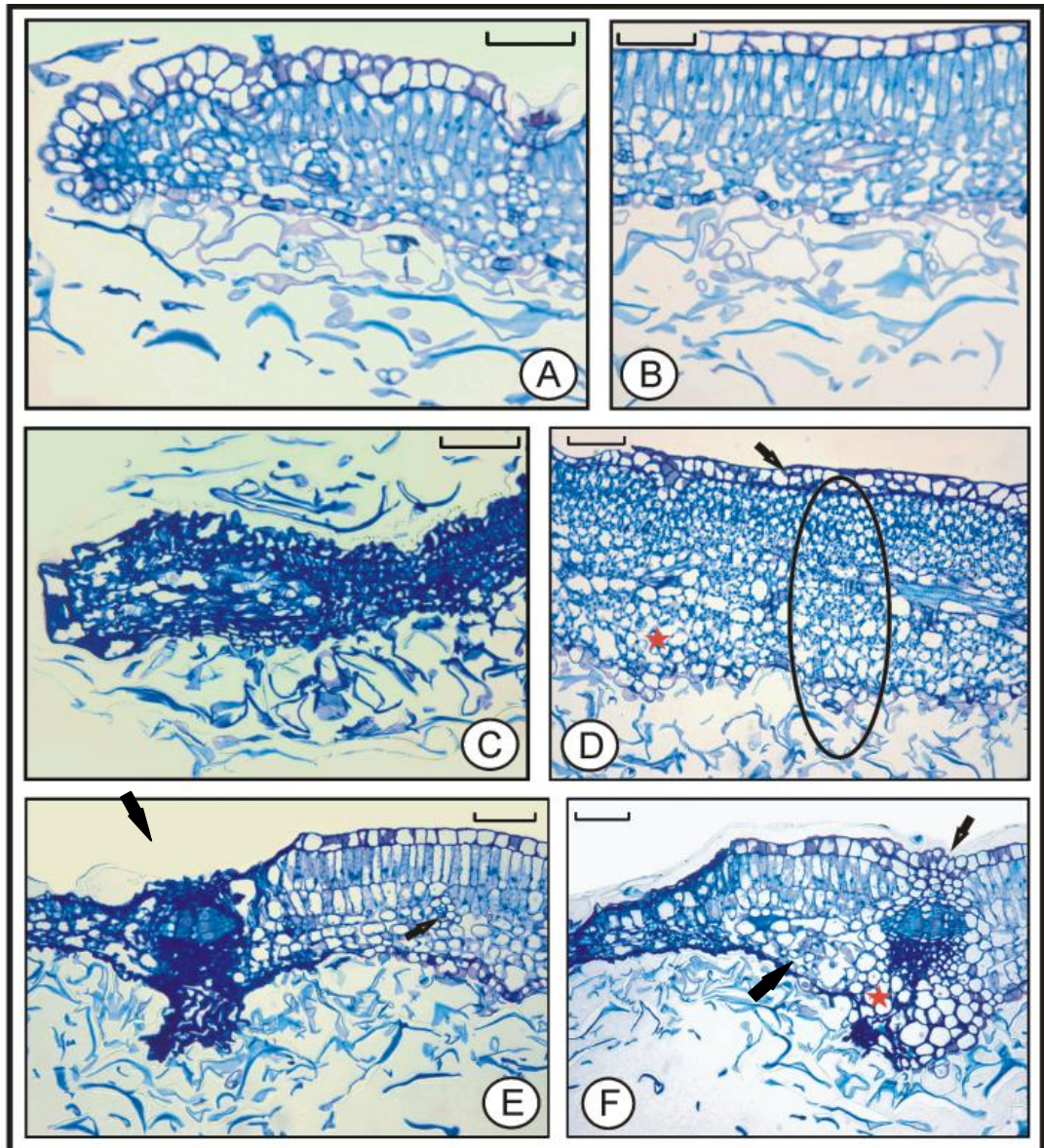
Mesmo em FA tratada com flúor, constatou-se haver alterações a nível celular, apesar de não terem ficado visualmente evidentes no limbo foliar. Colapso de células do parênquima paliçádico, discreta hiperplasia das células do parênquima lacunoso, alteração no formato e tamanho nas células epidérmicas da face abaxial, colapso de células guarda foram as principais alterações das FA expostas ao flúor. (Figura 23-E e 23-G).

Tanto em FA quanto em FN tratadas com flúor houve aumento na quantidade e tamanho dos cristais de oxalato de cálcio presentes nas células do mesofilo em relação as folhas do controle, que apesar de possuírem cristais, estes se mostraram menores e em menor quantidade (Figura 24).



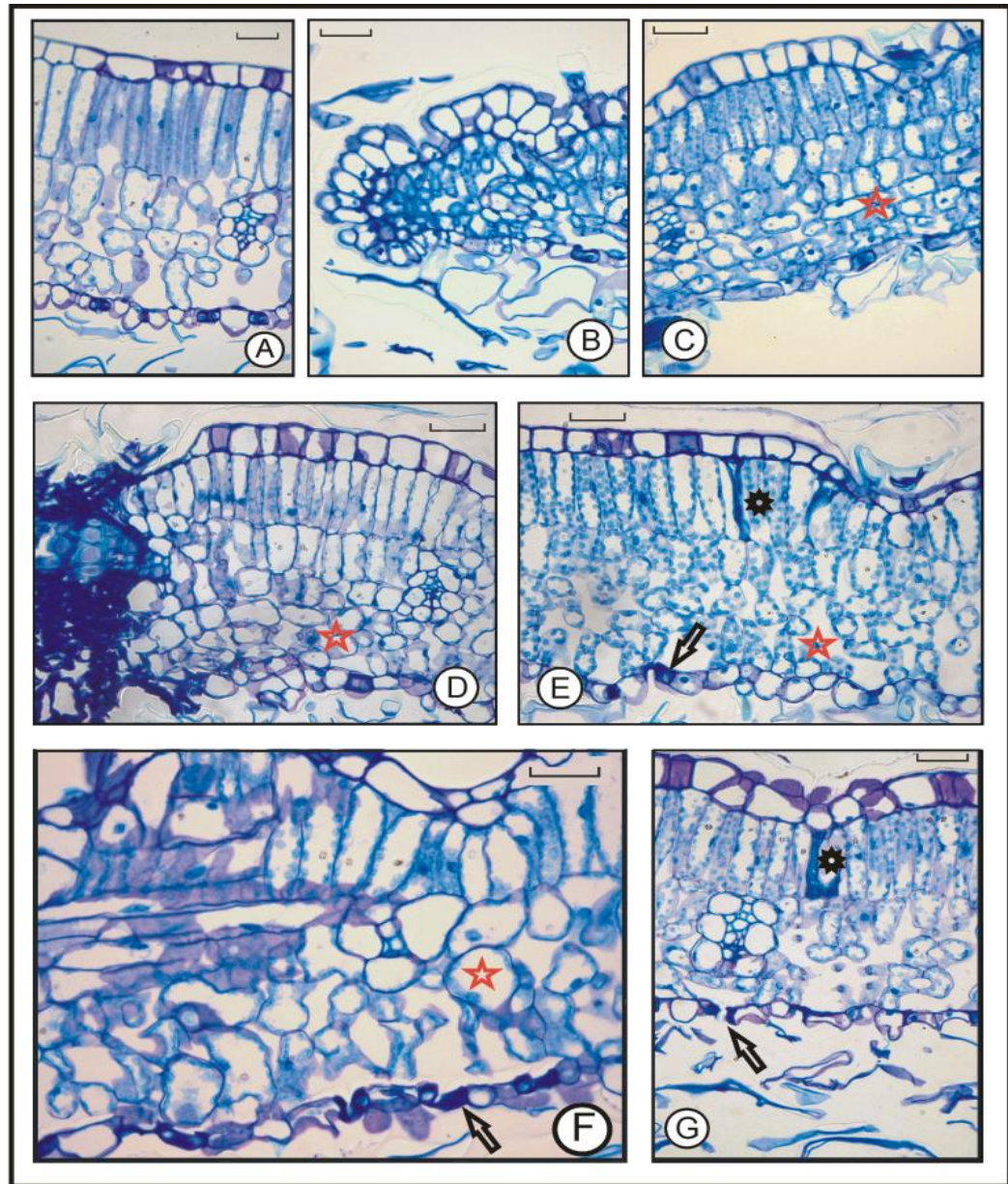
**Figura 21**

Folhas jovens (FN) de *E. erythropappus* após cinquenta e cinco dias de exposição ao nevoeiro simulado contendo ou não flúor, em cortes transversais. A – Tratamento controle, apresentando estrutura foliar intacta. B e C – Alterações em FN expostas ao flúor apresentando, enrolamento e necrose da região marginal do limbo e redução na espessura da lâmina foliar. Barras equivalem a 1mm.



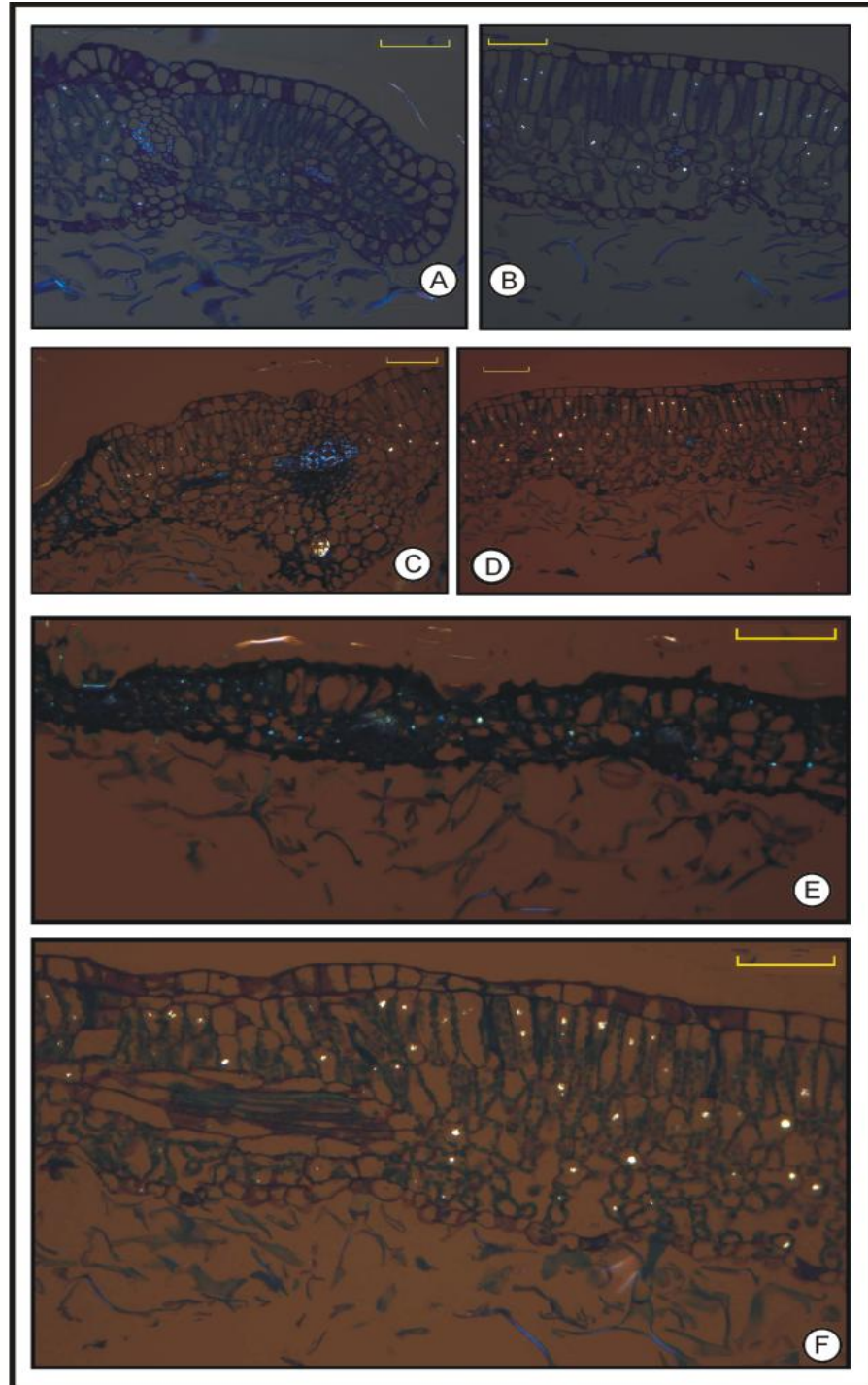
**Figura 22**

Alterações estruturais em folhas jovens de *E. erythropappus* submetidas ao flúor (C, D, E e F) em comparação com o tratamento controle (A e B) em cortes transversais. A e B – Margem foliar e lamina foliar de FN do tratamento controle respectivamente. C – Margem foliar completamente necrosada, em volta a ocorrência de tricomas. D – Lâmina foliar com estrutura completamente alterada. A seta chama a atenção para o aumento no número de células da epiderme na face adaxial. A elipse demonstra alterações no padrão de diferenciação celular. A estrela vermelha indica a hiperplasia celular no mesofilo. E – Região da necrose, com colapso total do feixe vascular. F – Região de necrose próximo à nervura, com colapso dos tecidos da lâmina foliar e alterações na epiderme da face abaxial na região próxima a nervura, e na face adaxial na região da nervura. Estrela vermelha indica colapso de células na nervura e seta indica alterações na epiderme logo acima da bainha do feixe. Barras equivalem 200 $\mu$ m.



**Figura 23**

Alterações estruturais em folhas jovens FN e folhas adultas FA de *E. erythropappus* submetidas ao flúor (C, D, E, F e G) em comparação com o tratamento controle (A e B) em cortes transversais. **A** – Lamina foliar de FN evidenciando o mesofilo de folhas do tratamento controle. **B** – Margem foliar de FA do tratamento controle. **C** – Mesofilo de FN exposto ao flúor. A estrela vermelha indica a diminuição dos espaços intercelulares no parênquima lacunoso. **D** – Mesofilo de FN exposto ao flúor. Região de início da necrose, com estrela vermelha indicando hiperplasia das células do parênquima lacunoso. **E** – Mesofilo de FA exposto ao flúor. A seta chama a atenção para alteração das células guarda. Estrela vermelha indica desestruturação do parênquima lacunoso. O asterisco indica o colapso celular no parênquima paliçádico **F** – Mesofilo de FN exposto ao flúor. Seta mostra o colapso da célula guarda do estômato e a estrela vermelha indica a hiperplasia de célula no parênquima lacunoso. Toda a estrutura mesofílica esta alterada. **G** – Mesofilo de FA exposto ao flúor. Seta indica colapso das células guarda do estômato, que ficou com ostíolo permanentemente aberto. O asterisco mostra colapso de células do parênquima paliçádico. Barras equivalem 100μm.



**Figura 24**

Presença de cristais de oxalato de cálcio em folhas jovens FN e folhas adultas FA de *E. erythropappus* submetidas ao flúor (**C, D, E e F**) em comparação com o tratamento controle (**A e B**) em cortes transversais avaliados sob luz polarizada. Pontos luminosos dentro da célula indicam a presença dos cristais. **A e B**– Borda foliar de FN e lâmina foliar de FA do tratamento controle respectivamente. **C** – Região de nervura secundária de FN. **D** – Mesofilo de FA. **E** – Região de necrose do mesofilo de FN exposto ao flúor. Os cristais de oxalato de cálcio persistem após a necrose do tecido. **F** – Mesofilo de FN exposto ao flúor. Barras equivalem 100µm.

## Discussão

Após o término do período experimental, as plantas tratadas com o flúor apresentaram desenvolvimento visualmente reduzido e frequente necrose dos primórdios foliares. Um dos efeitos intracelulares do fluoreto é a inibição da enolase, resultando no desvio do fluxo de carbonos da rota glicolítica para a rota das pentoses. Este fato leva a diminuição da eficiência na síntese de ATP, diminuindo o desenvolvimento vegetal (Reddy e Kaur 2008; Divan Junior *et al.* 2008). A redução no crescimento vegetal e na produtividade, por consequência da menor capacidade fotossintética, irá ocorrer em concentrações de flúor menores do que a concentração que causa injúria visível nas folhas (Boese, 1994).

Apesar da avaliação das trocas gasosas não ter demonstrado queda na fotossíntese, essa medida foi realizada em porções aparentemente saudáveis do limbo foliar. Certamente a capacidade fotossintética das FN foi comprometida uma vez que houve desenvolvimento de necrose na borda do limbo foliar, alteração essa que pode influenciar o desenvolvimento do vegetal. Além disso o flúor pode interagir com diversos componentes do metabolismo celular, controlando ou inibindo a conversão de açúcares em amido, inibir o funcionamento da ATPase cloroplastídica e da ribulose 1,5 bisfosfato, interferindo assim no desenvolvimento e na produtividade do vegetal (Fornasiero 2003; Boese, 1994).

Na preparação do nevoeiro simulado, o fluoreto de sódio (NaF) foi adicionado a água desionizada e, como produto da dissociação deste sal, há formação de flúor ionizado em solução, que ao se ligar aos prótons livres, forma ácido fluorídrico (Miller 1993). Durante a aplicação, a solução de flúor se deposita na superfície foliar ou é absorvida pelos estômatos alcançando o apoplasto, entretanto, apenas o ácido fluorídrico pode transpor a barreira da membrana plasmática (Miller 1993). A absorção e o acúmulo de flúor em tecidos vegetais dependem de diversos fatores, dentre eles citam-se: características morfológicas e fisiológicas, o estágio de desenvolvimento, ciclo de vida, anatomia, mecanismos de desintoxicação, translocação e eliminação do poluente, que interferem diretamente na ação do poluente (Arndt *et al.* 1995).

A grande densidade de tricomas verificada nas FN de candeia, associada à maior taxa metabólica atribuída ao estágio de desenvolvimento pode ter influenciado na equivalência do teor de flúor acumulado no tecido vegetal entre FN e FA. No caso de candeia, no presente experimento, a grande densidade de tricomas em FN pode representar uma barreira para a entrada do flúor via estômato, ou um sítio de acúmulo do mesmo. Deve-se considerar que, quando maduros, os tricomas se tornam hidrofóbicos e representam uma barreira para absorção de flúor, para transpiração e trocas gasosas. Entretanto, quando em processo de desenvolvimento, as paredes dos tricomas não estão completamente espessadas o que lhes confere características hidrofílicas que facilitarão o acúmulo de solutos aquosos e flúor. Sendo assim, maiores detalhes acerca da barreira de tricomas devem ser avaliadas para um melhor entendimento da dinâmica de trocas gasosas e acúmulo de flúor nesta porção da folha de candeia.

Após 55 dias de período experimental, as plantas de candeia foram consideradas tolerantes ao flúor, uma vez que acumularam mais do que o dobro do valor padrão de referência de toxidez para plantas sensíveis, indicado por VDI-Ritchline. 2310-1980. Apesar de terem sido expostas a elevadas concentrações de flúor, os sintomas de toxidez ocorreram apenas nas FN, os quais se desenvolveram durante o período de exposição ao flúor. O fator determinante na sintomatologia apresentada por FN pode estar relacionado a presença do flúor durante o desenvolvimento e sua interferência na diferenciação celular. Oliva e Figueiredo (2005) constataram que *Panicum maximum* cv. Colonião, *Paspalum notatum*, e *Melinis minutiflora* foram as mais sensíveis ao flúor entre 11 espécies de gramíneas testadas, apresentaram sintomas de toxidez já no segundo dia de aplicação do flúor. Ribeiro (2008) verificou maior sensibilidade de *P. maximum*, que acumulou  $16 \mu\text{g g}^{-1}$  MS de flúor com quinze dias de exposição, e aparecimento de sintomas após dois dias de exposição. Ribeiro (2008) verificou maior tolerância de candeia dentre quatro espécies testadas, após trinta dias de exposição a uma concentração de flúor de  $15 \text{ mg L}^{-1}$ .

Deve-se ressaltar que candeia, até os primeiros 30 dias de exposição ao flúor, acumulou relativamente baixos teores de fluoreto em sua matéria seca, teores estes menores que os valores de referência de  $30 \mu\text{g g}^{-1}$  de flúor na MS (VDI-Ritchline.2310 1980), mesmo sendo exposta a alta concentração.

Este fato pode indicar a existência de uma barreira à entrada do flúor nas folhas de candeia. Apenas com a continuidade do experimento por mais 25 dias resultou em um acúmulo de flúor considerado elevado, e mesmo aos 55 dias com  $67,42 \mu\text{gF}^{-1}\text{g}^{-1}$  de flúor na matéria seca não foram suficientes para causar alterações significativas de fotossíntese ou anatomia nas FA de candeia.

Silva *et al.* (2000), ao submeter espécies arbóreas a chuva simulada contendo flúor, observaram ápice retorcido e desenvolvimento de necrose em folhas jovens de *Joannesia princeps* e *Peltophorum dubium*, assim como observado em candeia. A resposta das plantas aos poluentes varia com o seu estágio de desenvolvimento, sendo as folhas mais jovens, recém-expandidas ou próximas à total expansão, mais sensíveis a este elemento (Kozłowski 1980). Chaves *et al.* (2002) e Oliva e Figueiredo (2005) concluíram que folhas em desenvolvimento expostas ao flúor são proporcionalmente mais sensíveis a este poluente se comparadas as folhas já desenvolvidas, principalmente pela alta taxa metabólica.

Constatou-se, no presente estudo, que a distribuição do flúor deve ser espacialmente diferenciada no limbo foliar de candeia, devido as necroses localizadas e ausência de alterações fisiológicas no centro do limbo. Esse fato também foi observado em plantas de uva cultivadas sob poluição atmosférica contendo flúor, onde houve maior acúmulo e desenvolvimento da necrose na margem foliar, e menor teor de flúor na porção central do limbo, que demonstrou aspecto sadio (Abdallah 2006). As alterações morfológicas foram conseqüências das evidentes alterações anatômicas constatadas posteriormente em FN, assim como a integridade da FA reflete as poucas alterações de sua anatomia. Há freqüentes evidências de que plantas tratadas com flúor demonstrem alterações significativas em parâmetros anatômicos, fisiológicos e bioquímicos (Façanha e De Meis 1995; Fornasiero 2001; Fornasiero 2003; Oliva e Figueiredo 2005; Peixoto 2005; Reddy e Kaur 2008).

As alterações em FN de candeia expostas ao flúor apontam para dois mecanismos distintos de alteração causados pelo flúor nos tecidos da folha de candeia: quando FN está em processo de diferenciação o flúor pode interferir no padrão de formação dos tecidos, e quando a FN esta com seus tecidos já diferenciados, mas ainda em expansão, o flúor pode causar diretamente colapso celular e hiperplasia celular no

mesófilo, epiderme e estômatos. Azevedo (1995), Fornasiero (2001) e Sant'anna-Santos *et al.* (2007) ao testar diversas espécies, ressaltaram danos severos a epiderme de folhas jovens e sem sintomatologia, submetidas a chuva simulada contendo flúor. Em altas concentrações de flúor as injúrias podem ser severas afetando a folha inteira tornando-se generalizadas (Arndt 1995; Fornasiero 2001; Fornasiero 2003; Fortes *et al.* 2003; Peixoto 2005; Oliva e Figueiredo 2005).

Danos parciais a epiderme de FN submetidas ao flúor, apresentando enrugamento da superfície foliar, foram observados em candeia tratadas com flúor. Assim como Silva *et al.* (2000) verificou que o flúor promoveu alterações na lâmina foliar de *Spondia dulcis*, a qual apresentou áreas necrosadas, plasmólise em células da epiderme adaxial e colapso do parênquima paliçádico, do parênquima lacunoso e da epiderme abaxial, permanecendo nítidas, algumas vezes, as regiões estomáticas. Em *Panicum maximum*, Chaves *et al.* (2002) observaram a ocorrência de lesões em células guarda causando lesões estomáticas em consequência da toxidez do flúor, tal como foi constatado na anatomia de FN em candeia. A análise ultraestrutural de células do mesófilo de *Hipericum perforatum*, *Artemisia* e soja submetidas ao flúor, constataram colapso celular, resultante do rompimento das membranas e alterações da parede celular (Azevedo 1995 e Fornasiero 2001).

As FN de candeia tratadas com flúor demonstraram enrolamento da margem foliar no sentido adaxial, o que potencializou o acúmulo da solução de fluoreto, predispondo o limbo foliar a uma maior absorção de flúor. A solução de fluoreto se deposita e permanece empossada, o que pode aumentar o tempo de exposição da superfície foliar e conseqüentemente o tempo de absorção do flúor nestas regiões. Uma vez no apoplasto, o HF passa para sua forma iônica, sendo bastante móvel, é arrastado pela corrente transpiratória no sentido do centro para a borda foliar, acumulando-se nos ápices e margens das folhas, locais de maior taxa transpiratória, onde atinge concentrações tóxicas (Miller, 1993; Azevedo 1995; Klump 1998; Chaves *et al.* 2002; Fortes *et al.* 2003; Weinstein, 2003; Kamaluddin 2003; Oliva e Figueiredo 2005). Em virtude do sentido de enrolamento da necrose, observado nas FN de candeia, e das alterações anatômicas constatadas, há indícios de que a epiderme adaxial é a primeira a ser danificada pela ação do flúor, enquanto o

mesófilo e a epiderme abaxial continuam a se desenvolver promovendo o enrolamento da borda no sentido adaxial.

Clorose circular e posterior necrose foliar são considerados os primeiros sintomas visuais da injúria causada por flúor em plantas, com desintegração dos cloroplastos, vacúolos e colapso das células. (Boese *et al.* 1994; Silva *et al.* 2000; Fornasiero 2001; Chaves *et al.* 2002; Fornasiero 2003; Peixoto 2005; Sant'Anna-Santos *et al.* 2007; Reddy e Kaur 2008). As injúrias foliares observadas em candeia foram extensivamente documentado para toxidez por flúor (Boese *et al.* 1994; Azevedo 1995; Silva *et al.* 2000; Fornasiero 2001; Chaves *et al.* 2002; Fornasiero 2003; Peixoto 2005; Sant'Anna-Santos *et al.* 2007).

Chaves *et al.* (2002) constataram que uma maior proporção de folhas em desenvolvimento apresentou sintomas visíveis de toxidez por flúor se comparadas as folhas completamente expandidas expostas a este elemento em plantas de *Chloris gayana* e *Panicum maximum*. A clorose foliar, típico sintoma da toxidez por flúor em plantas, é atribuída a alterações metabólicas na síntese de pigmentos e colapso dos cloroplastos (McNulty 1961; Arndt 1995; Bustamante 2003; Fornasiero 2003; Oliva e Figueiredo 2005; Reddy e Kaur 2008). Chaves *et al.* (2002) observaram que nas folhas em expansão prevaleceram clorose marginal e início de necrose no ápice foliar em decorrência da toxidez por flúor, assim como observado para candeia neste estudo. As FN submetidas ao flúor, além de necrose da margem e ápice foliar, apresentaram coloração verde-escura no centro do limbo e menores dimensões foliares, tal como observado por Miller (1993), Azevedo (1995), Klump (1998), Chaves *et al.* (2002), Fortes *et al.* (2003), Weinstein (2003), Fortes (2003), Kamaluddin (2003), Oliva e Figueiredo (2005) entre outros.

Nas FN e FA de candeia tratadas com flúor não foram observadas diferenças nos teores de clorofilas e carotenóides na comparação entre o controle. Em contrapartida McNulty e Newman (1961) constataram que o aumento na concentração de flúor na folha é inversamente proporcional ao conteúdo de pigmentos por desintegração dos cloroplastos em consequência da toxidez por flúor. Um mecanismo indireto da ação do fluoreto pode ser a inativação de cátions metálicos em seus sítios de atividade fisiológica pela semelhança entre os efeitos crônicos do fluoreto e a deficiência

mineral por Mg, Mn e Zn (Façanha e DeMeis 1995; Machoy-Mokrzynska 1995; Reddy e Kaur 2008; Divan Junior *et al.* 2008).

McNulty e Newman (1961) concluíram que a inibição na síntese de clorofila pela ação do flúor ocorreu antes da conversão da protoclorofila em clorofila, sugerindo que a inibição ocorre nos passos iniciais da síntese ou mesmo por alteração em alguma enzima que promova o início da síntese, uma vez que não houve alteração na transformação de protoclorofila em clorofila por ação do flúor. Alguns autores concluíram que o teor de clorofila *a* é sensível a presença de flúor e relatam alterações no conteúdo desse pigmento assim como o teor de carotenóides. Postulam também que o flúor inibe a incorporação do ácido  $\delta$ -aminolevulínico durante a biossíntese de clorofila, alterando o “*turnover*” da molécula de clorofila por impedimento do processo metabólico (Arndt 1995; Machoy-Mokrzynska 1995; Fornasiero 2001; Bustamante 2003; Fornasiero 2003; Fortes *et al.* 2003; Kamaluddin 2003; Reddy e Kaur 2008).

Corroborando a ausência de efeitos do flúor sobre o teor de pigmentos em can-deia, constatado no presente estudo, não houve mudanças em nenhum parâmetro relacionado à fluorescência da clorofila *a* medida na porção sadia das FN, o que atesta a manutenção na integridade de cloroplastos e funcionamento da etapa fotoquímica da fotossíntese nessa porção das FN tratadas com flúor.

A razão clorofila *a/b* em FN e FA tratadas com flúor foi equivalente ao controle, indicando equilíbrio nas correlações entre as quantidades de complexo antena associados aos dois fotossistemas. Baker (2009) postula que este parâmetro ( $F_0$ ) é determinado tanto por propriedades físico-químicas do PSII quanto por propriedades ópticas da folha. Sendo assim se o status hídrico da região de medição estiver comprometido poderá ocorrer alterações nas medidas de  $F_0$  mesmo que não havendo comprometimento dos PSII. Carreteiro (2008) sugere que o incremento de  $F_0$  em folhas de soja submetida a inibidores da protoporfirinogênio relaciona-se a redução da transferência de energia entre os complexos antena e os centros de reação.

A metodologia de coleta de amostras da folha para análise de pigmentos deste trabalho foi determinante para a obtenção da igualdade estatística constatada entre folhas do controle e folhas submetidas ao flúor. Foram coletados discos foliares em regiões não necrosadas nas folhas tratadas com flúor, a fim de observar possível

diminuição do conteúdo de pigmentos fotossintéticos em tecido aparentemente sadio, uma vez que há amplo relato desta diminuição na literatura. Porém se os discos foliares fossem retirados em regiões necrosadas, certamente, haveria menor conteúdo de pigmentos o que resultaria em diferenças significativas, tal como constatado para folhas de uva por Abdallah (2006). Há relatos de Machoy-Mokrzynska (1995) e Reddy e Kaur (2008) sobre efeitos inibitório inespecífico do fluoreto sobre várias enzimas, dependentes de cátions metálicos, o que parece ser devido à formação de complexos de flúor e  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ , originando sais estáveis.

Acredita-se que o flúor, por ser o elemento químico mais eletronegativo da tabela periódica, tem a capacidade de ligar-se a cátions como  $Mg^{++}$  e  $Ca^{++}$ , formando complexos “metal-flúor”, compostos extremamente estáveis, e conseqüentemente, causando sintoma de deficiência desses minerais (Miller 1993; Arndt 1995; Bustamante 2003; Fornasiero 2003; Oliva e Figueiredo 2005; Reddy e Kaur 2008). Assim aparentemente, o Flúor interfere na atividade de enzimas relacionadas à biossíntese ou degradação de pigmentos hidrossolúveis e lipossolúveis.

McNulty e Newman (1961) observaram redução nos teores de clorofila e protoclorofila em plântulas de feijão crescidas em meio contendo flúor, sugerindo que houve inibição da síntese destes pigmentos ou degradação dos mesmos. De acordo com Miller (1993), Fornasiero (2001), Weinstein (2003), Kamaluddin (2003), Oliva e Figueiredo (2005), a redução na concentração dos pigmentos fotossintéticos pode ser resultante dos danos à estrutura dos cloroplastos, bem como do aumento da atividade de clorofilases somado a indisponibilidade do  $Mg^{++}$  na biossíntese da molécula de clorofila. Ressalta-se que estas alterações não foram observadas nas porções do limbo foliar de candeia avaliados neste trabalho, entretanto nas porções maginais da folha há indícios da degradação de pigmentos pela alteração de  $q_L$ ,  $F_0$  e  $F_v/F_m$ . Alterações na composição de pigmentos resultam em efeitos diretos sobre a fotossíntese e, conseqüentemente, sobre a produtividade das plantas.

Diversos autores relatam alterações na permeabilidade de membrana causada pela interação entre o flúor e componentes moleculares da membrana. Há evidências de que o flúor pode alterar a matriz lipídica da membrana, ligando-se a suas porções protéicas, alterando sua função metabólica e, conseqüentemente, interferindo na seletividade (Miller 1993, Fornasiero 2001, Kamaluddin 2003, Weinstein 2003, e

Oliva e Figueiredo 2005). É provável ainda que a injúria foliar se encontre associada a alteração da matriz lipídica e sua relação com as proteínas solúveis da membrana, influenciando suas funções metabólicas (Façanha e De Meis 1995) o que pode justificar o desenvolvimento da necrose marginal observada em FN de candeia, provavelmente pelo grande acúmulo de flúor nesta porção da folha.

Giannini (1987), Façanha e DeMeis (1995), Machoy-Mokrzynska (1995), Reddy e Kaur (2008) relataram diminuição na atividade das ATPases e fosfatases de membrana em plantas tratadas com flúor, o que atribuíram a ligação que o flúor pode estabelecer com cátions como  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , o qual age como co-fatores de enzimas ou como elemento constituinte de proteínas transmembrana, e como consequência ocorrerá a inativação desses elementos de membrana, diminuição da atividade das enzimas e alteração da seletividade de membrana.

Boese (1994) concluiu que houve dano ao sistema de membranas do cloroplasto em espinafre exposto ao flúor. Garrec *et al.* (1974) concluíram que o efeito tóxico do flúor pode ser diminuído pela presença do  $Ca^{++}$  e que este pode se ligar ao flúor formando  $CaF_2$  precipitado. A formação de  $CaF_2$  insolúvel no meio intracelular pode representar uma forma de desintoxicação do fluoreto (Reddy e Kaur 2008; Divan Junior *et al.* 2008). Abdallah (2006) verificou que houve tendência das folhas de uva em acumular maiores teores de flúor e Ca nas margens e ápice foliar, e o desenvolvimento da necrose coincidiu com a diminuição na concentração e disponibilidade do Ca. Garrec *et al.* (1974) observaram relação entre o teor de flúor e a proporção entre as diferentes formas químicas do cálcio presente no limbo foliar.

Mesmo presente no apoplasto das folhas de candeia, o flúor parece não ter transposto a barreira seletiva da membrana celular, não alcançando os cloroplastos, uma vez que verificou-se integridade funcional da célula, manutenção da fotossíntese e da fluorescência da clorofila *a*. A alta tolerância apresentada pelas FA de candeia somada a inalterada permeabilidade de membrana e ausência de acúmulo de MDA nas folhas expostas pode indicar a neutralização do flúor após sua chegada ao apoplasto da porção sadia do limbo foliar. Abdallah (2006) retrata que foi encontrado maior teor de cálcio nas margens necrosadas de folhas de uvas expostas ao flúor, enquanto o centro do limbo foliar reteve mais magnésio e fósforo, o que sugere ser uma estratégia de imobilização do flúor através da ligação com Ca foliar, formando

CaF<sub>2</sub>. Garrec *et al.* (1974) observaram que os maiores teores de cálcio e de flúor estão presentes na mesma porção do limbo foliar de *Pinus sp.*, sugerindo que estes elementos estão ligados e imobilizados.

Após análise anatômica e do conteúdo de cálcio das folhas de candeia observou-se presença de cristais de oxalato de cálcio em grande quantidade nas células de FN expostas ao flúor e queda no conteúdo de cálcio. Apesar de aparentemente contraditório este resultado pode indicar a interferência do flúor no balanço de cálcio nos tecidos foliares. Apesar do aumento no tamanho e quantidade de cristais em FN expostas ao flúor, a fração de cálcio presente em outros compartimentos da célula pode ter sido remobilizada. Garrec *et al.* (1974) observaram que houve aumento na concentração e distribuição do oxalato de cálcio em folhas de *Pinus sp.* crescidos sob exposição ao flúor. O flúor pode ter interferido na fixação do cálcio nas células de FN expostas a esse poluente.

A manutenção da integridade bioquímica no processo fotossintético, mesmo com a presença de flúor no tecido foliar de candeia corrobora com verificação fotossintética que Abdallah (2006) realizou em folhas de uva expostas a este poluente. A integridade bioquímica do processo fotossintético observada em candeia, através da manutenção na relação Ci/Ca, nos direciona a concluir que o flúor não alcançou níveis tóxicos no citossol e cloroplastos, da porção central do limbo foliar das FN, uma vez que quando presente nestes locais há diversos relatos de alterações severas na taxa fotossintética, por degradação de membranas e inativação de enzimas (Giannini 1987, Façanha e DeMeis 1995, Machoy-Mokrzynska 1995 e Reddy e Kaur 2008).

Entretanto Fortes *et al.* (2003) observaram que houve inibição da fotossíntese em milho, causada tanto pelo efeito direto do flúor no mecanismo fotossintético como pelo efeito indireto através do fechamento estomático. A chuva simulada contendo flúor também causou decréscimo significativo na condutância estomática de *Panicum maximum* cv. Colonião, porém, em *Cloris gayana* e *Lolium multiflorum*, houve ligeiro aumento nos valores de condutância estomática, indicando início da perda do controle sobre o mecanismo de fechamento estomático nestas espécies (Oliva e Figueiredo 2005). Moraes (2000) verificou que *Tibouchina pulchra* apresentou redução da taxa de fotossíntese líquida, porém sem alteração significativa

na condutância estomática e transpiração, e que este fato foi consequência de alterações na coleta de luz ou na quantidade e atividade da RUBISCO. Machoy-Mokrzynska (1995) observou interferência do flúor na atividade enzimática por interação com a molécula de Mg, formando MgF. Boese (1994) concluiu que o flúor, em altas concentrações, desestruturou o aparato fotossintético, reduziu a taxa de fotossíntese sob luz e CO<sub>2</sub> saturante, porém de forma transiente ou temporária.

Nas áreas de ocorrência de injúria, houve aumento expressivo dos valores de F<sub>0</sub>, o incremento destes valores mostram que houve comprometimento na captura e transferência de energia de excitação dos complexo antena para os centros de reação do PSII pela ação do poluente nesta porção do limbo foliar. F<sub>0</sub> é a fluorescência mínima em tecido vegetal, previamente adaptado ao escuro e sob a incidência de baixa intensidade luminosa. É interpretado como sinal de fluorescência quando o “pool” de Q<sub>A</sub> está totalmente oxidado ou ainda quando os centros de reação do PSII estão abertos (Baker 2009), interpreta-se também como uma perspectiva do tamanho dos complexos coletores de luz ou complexo antena.

Somado a isso observou-se diminuição da razão F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> apenas nas bordas de FN submetidas ao flúor, o que pode ser atribuído ao aumento do F<sub>0</sub> e a diminuição de F<sub>m</sub> na mesma região, em FN exposta ao flúor em contraste ao resultado apresentado em FN do controle e nas porções centrais do limbo de FN exposta ao flúor. A razão F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> é uma medida do potencial máximo no rendimento quântico do **PSII** de uma dada amostra após adaptação ao escuro. É interpretado como máximo potencial de eficiência na conversão da energia luminosa absorvida em energia química (Groom e Baker 1992; Baker 2009) ou eficiência na taxa de redução do “pool” de Q<sub>A</sub>. Considera-se F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> um bom indicador do estresse abiótico em tecidos vegetais (Baker 2009). Em folhas sadias de diversas espécies, seu valor pode girar em torno de 0,832 +/- 0,004 na grande maioria das plantas. Análises previas demonstraram que os valores na razão F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> de folhas sadias de candeia também estão pouco abaixo desta faixa preestabelecida ficando em torno de 0,800 +/- 0,006 em candeia. O decaimento nos valores de F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> associado ao aumento de F<sub>0</sub> na margem do limbo foliar em FN tratadas por flúor demonstram fotoinibição crônica desta porção.

A baixa taxa no transporte linear de elétrons (ETR) no PSII nas bordas de FN tratadas com flúor, em contraste aos valores observados nas FN do controle e

porções centrais do limbo de FN tratadas com flúor indica, mais uma vez, ação localizada do flúor. O que demonstra que as porções marginais do limbo foliar perderam a capacidade fotossintética. ETR é definido como a medida da taxa linear de transporte de elétrons para o PSII, ou a capacidade fotossintética *in vivo*. Assume-se que 84% da luz incidente no tecido será absorvida pelos complexos coletores de luz, essa porcentagem foi estabelecida como típica para folhas verdes padrão, sendo dividida por dois centros de reação e considerado apenas o PSII.

O  $\phi_{II}$  também conhecido na literatura como  $F_q'/F_m'$  (Baker 2009) ou  $\phi_{II}$  é o rendimento quântico efetivo do PSII quando iluminado (Genty *et al.* 1980). Interpretado, segundo Baker (2009), como a eficiência com a qual a luz absorvida pelo PSII é usada para reduzir o pool de  $Q_A$  quando o tecido vegetal é iluminado com um fluxo de fótons fotossinteticamente ativos. Representa a quantidade efetiva de energia luminosa que está sendo direcionada para reduzir  $Q_A$  desencadeando o processo fotoquímico (Klughammer e Schreiber 2008).

O  $\phi_{NPQ}$  representa o rendimento quântico da dissipação regulada de energia. Esse processo é sinalizado pelo aumento da concentração de  $[H^+]$  no lúmen do tilacoide desencadeando o ciclo das xantofilas e dissipação térmica do excesso de energia. Este parâmetro está intimamente relacionado ao *quenching* não fotoquímico e dissipação da energia na forma de calor.

$\phi_{NO}$  representa o rendimento quântico da dissipação não regulada de energia, por perda de calor latente ou energia não radiativa. Segundo Klughammer e Schreiber (2008),  $\phi_{NO}$  representa a fração da energia dissipada na forma de calor de forma não regulada e emissão de fluorescência (perdas constitutivas) principalmente quando os centros de reação estão reduzidos (fechados) ou danificados. Valores muito altos podem ser interpretados como incapacidade ou degeneração no processo de redução de  $Q_A$ , ou seja, a energia que chega não é direcionada para a reação fotoquímica (Klughammer e Schreiber 2008) sob condições de estresse.

Nas bordas das FN tratadas com flúor houve aumento no  $\phi_{NO}$  somado ao aumento no  $\phi_{NPQ}$  e decaimento do  $\phi_{II}$ . Estes três parâmetros são complementares, a soma deles deve ser sempre igual a 1, uma vez que são eventos competitivos. Este padrão indica comprometimento do processo fotossintético nas bordas foliares. Klughammer e Schreiber (2008) postulam que altos valores de  $\phi_{NO}$  refletem a incapacidade do

tecido vegetal em se proteger do excesso de energia luminosa absorvida. Somado a isso o alto valor de  $\phi_{NPQ}$  indica dissipação de energia por liberação de calor através do acionamento do ciclo das xantofilas. O decaimento do  $\phi_{II}$  representa queda na quantidade efetiva de energia luminosa que está sendo direcionada para reduzir  $Q_A$  (Klughammer e Schreiber 2008) ou queda do processo fotoquímico.

A análise da imagem da fluorescência mostra diminuição do  $q_L$  na margem de FN exposta ao flúor em comparação ao valor de  $q_L$  em FN do controle. Para o uso de  $q_L$ , Kramer *et al.* (2004) postulam que os centros de reação (PSII ou PSI) estão imersos em um “lago” de complexos antena, nas membranas granais. Quando oxidados ou abertos, os centros de reação competem pela energia de excitação dos diversos complexos antena circundantes. Desta forma a eficiência fotoquímica é mais dependente do “pool” de  $Q_A$  oxidadas ou aptas a receber elétrons. Este parâmetro foi considerado o mais eficiente em indicar a ação do fluoreto em folhas de candeia. Pode-se concluir que o processo de transferência de elétrons pode ter sido comprometido por uma menor relação entre a quantidade de  $Q_A$  por centros de reação, situação esta provocada pela toxidez ao flúor.

A manutenção de ETR na porção central de FN tratada com flúor, somado ao alto  $\phi_{NPQ}$  nesta porção do limbo foliar, concordam com os resultados de inalterada taxa de assimilação líquida de  $CO_2$ , e manutenção da integridade das membranas, indicando manutenção da fase bioquímica da fotossíntese e capacidade de auto-proteção do tecido, reforçando a tolerância desta porção do limbo a presença do flúor. Entretanto o baixo rendimento de  $q_L$  tanto em FA quanto FN indica início no comprometimento da fase fotoquímica da fotossíntese em função da toxidez por flúor.

## Conclusão

Apesar do desenvolvimento de necrose e das alterações profundas na estrutura foliar em FN de candeia, esta espécie se mostrou altamente tolerante a altas concentrações de flúor em seu tecido foliar, principalmente se considerarmos que candeia foi exposta a uma concentração extremamente alta de flúor, o que não reflete uma situação real de poluição em campo.

Folhas novas apresentaram maior sensibilidade ao flúor, desenvolvendo após 25 dias de exposição, clorose e necrose visíveis.

Houve clara diferença na sensibilidade ao flúor, entre folhas novas e folhas adultas. Folhas adultas apresentaram pouco ou nenhum dano mesmo com alta concentração de flúor em sua matéria seca.

Parâmetros relacionados a trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* não foram suficientemente sensíveis para detectar os efeitos do flúor em porções sadias de folhas de candeia.

Imagem da fluorescência da clorofila *a* e avaliação anatômica foram as metodologias que melhor detectaram os efeitos do flúor, evidenciando as alterações em áreas necrosadas e não necrosadas de folhas de candeia.

## Referências Bibliográficas

- Abdallah, F.B.; Elloume, N.; Mezghani, I.; Garrec, J-P.; Boukhris, M. 2006 Industrial fluoride pollution of jerbi grape leaves and the distribution of F, Ca, Mg, and P in Them. **Fluoride**. 39:(1)43-48
- Arndt, U.; Flores, F.E.V.; Weinstein, L.H. 1995. **Efeitos do flúor sobre as plantas – diagnose de danos na vegetação do Brasil**. Ed. UFRGS. Porto Alegre, Brasil.
- Azevedo, A.A. 1995. **Ação do flúor em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de *Glycine max* (L.) Merrill**. Dissertação de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo – SP.
- Boese, S.R.; MacLean, D. C.; e El-Mogazi D. 1994. Effects of fluoride on chlorophyll a fluorescence in spinach **Environmental Pollution**. 89:(2)203-208
- Bustamante, M.; Oliva, M.A.; Sant’anna, R. E Lopes, N.F. 1993. Sensibilidade da soja ao flúor. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 5:(2)151-157
- Calatayud, A.; Roca, D.; Martinez, P.F. 2006. Spatial-temporal variation in rose leaves under qwater stress conditions studied by chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology and Biochemistry**. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.09.015
- Carvalho, P.E.R. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Brasília: **EMBRAPA-CNPQ**, 640p
- Carretero, D.M. 2008. **Efeitos da inibição da protoporfirinogênio IX oxidase sobre as trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em plantas de soja (*Glycine max* L.Merrill)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG.
- Cakmak, I.; Horst, W.J. 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468
- CETEC. 1994. **Ecofisiologia da Candeia**. Belo Horizonte, Setembro. 104p
- Chaves, A.L.F.; Silva, E.A.M.; Azevedo, A.A.; Oliva, M.A.; Matsuoka, K. 2002. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-rhodes) – Poaceae. **Acta Botânica Brasílica**. 16:(4)395-406
- Chaves, M.M.F.; Ramalho, R.S. 1996. Estudos morfológicos em sementes, plântulas e mudas de duas espécies arbóreas pioneiras da família Asteraceae (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. e *Vernonia discolor* (Spreng-Kess). **Revista Árvore**. Viçosa:MG 20:(1)1-7
- Divan Junior, A.M.; Oliva, M.A.; Ferreira, F.A. 2008. Dispersal pattern of airborne emissions from an aluminum smelter in Ouro Preto, Brazil, as expressed by foliar fluoride accumulation in eight plant species. **Ecological Indicator** 8:454-461
- Heah, R.L.; Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 125:189-198
- Façanha, A.R. And Meis, L. 1995. Inhibition of maize root H<sup>+</sup>ATPase by fluoride and flúoroaluminate complexes. **Plant Physiology**. 108:241-246
- Fornasiero R.B. 2001. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science**. 161:979-985

- Fornasiero, R.B. 2003. Flúorides Effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. **Plant Science**. 165:507-513
- Fortes, C.; Duarte, A.P.; Matsuoka, S.; Hoffmann H.P.; Lavorenti, N.A. 2003. toxicidade de flúor em cultivares de milho em área próxima a uma indústria cerâmica, Araras **Bragantia**. Campinas 62:(2)275-281
- Garcia-Cuidad, A.; Garcia-Criado, B.; Potón-San Emetrio, C. 1985. Determination of fluoride in plant sample by a potenciomtric method and near-infrared reflectance spectroscopy. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. 16:1107-1122
- Garrec, J.P.; Oberlin, J.c.; Ligeon, E.; Bisch, A.M. and Fourcy, A. 1974. Fluoride-calcium interaction in polluted fir needles. **Fluoride**. 7:(2)78-83
- Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll flúorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**. 990:87-92
- Giannini, J.; Miller, G.W.; Pushnik, J.C. 1987. Effects of NaF on biochemical processes of isolated soybean chloroplasts. **Fluoride**. 18:(2)72-79
- Groom, Q.J. e Baker, N.R. 1992. Analysis of light-induced depressions of photosynthesis in leaves of a wheat crop during the winter. **Plant Physiology**. 100:1217-1223
- Machoy-Mokrzynska 1995. Fluoride – magnesium interaction. **Fluoride**. 28:(4)175-177
- McNulty, I.B. e Newman, D.W. 1961. Mechanism(s) of fluoride induced chlorosis. **Plant Physiology**. 36:(4)385-388
- Moraes, R.M.; Delitti, W.B.C. e Moraes, J.A.P.V. 2000. Respostas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. à poluição aérea de cubatão, sp: fotossíntese líquida, crescimento e química foliar. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, 23:(4)443-449
- Miller, G.W. 1993. The effects of fluoride on higher plants – With special emphasis on early physiological and biochemical disorder. **Fluride**. 26:(1)3-22
- O'Brien, T.P. e McCully, M.E. 1981. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty.
- Oliva, M.A. e Figueiredo, J.G. 2005; Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica** 28:(2)389-397
- Otto, R.; Faria, M.R.M.; Queiroz, F.E.C.; Moura, T.A.; Vitti, G.C.; Cantarella, H. Rendimento da cana-de-açúcar é afetado por flúor. 2007. Nota Científica. **Bragantia**. Campinas, 66:(3)505-509
- Pedralli, G.; Teixeira, M.C.B.; Nunes, Y.R. 1997. Estudos sinecológicos sobre Candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. BIP) na estação ecológica do TRIPUÍ, Ouro Preto, MG. **Revista Árvore**. Viçosa, 21:(2)301-306
- Pedralli, G.; Teixeira, M.C.B.; Freitas, V.L.O.; Meyer, S.T.; Nunes, Y.R.F. 2000. Florística e fitossociologia da estação ecológica do TRIPUÍ, Ouro Preto, MG. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, Edição especial. 24:103-136
- Peixoto, P.H.P.; Pimenta, D.S. e Antunes, F. 2005. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *salvinia auriculata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, 40:(8)727-734

- Pérez, J.F.M.; Scolforo, J.R.S.; Oliveira, A.J.; Mello, J.M.; Borges, L.F.R.; Camelosi, J.F. 2004. Sistema de manejo para candeia - *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch – A opção do sistema de corte seletivo. **Cerne**. Lavras, 10:(2)257-273
- Ribeiro, S.F.C. 2008. **Efeitos da aplicação de flúor sobre os processos fotossintéticos de três espécies nativas e lenhosas da região de ouro preto** – MG. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Reddy, M.P.; e Kaur, M. 2008. Sodium fluoride induced growth and metabolic changes in *Salicornia brachiata* Roxb. **Water Air Soil Pollution**. 188:171-179
- Sant’Anna-Santos, B.F. e Azevedo, A.A. 2007. Aspectos morfoanatomicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, 5:(1)48-50
- Sant’Anna-Santos, B.F.; Duque-Brasil, R.; Azevedo, A.A.; Silveira, A.S.; Araújo, M.; Aguiar, R. 2007. Utilização de parâmetros morfoanatomicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A.ST.-Hil) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore**. Viçosa-MG, 31:(4)761-771
- 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. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, 23:(4)385-393
- Sun, E.G. e Su, H.J. 1985. Fluoride injury to Rice plants caused by air pollution emitted from ceramic brick factories. **Environmental Pollution**. 37:335-342
- Swaminathan, M.S. 2003 Bio-Diversity: An effective safety net against environmental pollution. **Environmental Pollution**. 126:287–291
- Tarhonen, S.; Metsärinne, S.; Holopainen, T.; Oksanen, J. 1999. Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. **Environmental Pollution**. 104:121-129
- Tedesco, M.J. 1995. **Análise de solo, plantas e outros nutrientes minerais**. UFRGS: Departamento de Solos. Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 174p
- VDI. Richtlinie 2310. 1989. Máximale Immissionswerte zum Schutze der Vegetation; Máximale Immissionswerte für Flúorwasserstoff. In VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft. Verein Deutscher Ingenieure, Düsseldorf , p.1-48
- Venturin, N.; Souza, P.A.; Macedo, R.L.G.; Nogueira, F.D. 2005. Adubação mineral da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch). **Floresta**. Curitiba, PR. 35:(2)
- Kamaluddin, M. e Zwiazek, J.J. 2003. Fluoride inhibits root water transport and effects leaf expansion and gas exchange in aspen (*Populus tremuloides*) seedling. **Physiologia Plantarum**. 117:368-375
- Kitajima, M. e Butler, W.L. 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplast by dibromothymoquinone. **Biochimica et Biophysica Acta**. 376:105-115
- Klughhammer, C. e Schreiber, U. 2008. **Complementary PSII quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method**. PAM Application Notes 1:27-35
- Klump, A.; Domingos, M.; Klump, G. 1996. Assessment of the vegetation risk by fluoride emissions from fertiliser industries at cubatão, Brazil. **The Science of the Total Environment** 192:219-228
- Kozłowski, T.T. 1980. Impacts of air pollution on forest ecosystems. **BioScience** 30:89-93

Kramer, D.M.; Johnson, G. Kuirats,O.; e Edwards,G.E. 2004. New flúorescence parameters for the determination of  $Q_A$  redox satate and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research**. 79:209-218

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

Wellburn, A.R. 1994. The espectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**. 144:307-313