

BRUNO FRANCISCO SANT'ANNA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FITOTÓXICOS DO FLÚOR EM *Spondias dulcis*
FORST F. (ANACARDIACEAE), ESPÉCIE TROPICAL SENSÍVEL**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237a
2008

Santos, Bruno Francisco Sant'Anna dos, 1978-
Avaliação dos efeitos fitotóxicos do flúor em
Spondias dulcis Forst F. (Anacardiaceae), espécie tropical
sensível / Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos.
– Viçosa, MG, 2008.
xiii, 102f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Aristéa Alves Azevedo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Spondias dulcis* - Efeito do flúor. 2. *Spondias dulcis* -
Morfologia. 3. *Spondias dulcis* - Anatomia. 4. Microscopia
eletrônica. 5. *Spondias dulcis* - Efeito da poluição do ar.
6. Fotosíntese. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

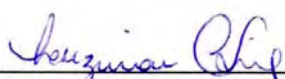
CDD 22.ed. 583

BRUNO FRANCISCO SANT'ANNA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FITOTÓXICOS DO FLÚOR EM *Spondias dulcis* FORST. F.
(ANACARDIACEAE), ESPÉCIE TROPICAL SENSÍVEL

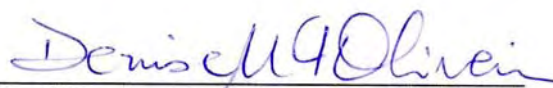
Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2008

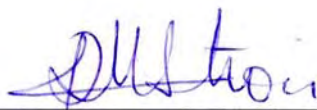


Profª Luzimar Campos da Silva

(Co-Orientadora)



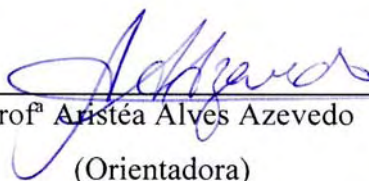
Profª Denise Maria Trombert de Oliveira



Profª Renata Maria Strozi Alves Meira



Dr. Rogério Ferreira Ribas



Profª Aristéa Alves Azevedo

(Orientadora)

*Aos meus pais,
“por me ensinarem que a vida é repleta de obstáculos,
e que a honestidade e o trabalho são os pré-requisitos para superá-los!!”*

*“Nossa passagem pela vida é rápida.
Cada um vem, conta sua história, vai embora
e depois ela será apagada para sempre. A vida continua.”
(Oscar Niemeyer)*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em particular ao Departamento de Biologia Vegetal, e à CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

À Coordenadoria de Proteção à Vida Silvestre do Instituto Estadual de Florestas (IEF) de Minas Gerais, pela licença concedida para obtenção de mudas no Viveiro do Parque Estadual do Rio Doce.

À minha orientadora, Prof^a. Aristéa Alves Azevedo, pela paciência, confiança, amizade, ensinamentos e, principalmente, por ser meu espelho profissional e exemplo de caráter. Agradeço também por me ajudar a tomar decisões, me mostrar que só precisamos de oportunidades e que todo bem que fazemos ao próximo, por si só, já é a maior das recompensas.

À Prof^a. Renata Strozi Alves Meira, pelos ensinamentos, trabalhos em conjunto e pelas risadas dentro e fora do laboratório. E por me mostrar, via e-mails lá de Portugal, que nem tudo é tão importante quanto fazemos parecer, mesmo que seja.

À Prof^a. Luzimar Campos da Silva, pela parceria, auxílio constante e pelos momentos. Chefinha, obrigado por me confiar a continuidade de seu trabalho com a melhor árvore do mundo, o “cajazinho”.

Ao Prof. João Marcos de Araújo, pela agradável convivência e por me ensinar praticamente tudo que sei sobre microscopia eletrônica.

Ao Prof. Marco Antonio Oliva, pelas facilidades oferecidas ao desenvolvimento desta pesquisa.

A Prof^a. Rosane Aguiar, pela agradável convivência, respeito, carinho e presteza. Palavras não são suficientes para descrever minha gratidão e admiração.

Ao Gilmar Valente, pelo auxílio no envio de material a especialistas, apoio e por ser um exemplo de amor a Botânica. E também por me fazer achar tudo muito mais engraçado, mesmo em “*Panicum*”.

Ao Dr. Rogério F. Ribas, por viabilizar as análises fisiológicas deste trabalho, pelas valiosas idéias e pelo exemplo de bondade, humildade e dedicação e ao Rogério Gomide, pelo auxílio nas montagens das estações de biomonitoramento.

Aos professores Eldo A. Monteiro da Silva, pelo carinho e exemplo, Wagner C. Otoni, pelo grande coração, auxílio nas traduções e exemplo de dedicação a pós-graduação, e a Marília Ventrella, pelas constantes trocas de idéias.

Ao laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Ouro Preto, em especial ao Dr. Hildeberto Caldas de Souza e todas as estagiárias e técnicos do setor, pelo

suporte físico e auxílio, fundamentais para realização dos experimentos de campo.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pelo suporte dado para a realização da microscopia eletrônica de varredura, em especial a Dra. Cláudia Alencar Vanetti.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, pelo suporte dado para a realização da microscopia eletrônica de transmissão, em especial ao Dr. Elliot Watanabe Kitajima, pelo agradável convívio e ao amigo Dr. Francisco Tanaka, pela ajuda na árdua transição de micrômetros para nanômetros.

Aos funcionários da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, em especial a Gilcemir, Celso, Evandro, Marta Suely e Margarida, pelo agradável convívio antes, durante e após os simpósios de iniciação científica da UFV.

Aos amigos do Pantanal, Temilze G. Duarte, Luiz Chieragatto e Gilmar Júnior, pelo carinho, torcida e por me ensinarem que a beleza das plantas não está restrita a cortes transversais.

Ao Reinaldo Duque-Brasil, Alice de Souza Silveira, Thiago Valente Aguiar e Naiara Viana Campos, “os meninos”. Vocês me ensinaram que o trabalho em equipe é a chave do sucesso e que a alegria de uma conquista é melhor quando compartilhada.

À Vânia Moreira Maria Valente, pela amizade, idéias e por coordenar, durante os experimentos de campo, as coletas em Viçosa.

Aos amigos Leonardo Tuffi Santos e Cláudia Fogaça, pela colaboração com as análises estatísticas, trabalhos em conjunto e por me valorizarem como profissional.

Aos meus queridos e saudosos amigos, *in memoriam*, Tia Tina e Prof. Alexandre Francisco da Silva, que me ensinaram tanto e fazem muita falta em momentos tão especiais como este.

Aos colegas de curso, Adriana, Ana Cláudia, Bittencourt, Cristina, Dayana, Fabiana Filardi, Flávia Ferrari, Jaque Dias, Josiane, Rosiane, Juliana Lanna, Kellen Lagares, Marina e Silvana, por tornarem as disciplinas e o ambiente de trabalho sempre tão agradáveis.

Aos meus queridos tios Venceslau e Cláudia, pelo carinho e por possibilitar a realização do experimento de campo no quintal da sua casa, em Ouro Preto.

Aos “estagiários”, em especial a Bárbara, Diego, Diogo, Dudu, Elisa, Letícia, Tuane e Tica, pela sábia tolerância às constantes brincadeiras, divertido convívio e por serem meninos tão especiais, obrigado por tudo. E a Dona Edite né, pelo carinho e lealdade.

Às amigas Marcela Thadeo, por mostrar que quase tudo na vida é questão de etiqueta e Virgínia Londe de Camargos, por me ensinar que falar inglês é muito fácil. Obrigado pelo

carinho, o amor ao chocolate, risadas, e por cuidarem de mim nos momentos difíceis e/ou ataques de pânico sem razão aparente.

A Vanessa Valente, pelo carinho, altos papos e muitas risadas mas, principalmente, por me perguntar sobre esta tese, desde minha iniciação científica.

Aos amigos de Ipatinga, Thiago Gonçalves Alves, pela parceria inestimável em todas as etapas desta tese, pela lealdade, torcida e risadas, e Betânia de Souza Monteiro, exemplo de competência profissional e companhia nos momentos de solidão de quem formou e ficou em Viçosa até agora, será?

Aos meus irmãos, André, pela ajuda, torcida e por me dar a maior benção que alguém pode receber: uma afilhada linda, ao Alexandre, pelo carinho e a Sabrina Tinoco, a irmã que Deus me permitiu escolher. Amo muito vocês.

Aos meus melhores amigos e irmãos de consideração, Wonder, o dentista, e Agenor, o fazendeiro, pelos incontáveis papos e momentos de alegria e diversão em Viçosa e adjacências. E também por me emprestarem a mãe de vocês, Ângela. Vocês moram no meu coração.

Aos meus amados avós, Maria Imaculada, Renato, Glória e Francisco, pelo apoio habitacional e sempre bem-vindos almoços em família. E a minha tia e madrinha Maria de Lourdes, e família, sempre presentes nesses últimos 10 anos.

Aos meus pais, as duas pessoas mais importantes da minha vida. As minhas vitórias só se concretizam pois tenho vocês ao meu lado e só sou o que sou e ainda serei por vocês.

A Deus, pela constante proteção e por me dar força, coragem, saúde e fé para ultrapassar as dificuldades e seguir em frente.

A cidade de Viçosa, o meu melhor lugar no mundo, por ser palco das conquistas profissionais mais marcantes da minha vida e por me presentear com as pessoas mais especiais que conheço e acima citadas.

BIOGRAFIA

Bruno Francisco Sant’Anna dos Santos, filho de Fausto Francisco dos Santos e Maria Marta Sant’Anna dos Santos, nasceu em Viçosa, MG, em 30 de dezembro de 1978.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa em março de 1998, e concluiu o curso de Agronomia em março de 2003.

Foi bolsista de iniciação científica durante dois anos, trabalhando com o efeito de poluentes atmosféricos em espécies arbóreas tropicais, de 2000 a 2002.

Em 2003, iniciou o Mestrado em Botânica, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, trabalhando com Anatomia Vegetal. Obteve transposição do Mestrado para o Doutorado em 2004, concluindo o trabalho com a defesa de tese intitulada “Avaliação dos efeitos do flúor em *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae), espécie tropical sensível”, em fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1: Seleção de caracteres prognósticos e diagnósticos da fitotoxidez por flúor em <i>Spondias dulcis</i> Forst F. (Anacardiaceae)	7
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	14
AGRADECIMENTOS	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
TABELAS	22
FIGURAS	24
CAPÍTULO 2: Alterações foliares em <i>Spondias dulcis</i> Forst F. (Anacardiaceae), espécie tropical sensível ao flúor, em resposta às imissões de uma fábrica de alumínio	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	36
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	41
AGRADECIMENTOS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
TABELA	54
FIGURAS	55
CAPÍTULO 3: Análise morfoanatômica e fisiológica da indução de injúrias por flúor em <i>Spondias dulcis</i> Forst F. (Anacardiaceae)	63
RESUMO	63
ABSTRACT	64

INTRODUÇÃO.....	65
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
RESULTADOS	71
DISCUSSÃO.....	74
AGRADECIMENTOS	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
TABELA	85
FIGURAS	86
4. CONCLUSÕES GERAIS	102

RESUMO

SANTOS, Bruno Francisco Sant'Anna dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Avaliação dos efeitos fitotóxicos do flúor em *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae), espécie tropical sensível.** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo. Co-Orientadores: Luzimar Campos da Silva, João Marcos de Araújo e Marco Antonio Oliva Cano.

A degradação de diversas formações vegetais no entorno de alguns pólos industriais no Brasil encontra-se, significativamente, relacionada à presença de flúor na atmosfera. O uso de plantas tem se revelado uma metodologia adequada e de baixo custo para a detecção dos efeitos de poluentes atmosféricos, entretanto, a universalidade do uso de determinadas espécies bioindicadoras tem sido questionada. Objetivou-se caracterizar, de forma acurada, os sintomas morfoanatômicos causados pelo flúor em *Spondias dulcis*, espécie tropical sensível ao flúor, fornecendo subsídios para utilização da espécie, em campo, no prognóstico e diagnóstico de injúria pelo poluente; selecionar parâmetros visuais, microscópicos e fisiológicos a serem utilizados como biomarcadores em programas de biomonitoramento; avaliar o efeito das imissões de flúor de uma fábrica de alumínio sobre parâmetros macro e microscópicos em *S. dulcis*; avaliar se *S. dulcis* pode ser empregada como espécie bioindicadora e correlacionar as alterações visuais, microscópicas e fisiológicas causadas pelo flúor na lâmina foliar desta espécie. As plantas foram expostas aos efeitos fitotóxicos do flúor em experimentos de longa e curta duração, em laboratório, e no campo. Foram feitas coletas para estudos morfoanatômico, micromorfológico, estrutural (quantitativo e qualitativo), ultra-estrutural e fisiológico, além da quantificação do teor de poluente, a partir de técnicas usuais. As necroses com coloração típica, tiveram início, principalmente, a partir da base dos folíolos e com maior intensidade na porção apical das plantas. O conteúdo de flúor aumentou nas plantas expostas em laboratório, havendo aparente correlação com o tempo de exposição. No campo, as plantas expostas nas adjacências da fonte emissora também apresentaram maior quantidade do poluente nas folhas. Os danos na superfície dos folíolos foram caracterizados como plasmólise, erosão das ceras epicuticulares, infestação por hifas fúngicas e ruptura da parede periclinal externa das células epidérmicas. Em laboratório, os danos surgiram em ambas as faces simultaneamente mas, no campo, os danos tiveram início a partir da face abaxial. Estruturalmente, observou-se acúmulo de compostos fenólicos no parênquima lacunoso e nas proximidades das terminações xilemáticas. O acúmulo de grãos de amido foi nítido na nervura mediana, contudo, a análise ultra-estrutural também demonstra este evento entre a margem e a nervura. As membranas celulares e os cloroplastos foram extremamente afetados pelo poluente. O acúmulo de material granuloso ocorreu dentro e nas proximidades

das terminações xilemáticas. Houve redução na concentração de pigmentos fotossintéticos em folíolos sem sintoma. Na epiderme, os danos causados pelo flúor estavam principalmente associados aos estômatos, porém, a concentração interna de CO₂ não variou, demonstrando que a redução na fotossíntese está associada a um componente metabólico. A interpretação conjunta dos danos fisiológicos e microscópicos permite concluir que a redução na fotossíntese dos FSS não ocorre devido a mecanismos de difusão de carbono e nem a danos na fase luminosa da fotossíntese, mas sim a alterações na estrutura dos cloroplastos e que o acúmulo de amido deve ser reflexo da inativação de células do floema, responsável pela translocação de fotoassimilados para as raízes. Os eventos microscópicos descritos antecederam o surgimento de sintomas em todos os experimentos, desta forma, possuem valor prognóstico. Estes resultados confirmam o potencial de *S. dulcis* como bioindicadora de reação e de parâmetros visuais, microscópicos e fisiológicos como biomarcadores.

ABSTRACT

SANTOS, Bruno Francisco Sant'Anna dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2008. **Evaluation of phytotoxic fluoride effects on *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae), a sensitive tropical species.** Adviser: Aristéa Alves Azevedo. Co-Advisers: Luzimar Campos da Silva, João Marcos de Araújo e Marco Antonio Oliva Cano.

The degradation of numerous plant formations in the surroundings of some industrial clusters in Brazil is significantly related with the presence of fluorine in the atmosphere. The use of plants to detect the effects of atmospheric pollutants has been proving an appropriate and low cost methodology, however, the universality of use of certain bioindicator species has been questioned. The objective of this work was therefore to characterize accurately morphoanatomical symptoms caused by fluoride in *Spondias dulcis*, a fluoride-sensitive tropical species, in order to use the species in the field for diagnosis and prognosis of pollutant-induced injuries; select visual and physiological parameters to be used as biomarkers in biomonitoring programs; evaluate the effect of fluoride emissions from a aluminum plant on macroscopic and microscopic parameters in *S. dulcis*; evaluate whether *S. dulcis* can be used as bioindicator species and correlate visible, microscopic and physiological changes caused by fluorine in leaf blade of this species. The plants were exposed to phytotoxic effects of fluoride in long and short experiments, in laboratory and in the field. Leaves were collected for morphoanatomical, micromorphological, structural (quantitative and qualitative), ultra-structural and physiological studies, as well as the quantification of the pollutant level by usual techniques. Necroses with typical coloration were began mainly from the leaflet base, having a higher intensity on the apical portion of the plants. Fluoride content increased in plants exposed to fluoride in the laboratory, with apparent correlation with time of exposure. In the field, the plants exposed to fluorine in the adjacencies of the issuing source also showed higher levels of the pollutant in the leaves. The damages on leaflet surface were characterized as plasmolysis, erosion of epicuticular wax, infestation by fungal hyphae and rupture of the external periclinal wall of the epidermal cells. In laboratory, the injuries appeared simultaneously on both faces, but in the field, the injuries started on the abaxial surface. Structurally, accumulation of phenolic compounds was observed in the spongy parenchyma and at the boundaries of the ending veinlets. Starch grain accumulation in the midrib was clear, however, the ultra-structural analysis also showed this event between the margin and the rib. Cell membranes and chloroplasts were strongly affected by the pollutant. Accumulation of granular material occurred within and near the extremities of the xylem. There was reduction in the concentration of photosynthetic pigments of leaflets with

symptoms. The cell wall was the most changed cell component in the epidermis and the damages caused by the fluoride were mainly associated with the stomata, however, the internal CO₂ concentration did not vary, showing that photosynthesis reduction is probably associated with a metabolic component. The joined interpretation of physiological and microscopic damages led to the conclusion that the reduction in photosynthesis of leaflets with symptoms did not occur due to carbon diffusion mechanisms nor to damages to the luminous phase of photosynthesis, but due to changes in chloroplast structure, and that the starch accumulation must be caused by the inactivation of phloem cells that are responsible for the translocation of photoassimilates to roots. The described microscopic events precede symptom appearance, and therefore have prognostic value. These results confirm the potential of *S. dulcis* as reaction bioindicator and the visual, microscopic and physiological parameters as biomarkers.

INTRODUÇÃO GERAL

A degradação de diversas formações vegetais no entorno de alguns pólos industriais no Brasil encontra-se, significativamente, relacionada à presença de flúor na atmosfera, em consequência da atividade de fontes emissoras (Oliva & Figueiredo; 2005). Segundo Arndt *et al.* (1995), no estudo da poluição, emissão diz respeito à quantidade de partículas ou gases que são liberados por fontes naturais ou antropogênicas, em contrapartida, imissão se refere àquilo que existe, num dado ambiente e que pode penetrar nos organismos, representando risco potencial.

A sensibilidade das plantas ao flúor varia de acordo com fatores climáticos, edáficos e genéticos (Weinstein & Davison, 2003). As plantas são organismos muito sensíveis que podem reagir aos efeitos de poluentes, apresentando injúrias visíveis como necroses e cloroses e/ou alterações fisiológicas evidentes, como o aborto de flores e frutos e ser úteis como bioindicadores de poluição (De Temmerman *et al.*, 2004). Entretanto, sintomas não visíveis a olho nú têm sido utilizados como biomarcadores de poluição atmosférica, sendo fundamental a detecção destes utilizando-se técnicas microscópicas e fisiológicas. Desta forma, o estudo das alterações estruturais e ultra-estruturais provocadas por poluentes tem se revelado de extrema importância para o diagnóstico da injúria, especialmente quando não existem sintomas macroscópicos, e também, para o entendimento dos mecanismos de fitotoxicidade (Soikkeli, 1981).

Para avaliação do impacto causado pelos poluentes na vegetação, o órgão da planta mais estudado tem sido a folha (Azevedo, 1995), pois é o mais sujeito à ação dos fatores ambientais. Vários parâmetros foliares podem ser utilizados para qualificar e quantificar a influência desses poluentes sobre as plantas, tais como: ocorrência e aspectos das lesões foliares, percentagem de folhas injuriadas, área foliar necrosada, crescimento, taxa de fotossíntese e respiração, fluorescência da clorofila *a*, conteúdo de clorofila, quantidade de poluentes acumulada no tecido foliar (Prado-Filho, 1993; Domingos *et al.*, 2004; Oliva & Figueiredo, 2005), alterações micromorfológicas, estruturais e ultra-estruturais (Azevedo, 1995; Mazzoni-Viveiros, 1996; Hara, 2000; Fornasiero, 2001; Chaves *et al.*, 2002; Fornasiero, 2003; Silva *et al.*, 2000; 2005a; 2005b; 2006; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006a; 2006b).

Dentro deste contexto, as análises de micromorfologia foliar se destacam, já que mudanças estruturais ocorridas na epiderme foliar, de certas plantas, têm sido úteis no monitoramento da intensidade e grau de poluição ambiental (Gupta & Ghose, 1986). As

análises ao microscópico de varredura podem indicar pontos preferenciais de penetração de poluentes nas folhas (Azevedo, 1995; Hara, 2000; Chaves *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005b; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006a; 2006b; 2007; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007) pois a erosão das ceras epicuticulares altera a capacidade de umedecimento da superfície foliar, facilitando a penetração de poluentes presentes na água das chuvas (Evans, 1982) predispondo a planta ao ataque de patógenos e microorganismos (Barthlott, 1981).

A redução da atividade fotossintética pelo flúor tem sido bem documentada (MacLean & Schneider, 1981; Zwiazek & Shay, 1988; Boese *et al.*, 1995; Divan Junior *et al.*, 2007; Oliva & Figueiredo, 2005), mas os mecanismos envolvidos ainda não estão perfeitamente esclarecidos. Para explicar este efeito têm sido propostas diversas maneiras de atuação dos fluoretos: inibição de enzimas, decréscimo no conteúdo de clorofila e inativação do fotossistema II (Wallis *et al.*, 1974; Parry *et al.*, 1984; Pushnik & Miller, 1990; Ballantyne, 1991). Como o flúor é um elemento eletronegativo, ele pode se ligar ao Mg^{2+} formando complexos conhecidos como “metal-fluorine”, responsáveis pelo surgimento de zonas sem coloração em algumas porções das folhas, devido à redução na biossíntese de clorofila, parâmetro amplamente utilizado para detectar injúrias provocadas por diversos poluentes atmosféricos (Fornasiero, 2001). Os efeitos do flúor sobre a fotossíntese de plantas submetidas a fluoreto em solução (Bustamante *et al.*, 1993) estão associados à desestruturação dos cloroplastos como observada por Azevedo (1995), Hara (2000) e Fornasiero (2001). Estruturalmente, observa-se alteração na forma e organização dos cloroplastos, dilatação do espaço intratilacóide, grãos de amido volumosos, decréscimo no número de grana e conformação ondulada do envoltório (Azevedo 1995; Hara, 2000).

A falta de monitoramento associada ao acréscimo nas emissões de poluentes atmosféricos requer a adoção de métodos adequados para o controle da qualidade do ar, incluindo a seleção de espécies bioindicadoras adequadas ao clima local (Silva *et al.*, 2000; Weinstein & Davison, 2003; Oliva & Figueiredo, 2005; Silva *et al.*, 2005a; 2006; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006b). O uso de plantas tem se revelado uma metodologia adequada e de baixo custo para a detecção dos efeitos de poluentes atmosféricos sobre organismos, em comparação com métodos físico-químicos onerosos e de difícil aplicação (Klumpp *et al.*, 2001; Oliva & Figueiredo, 2005). A universalidade do uso de determinadas espécies bioindicadoras tem sido questionada (Strehl & Arndt, 1989; Ellenberg, 1991) pois, geralmente, as condições ambientais locais alteram as propriedades ecofisiológicas e mascaram a sintomatologia específica ao flúor. Há, portanto, a necessidade de se conhecer a sensibilidade ao flúor de espécies nativas e/ou adaptadas a regiões tropicais (Silva *et al.*, 2000; Oliva & Figueiredo, 2005) para implantação de programas de biomonitoramento.

O monitoramento das imissões de poluentes pode ser passivo, quando as plantas estão presentes em seu ambiente natural, ou ativo, quando são introduzidas, de forma padronizada, na área a ser estudada (Ellenberg *et al.*, 1991). Em estudos de biomonitoramento é essencial o conhecimento prévio de respostas morfoanatômicas, fisiológicas ou bioquímicas específicas (Oliva & Figueiredo, 2005).

Dentre as espécies arbóreas nativas dos trópicos, *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae) é indicada para o reflorestamento de áreas degradadas e/ou arborização de áreas urbanas (Lorenzi, 2002). Alterações ocasionadas por poluentes atmosféricos no desenvolvimento e estrutura foliar desta espécie já foram evidenciadas em condições de laboratório (Silva *et al.*, 2000; 2005a; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006b; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007), o que pode restringir a sua utilização em regiões impactadas mas, por outro lado, indica potencialidade para seu uso no biomonitoramento. Assim, é fundamental avaliar a viabilidade de utilização desta espécie no monitoramento ativo mediante estudo de seu comportamento em condições de campo.

No município de Ouro Preto – MG, está instalada uma fábrica de alumínio que é uma fonte emissora de fluoreto atmosférico (Ardnt *et al.*, 1995). As atividades produtivas de fontes emissoras deste tipo emanam gases e particulados para a atmosfera, como os fluoretos (Prado-Filho, 1993), detectados em experimentos de bioindicação passiva e ativa conduzidos por Divan Junior *et al.* (2007; 2008).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Caracterizar, de forma acurada, os sintomas morfoanatômicos causados pelo flúor em *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae) fornecendo subsídios para utilização da espécie, em campo, no prognóstico e diagnóstico de injúria pelo poluente;
2. Selecionar parâmetros visuais, microscópicos e fisiológicos a serem utilizados como biomarcadores em programas de biomonitoramento;
3. Avaliar o efeito das imissões de flúor de uma fábrica de alumínio sobre parâmetros macro e microscópicos em *S. dulcis*;
4. Avaliar o potencial de *S. dulcis* como espécie bioindicadora da presença de flúor;
5. Correlacionar as alterações visuais, microscópicas e fisiológicas causadas pelo flúor na lâmina foliar de *S. dulcis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arndt, U.; Flores, F.; Weinstein, L. 1995. **Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil**. Ed. da Universidade/UFRGS, Porto Alegre.
- Azevedo, A.A. 1995. **Ação do flúor, em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de *Glycine max* (L.) Merrill**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 95p.
- Ballantyne, D.J. 1991. Fluoride and photosynthetic capacity of azalea (*Rhododendron*) cultivars. **Fluoride** 24: 11-16.
- Barthlott, W. 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic Journal of Botany** 1: 345-355.
- Boese, S.R., MacLean, D.C., El-Mogazi, D. 1995. Effects of fluoride on chlorophyll *a* fluorescence in Spinach. **Environmental Pollution** 89: 203-208.
- Bustamante, M., Oliva, M.A., Sant'Anna, R., Lopes, N.F. 1993. Sensibilidade da soja ao flúor. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 5: 151-157.
- Chaves, A.L.F., Silva, E.A.M., Azevedo, A.A., Oliva Cano, 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 Botanica Brasilica** 16: 395-406.
- De Temmerman, L.; Bell, J.N.B.; Garrec, J.P.; Klumpp, A.; Krause, G.H.M.; Tonneijck, A.E.G. 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. (eds): **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness**. Cuvillier Verlag, Göttingen. 392p.
- Divan Junior, A.M., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J. 2007. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colonião. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67: 247-253.
- Divan Junior, A.M.; Oliva, M.A.; Ferreira, F.A. 2008. Dispersal pattern of airborne emissions from an aluminium smelter in Ouro Preto, Brazil, as expressed by foliar fluoride accumulation in eight plant species, **Ecological Indicators** (2007), doi:10.1016/j.ecolind.2007.04.008
- Domingos, M.; Alves, E.S.; Bulbovas, P.; Cunha, A.L.; Longui, E.L.; Lourençon, D.A.C.B.; Moraes, R.M.; Rinaldi, M.C.S.; Mazzoni-Viveiros, S.C. 2004. Reaction of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, to urban air pollution stress. In: Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. (eds): **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness**. Cuvillier Verlag, Göttingen. 392p.
- Ellenberg, H. 1991. **Bioindicator and biological monitoring**. In Biological monitoring. Signal from the environment. Gate/GTZ, Braunschweig. p.13-74.

- Ellenberg, H., Arndt, U., Bretthauer, R., Ruthsatz, B., Steubing, L. 1991. **Biological monitoring: signals from the environment**. Vieweg, Berlin-Germany. 318p.
- Evans, L.S. 1982. Biological effects of acidity in precipitation on vegetation: a review. **Environmental and Experimental Botany** 22: 155-169.
- Fornasiero, R.B. 2001. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science** 161: 979-985.
- Fornasiero, R.B. 2003. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. **Plant Science** 165: 507-513.
- Gupta, M.C., Ghouse, A.K.M. 1986. The effects of coal-smoke pollutants on the leaf epidermal architecture in *Solanum melongena* L. variety Pusa Purple Long. **Environmental Pollution, Séries A** 41: 315-321.
- Hara, S. 2000. **Alterações estruturais em folhas de *Panicum maximum* Jacq. submetidas à chuva simulada com flúor**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 48p.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Fomin, A. 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). **Revista Brasileira de Botânica** 24: 511-518.
- Lorenzi, H. 2002. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP. pp. 25.
- MacLean, D.C., Schneider, R.E. 1981. Effects of gaseous hydrogen fluoride on the yield of field-grown wheat. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological** 24: 39-44.
- Mazzoni-Viveiros, S.C. 1996. **Aspectos estruturais de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) sob o impacto de poluentes atmosféricos provenientes do complexo industrial de Cubatão, SP-Brasil**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Oliva, M.A.; Figueiredo, J. G. 2005. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica** 28: 389-397.
- Parry, M.A.J., Schmidt, C.N.G., Gutteridge, S. 1984. Inhibition of ribulose-P₂ carboxylase/oxygenase by fluoride. **Journal of Experimental Botany** 35: 1177-1181.
- Prado-Filho, J.F. 1993. Uso de bioindicadores para monitoramento do ar. **Ambiente** 7: 57-64.
- Pushnik, J.C., Miller, G.W. 1990. The influences of elevated environmental fluoride on the physiology and metabolism of higher plants. **Fluoride** 23: 5-19.
- Sant'Anna-Santos, B.F., Azevedo, A.A. 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 48-50.

- Sant'Anna-Santos, B.F., Duque-Brasil, R., Azevedo, A.A., Silveira, A.S., Araújo, J.M., Aguiar, R. 2007. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore** 31: 761-771.
- Sant'Anna-Santos, B.F., Silva, L.C., Azevedo, A.A., Aguiar, R. 2006a. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49: 313-321.
- Sant'Anna-Santos, B.F., Silva, L.C., Azevedo, A.A., Araújo, J.M., Alves, E.F., Silva, E.A.M., Aguiar, R.M.E. 2006b. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany** 58: 158-168.
- Silva, L. C., Oliva, M. A., Azevedo, A. A., Araújo, J. M. 2006. Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. **Water, Air and Soil Pollution** 175: 241-256.
- Silva, L.C., Azevedo, A.A., Silva, E.A.M., Oliva, M.A. 2005a. Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). **Australian Journal of Botany** 53: 789-796.
- Silva, L.C., Oliva, M.A., Azevedo, A.A., Araújo, J. M., Aguiar, R.M. 2005b. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. **Water, air and soil pollution** 168: 129-143.
- 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** 23: 383-391.
- Soikkeli, S. 1981. Comparison of cytological injuries in conifer needles from several polluted industrial environments in Finland. **Annales Botanici Fennici** 18: 47-61.
- Strehl, T., Arndt, U. 1989. Alterações apresentadas por *Tillandsia aeranthos* e *T. recurvata* (Bromeliaceae) expostas ao HF e SO₂. **Iheringia** 39: 3-17.
- Wallis, W.J., Miller, G.W., Psenak, M., Shieh, J. 1974. Fluoride effects on chlorophyll biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. **Fluoride** 7: 69-77.
- Weinstein, L.H., Davison, A.W., Skelly, J.M. 2003. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution** 125: 3-11.
- Weinstein, L.H., Davison, A.W. 2003. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution** 125: 3-11.
- Zwiazek, J.J., Shay, J.M. 1988. Sodium fluoride induced metabolic changes in jack pine seedlings. II. Effect on growth, acid phosphatase, cytokinins and pools of soluble proteins, amino acids and organic acids. **Canadian Journal of Forestry Research** 18: 1311-1317.

CAPÍTULO 1

Seleção de caracteres prognósticos e diagnósticos da fitotoxidez por flúor em *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae)

RESUMO – Objetivou-se determinar, em laboratório, o potencial diagnóstico dos sintomas e prognóstico dos danos microscópicos causados pelo flúor em *Spondias dulcis*. As plantas foram expostas a nevoeiros simulados com flúor (0, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹) por 20 minutos diários, durante quatro dias consecutivos. Em folíolos aparentemente saudáveis, foram coletadas amostras para determinação das alterações microscópicas, ao término do experimento. Mensurou-se a porcentagem de área foliar necrosada e foram coletadas amostras foliares para determinação do teor de poluente na matéria seca da porção basal e apical da planta. As necroses com coloração típica surgiram 24 horas após a primeira simulação e tiveram início, principalmente, a partir da base dos folíolos e com maior intensidade na porção apical das plantas, onde houve maior acúmulo de flúor. Os danos na superfície de ambas as faces dos folíolos foram caracterizados como plasmólise, erosão das ceras epicuticulares e ruptura da parede periclinal externa das células epidérmicas. Estruturalmente, observou-se acúmulo de compostos fenólicos no parênquima lacunoso e nas proximidades das terminações xilemáticas. Houve redução na espessura do limbo devido a plasmólise no mesófilo, havendo aparente correlação com os danos observados na superfície. Os parâmetros observados mostraram-se promissores para estudos de biomonitoramento em campo.

Palavras-chave: Flúor, *Spondias dulcis*, anatomia foliar, sintomatologia, necrose.

**Prognostic and diagnostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on
Spondias dulcis Forst. F. (Anacardiaceae)**

ABSTRACT – The goal of this study was to determine symptoms and microscopic damage caused by fluoride on *Spondias dulcis*, a fluoride-sensitive species, in the laboratory. The plants were exposed to simulated fog with fluoride (0, 5, 10, 15, and 20 mg L⁻¹) for 20 minutes daily on four consecutive days. Samples from leaflets without any apparent fluoride injury were collected to examine for the presence of microscopic alterations. The percentage of necrosed leaf area was measured, and the level of pollutant in the dry matter from the basal and apical portions of the plant was determined. The necroses began 24 hours after the first simulation, mainly from the base of the leaflets. A higher level of necrosis was observed at the apical portion of the plants, a region of higher fluoride accumulation. The damage on both surfaces of the leaflets was characterized as plasmolysis, erosion of the epicuticular waxes, and epidermal rupture. Structurally, there was noticeable accumulation of phenolic compounds in the spongy parenchyma and at the boundaries of the ending veinlets. A reduction of the limb thickness occurred due to plasmolysis in the mesophyll, showing an apparent correlation with damage observed on the surface. The parameters observed are promising for field biomonitoring studies.

Keywords: Fluoride, *Spondias dulcis*, leaf anatomy, symptomatology, necrosis.

Introdução

O flúor, poluente atmosférico extremamente fitotóxico (Smith & Hodge, 1979), pode ser liberado na atmosfera durante a produção de alumínio, tijolos, vidros e aço (Fornasiero, 2001). No Brasil, existem poucos dados sobre a concentração de flúor na atmosfera (Assis *et al.*, 2003). Contudo, fábricas de alumínio têm sido responsabilizadas pela emissão do poluente, como na região da Zona Metalúrgica, no estado de Minas Gerais (Assis *et al.*, 2003).

Algumas espécies vegetais, como *Panicum maximum* cv. Colonião e *Chloris gayana*, têm sido empregadas, no Brasil, como bioindicadoras da presença de flúor na atmosfera (Divan Junior *et al.*, 2007). Para a realização de estudos em campo, é essencial o conhecimento prévio das respostas morfoanatômicas, fisiológicas ou bioquímicas específicas da planta ao flúor, adquirido em experimentos prévios de laboratório, tornando possível a diagnose precisa da injúria (Silva *et al.*, 2000; Fornasiero, 2001; Chaves *et al.*, 2002; Oliva & Figueiredo, 2005).

A sintomatologia, parâmetro mais utilizado para avaliar a sensibilidade de espécies vegetais a diversos fatores estressantes, frequentemente requer validação adicional com interpretação microscópica (Vollenweider *et al.*, 2003; Reig-Arminañ *et al.*, 2004). Sintomas não-específicos, como cloroses e necroses, além de não indicar a natureza do agente estressante envolvido (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007), levam ao surgimento de paradigmas como: “todo estresse ambiental leva a degradação da clorofila” ou “se nenhum patógeno for encontrado, uma causa abiótica deve ser considerada” (Munné-Bosch *et al.*, 2001). Segundo Günthardt-Goerg & Vollenweider (2007), desde que microscopicamente embasada, a sintomatologia pode ser utilizada de forma precisa na diagnose do estresse; os estudos macro e microscópicos, na maioria dos casos realizados de forma independente, devem, portanto, ser integrados assegurando uma diagnose acurada.

A sintomatologia e a caracterização microscópica da injúria têm sido utilizadas como biomarcadores em diversos estudos que visam determinar a sensibilidade das espécies ao flúor (Silva *et al.*, 2000; Fornasiero, 2001; Chaves *et al.*, 2002; Peixoto *et al.*, 2005; Oliva & Figueiredo, 2005), entretanto, pouco enfoque tem sido dado ao valor prognóstico dos parâmetros microscópicos.

Em diversos países, tem sido empregada uma metodologia padronizada que utiliza *Lolium multiflorum* ssp. *italicum*, espécie de gramínea acumuladora de flúor (Ruthsatz & Wey, 1991), no monitoramento de áreas poluídas com esse ânion (VDI-Richtlinie, 1982). Entretanto, Ellenberg (1991) questionou a universalidade do uso desta espécie, uma vez que

condições ambientais locais podem alterar as propriedades ecofisiológicas de *L. multiflorum* e mascarar a sintomatologia específica ao flúor, e sugere o emprego de espécies da flora local. A escassez de dados sobre a sensibilidade das espécies tropicais em relação à poluição limita os possíveis programas de biomonitoramento e avaliação de impactos ambientais, reforçando a necessidade de mais estudos sobre essas espécies (Silva *et al.*, 2000).

Spondias dulcis, popularmente conhecida como cajá-mirim, é uma espécie perenifolia originária da Polinésia que se encontra distribuída em quase todo o Brasil (Souza *et al.*, 1998). Devido à elevada sensibilidade em resposta ao flúor, em comparação com outras espécies arbóreas tropicais, Silva *et al.* (2000) destacaram o potencial bioindicador de *S. dulcis* e propuseram estudos mais amplos a fim de possibilitar a diagnose precisa da injúria por flúor.

Desta forma, objetivou-se determinar, em condições de laboratório, o potencial diagnóstico dos sintomas e prognóstico dos danos microscópicos causados pelo flúor na lâmina foliar de *S. dulcis*.

Material e métodos

Espécie e condições de cultivo - Foram utilizadas plantas de *Spondias dulcis* Forst. F (Anacardiaceae), espécie tropical sensível ao flúor (Silva *et al.*, 2000), fornecidas pelo Viveiro do Parque Estadual do Rio Doce-MG (VPERD). As plantas foram obtidas a partir de propagação semínifera de um único indivíduo adulto situado a 280 m de altitude e localização determinada pelas coordenadas geográficas de 19°57'04'' de latitude sul e 42°50'27'' de longitude oeste, mapeado mediante utilização do sistema de posicionamento global (modelo GPS II plus, Garmin Ltd., Hampshire, UK), nas adjacências do VPERD.

A semeadura foi realizada em sacos plásticos, de 10 cm de diâmetro por 22 cm de comprimento, contendo mistura de solo, moinha de carvão e adubo, composição usualmente utilizada no VPERD (Tab. 1). Dois meses após a semeadura, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada a 649 m de altitude, 20°45'20'' de latitude sul e 42°52'40'' de longitude oeste, para aclimação. Após o transplântio para vasos de 2,6 dm³, as plantas receberam solução nutritiva de Hoagland a 0,25 de força (Hoagland & Arnon, 1950), a cada cinco dias, durante o período de aclimação (dois meses) e até o término do experimento. As simulações de nevoeiro foram conduzidas na Sala de Estudos em Poluição da UCP, de 23 a 27 de julho de 2005. As médias de temperatura máxima, média, mínima e umidade relativa durante o período foram: 24,8; 17,5; 11,9°C e 83,6%, respectivamente.

Tratamentos - O experimento de simulação foi adaptado a partir da metodologia proposta por Silva *et al.* (2000) e foi realizado na Sala de Estudos em Poluição da UCP. As plantas de *S. dulcis* apresentavam, em média, 38 cm de altura e oito nós portando folhas compostas com sete folíolos. As plantas foram expostas a nevoeiros, diariamente, durante 20 min, totalizando 5,22 mm dia⁻¹ de precipitação em uma câmara de simulação, com sistema de “spray”, adaptada do modelo proposto por Evans *et al.* (1977). Os tratamentos com flúor (pH=6,0) foram preparados adicionando-se fluoreto de potássio em água deionizada (5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹). No tratamento controle, utilizou-se somente água deionizada (pH= 6,0). Antes e depois da exposição, as plantas ficaram expostas sob um painel luminoso composto por oito lâmpadas incandescentes de mercúrio (E-27, 220-230 V, 250 W), por 15 min, sob irradiância de 95 W m⁻². O início da abscisão foliar nas plantas expostas ao flúor, após o quarto nevoeiro, determinou o término do experimento e a coleta do material.

Sintomatologia - Durante o período de simulação do nevoeiro, todas as folhas de cada um dos indivíduos (n=5) nos diferentes tratamentos foram fotografadas, diariamente, com o objetivo de registrar o início dos sintomas e a evolução das necroses ocasionadas pelo poluente. Ao final do experimento, todas as folhas da porção basal (5º nó a partir da gema apical até o 8º) e apical (1º nó a partir da gema apical até o 4º) de cada um dos indivíduos de *S. dulcis* foram digitalizadas e submetidas à análise de imagens, com o auxílio do software Image Pro-Plus, versão 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), para cálculo da percentagem de área foliar necrosada.

Determinação do teor de flúor na matéria seca das folhas - Para a quantificação do teor de flúor na matéria seca das folhas, amostras (n=5) da porção basal (5º nó a partir da gema apical até o 8º) e apical (1º nó a partir da gema apical até o 4º) de todos os tratamentos foram previamente secas em estufa, a 70 °C, e reduzidas, em moinho do tipo Wiley, a partículas com dimensões inferiores a 1 mm. Posteriormente, alíquotas de 0,5 g, de cada repetição, foram submetidas à extração em ácido perclórico 0,1 M (Garcia-Ciudad *et al.*, 1985), utilizando-se o ajustador de força iônica (Larsen & Widdowson, 1971), para determinação potenciométrica do teor de flúor, com eletrodo específico. As análises foram conduzidas em duplicata e repetidas duas vezes.

Análises microscópicas - Para as análises microscópicas, foram coletadas amostras da porção mediana de folíolos em expansão, retiradas de folhas do terceiro ou quarto nó (a partir da

gema apical). Os fragmentos foliares coletados não apresentavam sintomas, com o intuito de identificar caracteres microscópicos prognósticos de injúria por flúor.

Para análise micromorfológica, amostras foliares foram fixadas em solução de Karnovsky (solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão cacodilato de sódio (pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio 5 mM) (Karnovsky, 1965). As amostras de folíolos foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série etílica, e secas ao ponto crítico (equipamento modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A superfície dos folíolos foi coberta com ouro em metalizador (modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) e documentada em microscópio eletrônico de varredura com câmera digital (modelo Leo 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Para os estudos anatômicos, após fixação na solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e desidratação em série etílica, as amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais e paradérmicos, com 8 e 3 µm de espessura, respectivamente, foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e corados em azul de Toluidina (pH=4,0) (O'Brien & McCully, 1981). As lâminas permanentes foram montadas em Permount. As imagens foram capturadas utilizando-se um microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo, com câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments inc. New York, USA), no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Para análise micromorfométrica realizou-se, nos cortes paradérmicos, a mensuração da porcentagem ocupada pelos espaços intercelulares no parênquima lacunoso. Nos cortes transversais, mensurou-se a espessura do limbo, do parênquima paliçádico e do lacunoso e a altura das células epidérmicas das faces adaxial e abaxial, na porção da lâmina foliar entre a margem e a nervura mediana. Foram realizadas 27 medidas/repetição/parâmetro, totalizando 162 registros por repetição, utilizando-se o software Image Pro-Plus, versão 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Análise dos dados - O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (0, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹) e cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (Euclides, 1983), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os dados referentes à porcentagem de área foliar necrosada das porções apical e basal das plantas

foram transformados em sigmoidal $f = a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ e linear $f=y_0+a*x$, respectivamente, sendo ajustadas equações de regressão.

Resultados

Sintomatologia e teor de flúor na matéria seca - Os sintomas surgiram 24 h após o primeiro nevoeiro simulado com flúor, nas folhas das plantas expostas a 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de F⁻ (Fig. 1-11). Observou-se o avanço mais acentuado das necroses nas plantas submetidas a nevoeiros com concentrações de 15 (Fig. 6-8) e 20 mg L⁻¹ de F⁻ (Fig. 9-11), não sendo observados sintomas nas plantas expostas a 5 mg L⁻¹ de F⁻ após o término das simulações. A abscisão foliar teve início 96 h após o primeiro nevoeiro simulado com flúor, nas folhas em expansão das plantas expostas a 15 e 20 mg L⁻¹ de F⁻.

No tratamento controle, os folíolos de *S. dulcis* apresentavam coloração verde brilhante típica (Fig. 1). Nas plantas expostas ao flúor, necroses amarronzadas avançando pelas nervuras mediana e laterais surgiram em todos os folíolos, tanto em áreas marginais quanto intervenais, principalmente (92,5% dos folíolos necrosados) na base da lâmina (Fig. 2-5), sendo caracterizadas por apresentar três zonas com colorações distintas: enegrecida, acinzentada e marrom (Fig. 3-5).

A porção apical das plantas expostas ao poluente apresentou maior percentagem de área foliar necrosada, em relação à porção basal. Nos folíolos da porção apical das plantas expostas a 20 mg L⁻¹, 45% da área foliar apresentava-se necrosada, enquanto que somente 6% da área foliar na porção basal exibiu injúrias no final do experimento (Fig. 12-13).

As folhas da porção basal de plantas submetidas a concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de F⁻ apresentaram, respectivamente, teor de flúor 28,7; 51,1; 75,4 e 182,7% maior do que no tratamento controle (Fig. 14). Já na porção apical das plantas, os teores do poluente foram, respectivamente, 46,6; 72,5; 106,5 e 219,4% maiores em comparação com o tratamento controle, quando expostas a 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de F⁻ (Fig. 14).

A correlação entre o grau de injúria foliar e o teor de flúor nas folhas (Fig. 15) foi significativa ($p<0,01$) e alta nas porções basal e apical das plantas (0,86 e 0,89, respectivamente).

Análise microscópica - Os folíolos de *S. dulcis* são glabros (Fig. 16, 20, 24), hipoestomáticos (Fig. 16 e 20), dorsiventrais com epiderme unisseriada e mesofilo com idioblastos cristalíferos contendo drusas (Fig. 24). O parênquima paliçádico é formado por uma camada de células e o lacunoso por quatro a cinco camadas (Fig. 24) de células braciiformes (Fig. 28).

Todos os tratamentos com flúor ocasionaram danos micromorfológicos na epiderme em ambas as faces do folíolo simultaneamente. Na face adaxial ocorreu a perda de turgor e o achatamento da parede periclinal externa (Fig. 17), além de alteração no relevo de grupos de células (Fig. 18) e a formação de concavidades em algumas regiões da lâmina foliar (Fig. 19).

Na epiderme da face abaxial, além da alteração no relevo da superfície foliar, que adquire aspecto enrugado (Fig. 21), ocorreu a erosão de ceras epicuticulares (Fig. 22), colonização da superfície foliar por fungos e a ruptura da parede periclinal externa da epiderme, expondo as células do mesofilo ao poluente (Fig. 23).

Todas as concentrações de flúor (5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹) tiveram efeito significativo sobre os parâmetros quantitativos avaliados em lâminas foliares assintomáticas, exceto sobre a altura das células epidérmicas da face abaxial (Tab. 2).

Nas plantas expostas a 20 mg L⁻¹ de flúor, houve redução de 13,3% na espessura do limbo (Tab. 2). O mesofilo e a epiderme representam, respectivamente, 85 e 15% da espessura total do folíolo de plantas de *S. dulcis*, no tratamento controle, e 83 e 17% nas plantas expostas a 20 mg L⁻¹ de flúor. A correlação entre espessura do limbo e a altura das células do parênquima paliçádico e lacunoso foi alta (0,86 e 0,89, respectivamente) e significativa ($p < 0,01$). Contudo, não se observou alteração significativa na proporção entre o parênquima paliçádico e o lacunoso. Nas plantas expostas a 20 mg L⁻¹ de flúor, observou-se aparente aumento no tamanho dos cloroplastos os quais apresentaram evidente acúmulo de grãos de amido (Fig. 27).

Nas plantas expostas a 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de flúor no nevoeiro, observa-se aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de espaços intercelulares, em comparação com o tratamento controle (Tab. 2), além da presença de grânulos intensamente corados de verde pelo azul de toluidina (Fig. 25, 29), e gotículas nas proximidades das terminações xilemáticas (Fig. 30), localizadas na interface entre parênquima paliçádico e lacunoso.

Discussão

Na literatura, os sintomas em resposta ao flúor são caracterizados como necroses marginais e apicais, não havendo, na maior parte dos estudos, uma descrição mais apurada no que diz respeito a diferenças de coloração no tecido necrosado (Silva *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2002; Oliva & Figueiredo, 2005).

No presente trabalho, a coloração amarronzada observada nas necroses provavelmente indica a oxidação dos compostos fenólicos que se acumularam em resposta à alta concentração de flúor nessas regiões, onde as gotas de nevoeiro se instalaram, conforme

observado por Hara (2000) em folhas de *Panicum maximum* expostas ao poluente. Algumas características observadas nos sintomas, como a evolução da necrose ao longo da lâmina pelas nervuras mediana e laterais, parecem ser específicas de *S. dulcis* em resposta ao flúor, já que não foram observados em sintomas foliares causados pela chuva ácida (Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006). Fornasiero (2001) descreveu as necroses foliares em plantas de *Hypericum perforatum*, em resposta ao flúor, como marrom-avermelhadas, indicando que possa haver algumas diferenças entre espécies vegetais distintas. Já Peixoto *et al.* (2005) destacaram, em folhas de *Salvinia auriculata*, o formato arredondado e a coloração marrom escura das necroses causadas pelo poluente.

As plantas de *S. dulcis* reagiram rápido ao poluente, em conformidade com o relatado por Silva *et al.* (2000) que, ao constatarem a elevada sensibilidade da espécie ao elemento, também observaram necroses surgindo 24 h após a primeira exposição à chuva simulada contendo 30 mg L⁻¹ de flúor, sem o aparecimento de cloroses. Em plantas de *Hypericum perforatum* expostas ao poluente (Fornasiero, 2001), cloroses antecederam a necrose do tecido foliar, fato também relatado por Silva *et al.* (2000) em *Gallesia gorazema*. A elevada sensibilidade de *S. dulcis* ao flúor leva à morte muito rápida do tecido não havendo tempo hábil para a formação de cloroses. Contudo, o surgimento rápido de necroses também pode estar relacionado à exposição das plantas a elevadas concentrações do poluente (Weinstein & Davison, 2003). Os sintomas observados em plantas de *S. dulcis* expostas a nevoeiro com flúor, no presente experimento, foram idênticos aos observados em experimentos de simulação de chuva com flúor conduzidos anteriormente (Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007), o que ressalta a confiabilidade do uso da sintomatologia na diagnose do estresse causado pelo poluente.

A quantidade de flúor acumulada e o grau de injúria nos tecidos podem variar com a idade da folha (Silva *et al.*, 2000). Em *S. dulcis*, os dados de acúmulo do poluente sugerem maior capacidade de acumulação do elemento pelas folhas em expansão, já que na porção apical das plantas observou-se um maior teor de flúor na matéria seca do que na porção basal.

Adicionalmente, as folhas em expansão, com metabolismo mais intenso, devem ser mais sensíveis a ação do flúor, conforme observado por Azevedo (1995) em *Glycine max*.

Em *S. dulcis* as folhas da porção apical da planta acumularam mais flúor que as folhas basais e exibiram maior porcentagem de área necrosada; contudo, não existe relação direta entre quantidade de flúor e grau de injúria, pois as folhas mais basais também acumularam muito flúor. O mesmo ocorreu em plantas de *Magnolia ovata* expostas ao poluente (Sant'Anna-Santos *et al.*, 2007). Em algumas espécies vegetais existe uma relação entre o

maior grau de injúria e as taxas elevadas de acúmulo do poluente (Klumpp *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2000; Fornasiero, 2001).

O flúor, fornecido às plantas mediante precipitação simulada ou nevoeiro, atinge o interior da folha principalmente através da cutícula e pode ser absorvido pelas células do mesofilo alcançando o simplasto, ou ser arrastado pela corrente transpiratória até as terminações do xilema, onde é acumulado (Oliva & Figueiredo, 2005). O padrão de distribuição de flúor na maioria das gramíneas sugere que ele se acumula em tecidos com maior atividade metabólica (Oliva & Figueiredo, 2005). A penetração do ânion, via apoplasto, nos tecidos jovens da folha é facilitada pela menor quantidade de cutina e ceras epicuticulares nas células da epiderme e pela presença de maior quantidade de pectinas (Kannan, 1986), quando comparada com folhas totalmente expandidas.

Como atribuir um sintoma a um dado fator de estresse específico permanece difícil, a sintomatologia requer outros parâmetros para assegurar uma diagnose precisa, como as análises microscópicas (Reig-Arminañ *et al.*, 2004; Vollenweider *et al.*, 2003). Neste trabalho, o tratamento com flúor causou alterações na epiderme em ambas as faces dos folíolos, sob todas as concentrações avaliadas (5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹), apesar das amostras terem sido retiradas de folhas sem sintomas. As alterações micromorfológicas observadas na lâmina foliar de *S. dulcis* estão, provavelmente, relacionadas à atuação do flúor na desestruturação da cutícula e das ceras epicuticulares o que facilitaria a sua entrada na epiderme e permitiria, secundariamente, a invasão por patógenos (Heredia *et al.*, 1998), conforme observado por Sant'Anna-Santos *et al.* (2006), na mesma espécie, em resposta a chuva ácida simulada.

Existem poucos relatos sobre os efeitos do flúor na micromorfologia foliar (Azevedo, 1995; Hara, 2000; Chaves *et al.*, 2002; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2007; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007), e pouco enfoque é dado ao parâmetro como biomarcador prognóstico. A presença de danos expressivos em fragmentos retirados de folhas aparentemente saudáveis indica que a micromorfologia pode ser útil em estudos de biomonitoramento de campo, podendo ser utilizada como biomarcador da presença de poluentes na atmosfera. A coloração verde conferida pelo azul de toluidina indica a natureza fenólica dos grânulos e gotículas observados ao microscópio de luz, conforme descrito por Briggs *et al.* (2005). Segundo Oliva & Figueiredo (2005), o flúor se deposita na proximidade das terminações xilemáticas, o que explica o acúmulo de fenólicos nesta região. O acúmulo de fenóis tem sido interpretado como um mecanismo de defesa das plantas (Vaughn & Duke, 1984) e já foi relatado em outras espécies vegetais expostas ao flúor (Chaves *et al.*, 2002; Sant'Ann-Santos *et al.*, 2007). A redução na espessura dos folíolos sem sintomas expostos ao poluente, principalmente no

mesófilo, reflete as alterações do relevo da folha observadas ao microscópio eletrônico de varredura, indicando que a microscopia de luz deve ser utilizada, em conjunto com outras técnicas, para melhor caracterizar a fitotoxidade do flúor.

A maioria das concentrações de flúor utilizadas no nevoeiro levou ao surgimento e evolução muito rápidos das necroses induzindo a abscisão foliar, exceto 5 mg L⁻¹. Desta forma, esta concentração é indicada para experimentos futuros onde a indução de injúrias seja mais lenta e possibilite avaliar se as cloroses antecedem a necrose do tecido. Os sintomas observados em *S. dulcis* em resposta ao flúor não são específicos, porém, apresentam padrões exclusivos como coloração típica, o início da necrose na porção basal do folíolo e a maior porcentagem de área foliar necrosada na porção apical da planta. Desta forma, recomenda-se avaliar, em estudos de biomonitoramento ativo, o potencial desses padrões específicos no diagnóstico preciso de injúria por flúor. As alterações na estrutura e micromorfologia foram evidentes nas amostras coletadas de folhas sem sintomas, demonstrando que estas ferramentas possuem potencial para serem utilizadas no prognóstico de injúria por flúor. Contudo, a utilização destas técnicas em conjunto com análises fisiológicas e ultra-estruturais, em experimentos futuros, serão fundamentais para elucidar a fitotoxidez causada pelo poluente.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa ao primeiro autor, a Thiago Gonçalves Alves, pelo auxílio no processamento das amostras para microscopia de luz e a Cláudia Martellet Fogaça e Leonardo David Tuffi Santos, pela colaboração nas análises estatísticas.

Referências bibliográficas

- Assis, C.M.; Silveira, I.L. & Anizelli, R.C.M. 2003. Automonitoramento da qualidade do ar em Ouro Preto/MG. In: **Congresso Interamericano de Qualidade do Ar**, 3., Canoas. Anais Porto Alegre, AIDIS, ABES, CD-ROM.
- Azevedo, A.A. 1995. **Ação do flúor, em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de *Glycine max* (L.) Merrill**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 95p.

- Briggs, C.L.; Morris, E.C. & Ashford, A.E. 2005. Investigations into seed dormancy in *Grevillea linearifolia*, *G. buxifolia* and *G. Sericea*: Anatomy and histochemistry of the seed coat. **Annals of Botany** **96**: 965-980.
- Chaves, A.L.F.; Silva, E.A.M.; Azevedo, A.A.; Cano, M.A.O. & 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 Botanica Brasilica** **16**: 395-406.
- Divan Junior, A.M.; Oliva, M.A.; Martinez, C.A. & Cambraia, J. 2007. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colonião. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **67**: 247-253.
- Ellenberg, H. 1991. Bioindicator and biological monitoring. In: **Biological monitoring. Signal from the environment**. Gate/GTZ , Braunschweig, p.13-74.
- Euclides, R.F. 1983. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG) – Manual**. CPD/UFV, Divisão de Pesquisas e Desenvolvimento. Viçosa, Minas Gerais. 74p.
- Evans, L.S.; Gmur, N.F. & Costa, F. 1977. Leaf surface and histological perturbations of leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus* after exposure to simulated acid rain. **American Journal of Botany** **64**: 903-913.
- Fornasiero, R.B. 2001. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science** **161**: 979-985.
- Garcia-Ciudad, A.; Garcia-Criado, B. & Pontón-San Emeterio, C. 1985. Determination of fluoride in plant samples by a potentiometric method and near-infrared reflectance spectroscopy. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** **16**: 1107-1122.
- Günthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P. 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. **Environmental Pollution** **147**: 467-488.

- Hara, S. 2000. **Alterações estruturais em folhas de *Panicum maximum* Jacq. submetidas a chuva simulada com flúor.** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 48p.
- Heredia, A.; Casado, C.G.; Laguna, L.; Reina, J.J.; Serrano, J.M. & Domínguez, E. 1998. La cuticula vegetal: estructura y funciones. **Ecologia 2**: 293-305.
- Hoagland, D.R. & Arnon DI. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil.** (California Agricultural Experiment Station: Berkeley, CA).
- Kannan, S. 1986. Physiology of foliar uptake of inorganic nutrients. **Proceeding of the Indian Academy Science 96**: 457-70.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology 27**: 37-138.
- Klumpp, A.; Klumpp, G.; Domingos, M. & Guderian, R. 1995. *Hemerocallis* as bioindicator of fluoride pollution in tropical countries. **Environmental Monitoring and Assesment 35**: 27-42.
- Larsen, S. & Widdowson, A.E. 1971. Soil fluorine. **Journal of Soil Science 22**: 210-221.
- Munné-Bosch, S.; Jubany-Marí, T. & Alegre, L. 2001. Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. **Plant Cell and Environment 24**: 1319-1327.
- O'Brien, P.P. & McCully, M.E. 1981. **The study of plants structure principles and select methods.** Termarcarphi Pty. Ltda, Melbourne-Australia, 45p.
- Oliva, M.A. & Figueiredo, J.G. 2005. Gramíneas bioindicadoras de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica 28**: 389-397.
- Peixoto, P.H.P.; Pimenta, D.S. & Antunes, F. 2005. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 40**: 727-734.

- Reig-Arminañ, J.; Calatayud, V.; Cervero, J.; Garcia-Breijo, F.J.; Ibars, A. & Sanz, M.J. 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). **Environmental Pollution** 132: 321-331.
- Ruthsatz, B. & Wey, H. 1991. **Concept for a biological monitoring study**. In: Biological monitoring. Signal from the environment. Gate/GTZ ed., Braunschweig, p. 75-128.
- Sant'Anna-Santos, B.F. & Azevedo, A.A. 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 48-50.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M.; Alves, E.F.; Silva, E.A.M. & Aguiar, R. 2006. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany** 58: 158-168.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Duque-Brasil, R.; Azevedo, A.A.; Silveira, A.S.; Araújo, J.M. & Aguiar, R. 2007. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore** 31: 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** 23: 385-393.
- Smith, F.A. & Hodge, H.C. 1979. Airborne Fluorides and Man: Part I. CRC **Critical Review of Environment Control** 8: 293-372.
- Souza, F.X.; Sousa, F.H.L. & Melo, F.I.O. 1998. Aspectos morfológicos de endocarpos de cajarana (*Spondias cytherea* sonn. - Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Sementes** 20: 141-146.
- Vaughn, K. & Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum** 60: 106-112.
- VDI. 1982. Richtlinie 3792. **Messen der Immissions-Wirkdosis von gas-und staubförmigem Fluorid in Pflanzen mit dem Verfahren der standardisierten**

Graskultur. Blatt 2. VDIHandbuch Reinhaltung der Luft. Verein Deutscher Ingenieure, Düsseldorf, p.1-6.

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

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

Tabela 1. Resultados da análise química do solo utilizado como substrato nos vasos para cultivo das plantas de *Spondias dulcis* Forst. F. SB (Soma de bases trocáveis); CTC (t) (Capacidade de troca catiônica efetiva); CTC (T) (Capacidade de troca catiônica a pH=7,0); V (Índice de saturação de bases); m (Índice de saturação de alumínio); ISNa (Índice de saturação de sódio); MO (Matéria orgânica = C.Org $\times$ 1,724 – Walkley-Black); P-rem (Fósforo remanescente).

<i>pH</i>	<i>P</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Ca</i> ²⁺	<i>Mg</i> ²⁺	<i>Al</i> ³⁺	<i>H+Al</i>	<i>SB</i>	<i>(t)</i>	<i>(T)</i>
H ₂ O	mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³						
7,25	19,1	1727	-	6,16	1,12	0,0	1,0	11,7	11,7	12,7
<i>V</i>	<i>m</i>	<i>ISNa</i>	<i>MO</i>	<i>P-rem</i>	<i>Zn</i>	<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Cu</i>	<i>B</i>	<i>S</i>
	%		dag kg ⁻¹	mg L ⁻¹				mg dm ⁻³		
92,1	0	-	3,68	23,3	-	21,6	54,1	0,48	6,84	262,6

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de flúor sobre parâmetros estruturais da lâmina foliar de plantas de *Spondias dulcis* Forst F., após quatro dias consecutivos de nevoeiro simulado. Ed (Altura das células da epiderme da face adaxial); Eb (Altura das células da epiderme da face abaxial); Pp (Parênquima paliçádico); Pl (Parênquima lacunoso); Ef (Espessura do folíolo); Ei (Percentagem de espaços intercelulares do parênquima lacunoso).

$\mu\text{m} / \text{mg L}^{-1}$	0	5	10	15	20
Ed	26,24 $\pm$ 1,77a	25,85 $\pm$ 0,68a	23,56 $\pm$ 1,39ab	22,47 $\pm$ 2,06b	27,72 $\pm$ 1,34ab
Pp	94,58 $\pm$ 3,20a	80,03 $\pm$ 1,76b	81,56 $\pm$ 2,11b	83,45 $\pm$ 7,49b	80,33 $\pm$ 6,68b
Pl	135,79 $\pm$ 2,11a	116,63 $\pm$ 0,72c	125,3 $\pm$ 2,83b	111,9 $\pm$ 3,32b	115,32 $\pm$ 4,06b
Eb	14,32 $\pm$ 1,38a	13,51 $\pm$ 0,96a	13,2 $\pm$ 0,78a	13,64 $\pm$ 0,89a	14,32 $\pm$ 0,71a
Ef	270,93 $\pm$ 5,15a	263,02 $\pm$ 1,45bc	243,61 $\pm$ 2,48b	231,45 $\pm$ 12,02c	234,71 $\pm$ 4,99bc
Ei	18,73 $\pm$ 0,63b	19,66 $\pm$ 0,70b	22,97 $\pm$ 0,75a	22,97 $\pm$ 0,75a	23,43 $\pm$ 0,66a

Médias seguidas por letras iguais na vertical não diferem entre si, quando comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. Cada valor representa a média de cinco repetições.

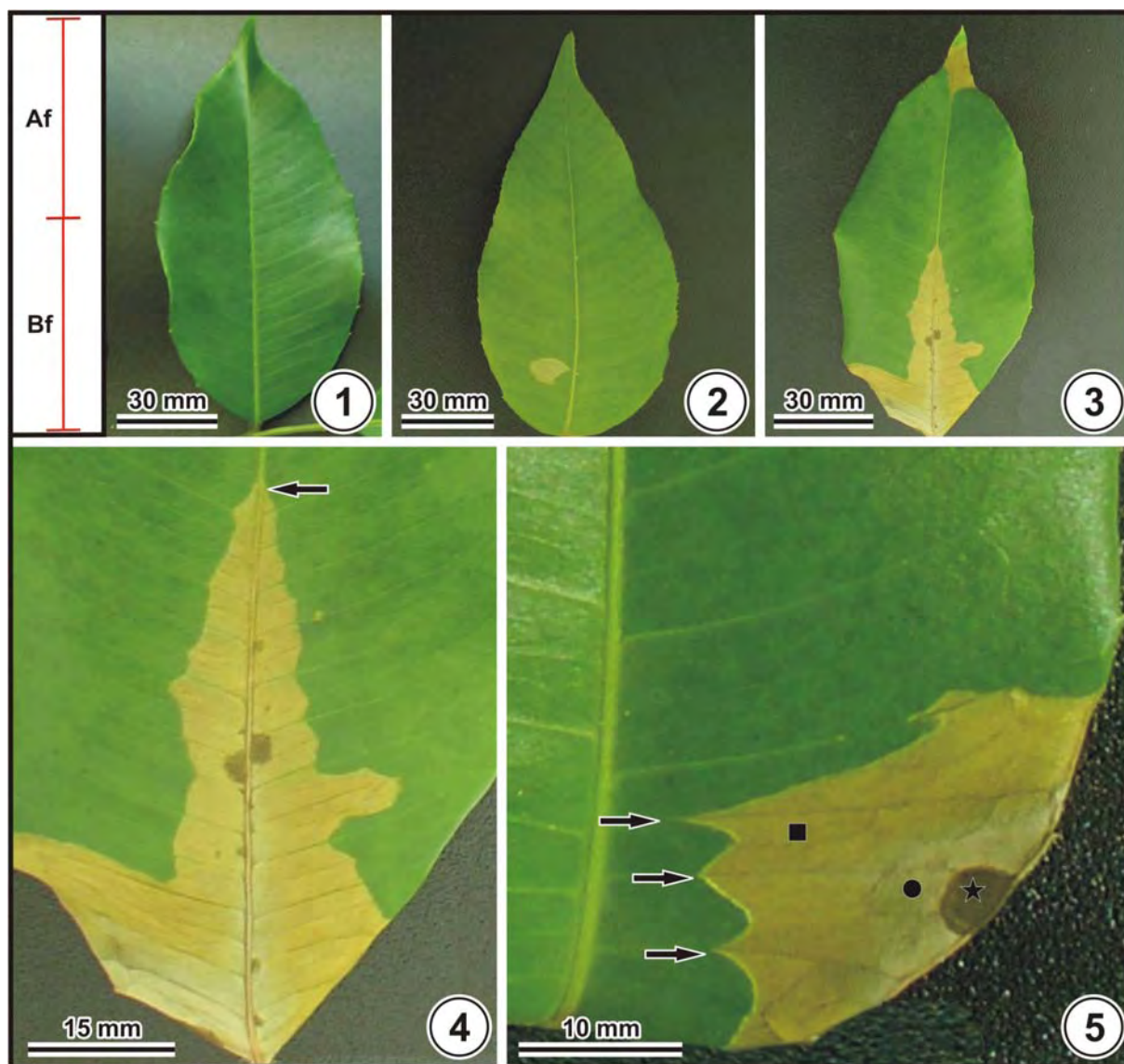


Figura 1-5. Sintomas observados em folíolos de *Spondias dulcis* Forst F. expostos a nevoeiro simulado com flúor (10 mg L^{-1}), durante quatro dias consecutivos. 1. Tratamento controle (0 mg L^{-1}). 2. Necrose intervenal na base do folíolo (Bf). 3. Ápice (Af) e base (Bf) do folíolo necrosados. 4. Necrose avançando pela nervura mediana ($\rightarrow$). 5. Necrose progredindo pelas nervuras laterais ($\rightarrow$) e constituída por três zonas de colorações distintas: enegrecida (★), acinzentada (●) e marrom (■).

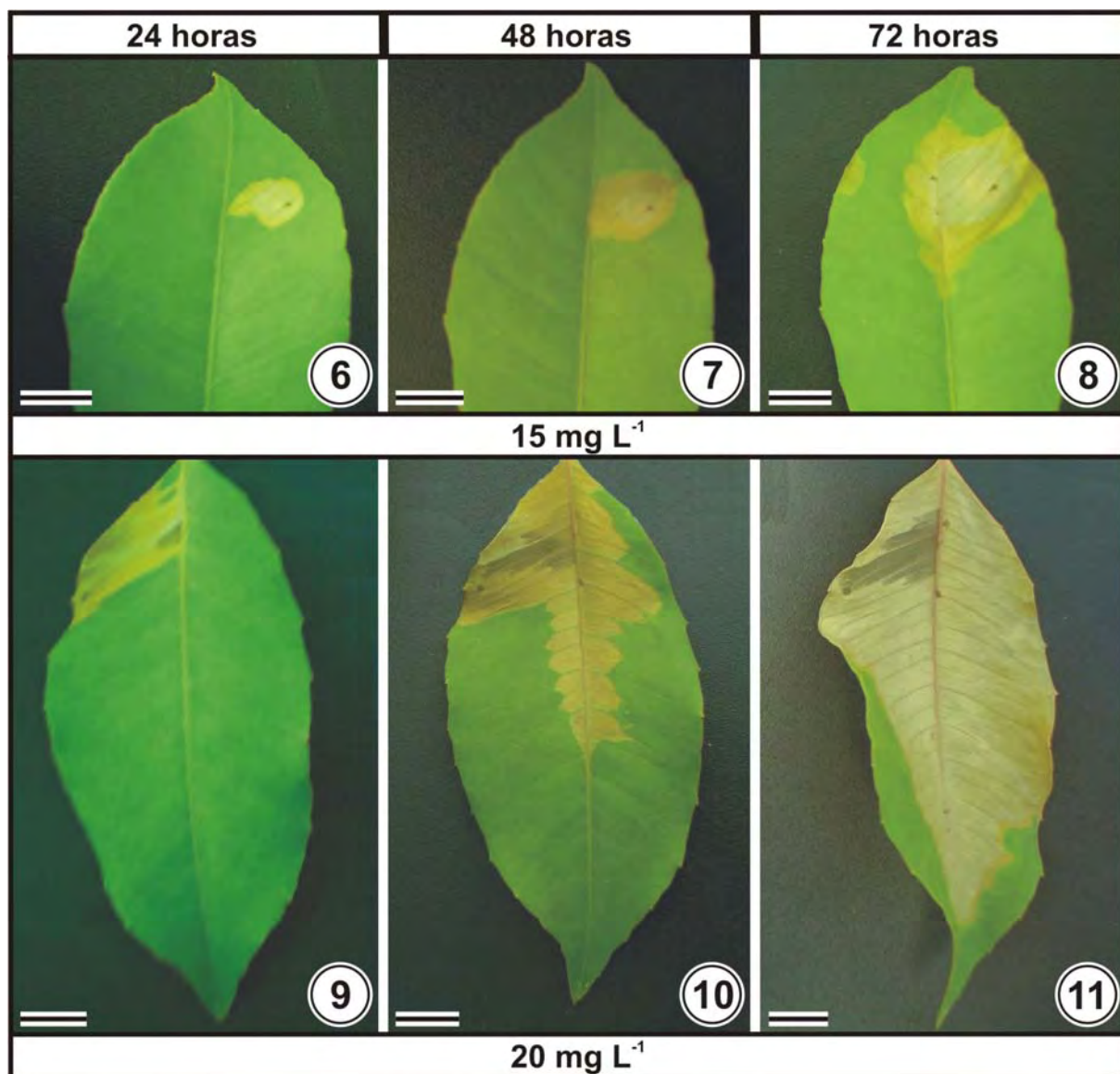


Figura 6-11. Evolução dos sintomas observados em folíolos de *Spondias dulcis* Forst F. expostos ao flúor 24 (6 e 9), 48 (7 e 10) e 72 (8 e 11) h após o primeiro nevoeiro. 6-8. Evolução da necrose nas plantas expostas a 15 mg L⁻¹. 9-11. Evolução da necrose nas plantas expostas a 20 mg L⁻¹. Barras: 15 mm.

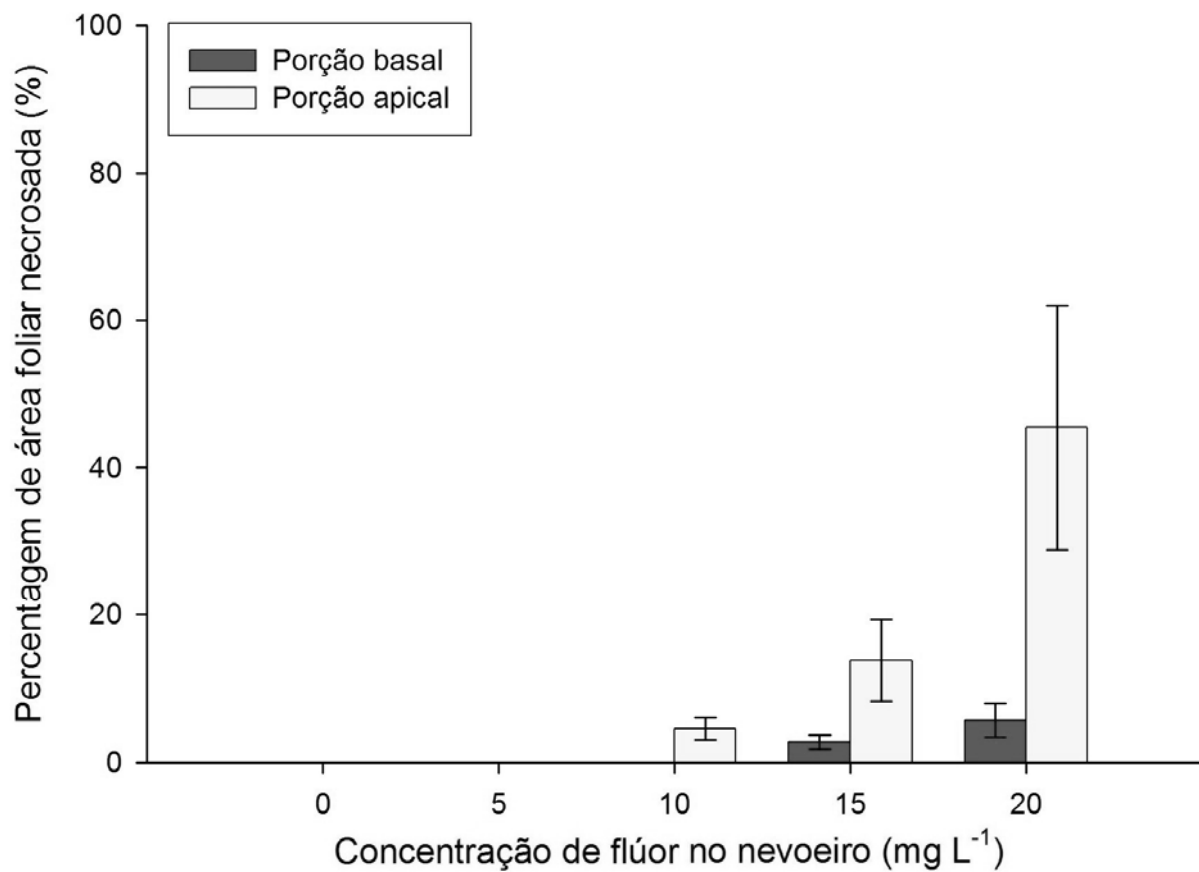


Figura 12. Percentagem de área foliar necrosada das porções basal e apical de plantas de *Spondias dulcis* Forst F., expostas a diferentes concentrações de flúor em nevoeiro simulado (0, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹), durante quatro dias consecutivos. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=5).

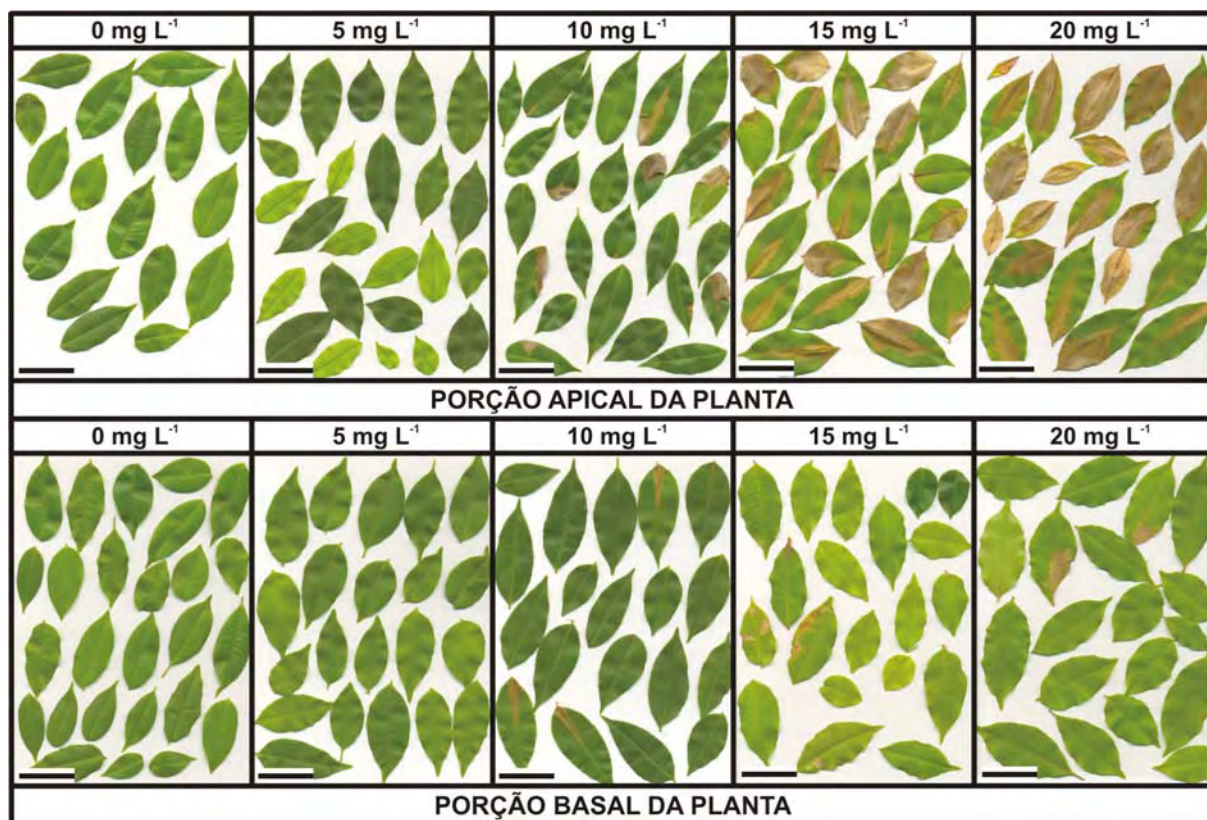


Figura 13. Sintomas observados em folíolos das porções apical e basal de plantas de *Spondias dulcis* Forst F. expostas a diferentes concentrações de flúor em nevoeiro simulado (0, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹), durante quatro dias consecutivos. Barras: 50 mm.

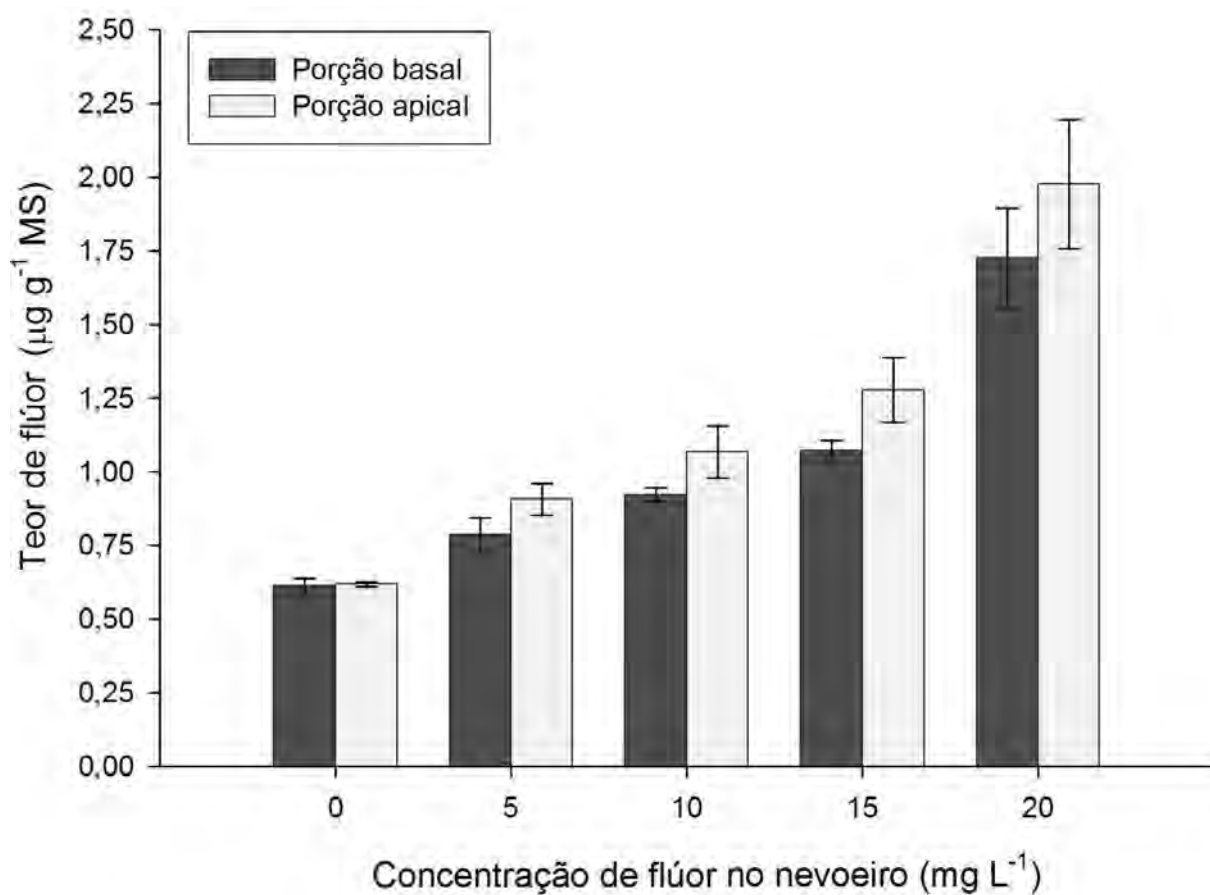


Figura 14. Teor de flúor ($\mu\text{g g}^{-1}\text{ MS}$) nas folhas das porções basal e apical de plantas de *Spondias dulcis* expostas a diferentes concentrações de flúor (0, 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1}) em nevoeiro simulado, durante quatro dias consecutivos. As barras verticais indicam o desvio padrão ($n=5$).

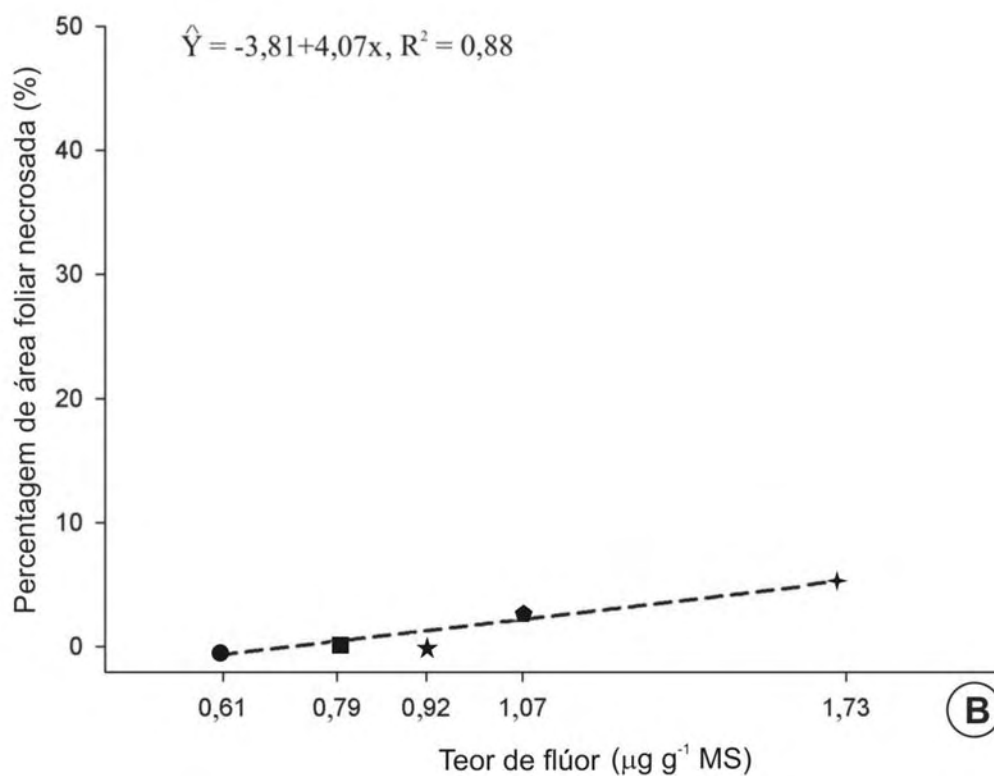
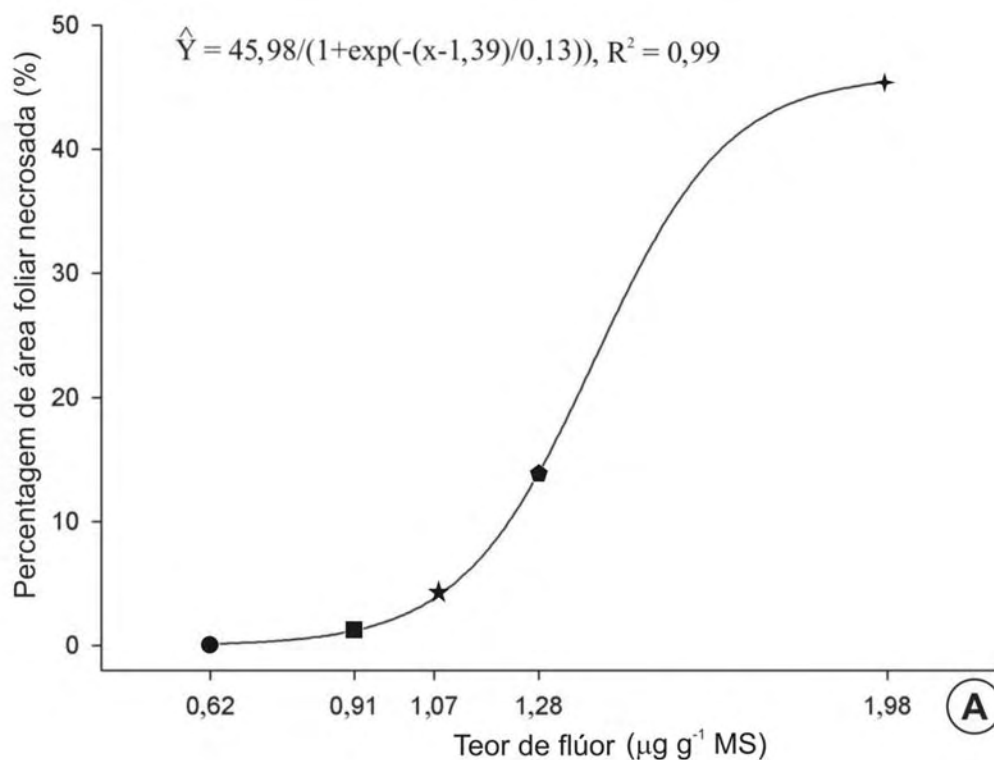


Figura 15. Percentagem de área foliar necrosada das porções apical (A) e basal (B) de plantas de *Spondias dulcis* Forst F. expostas a diferentes concentrações de flúor 0 (●), 5 (■), 10 (★), 15 (◆) e 20 (♦) mg L⁻¹ em nevoeiro simulado, durante quatro dias consecutivos. Cada ponto representa a média de cinco repetições.

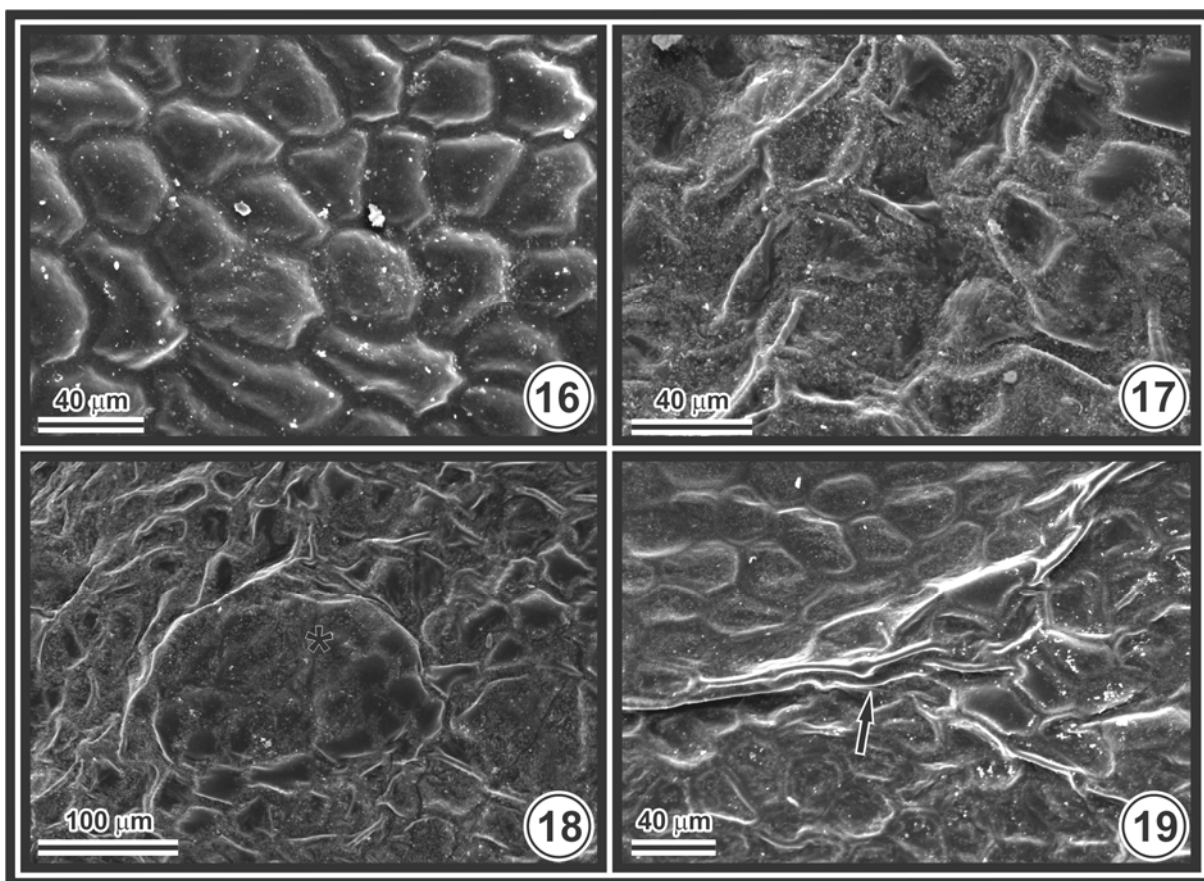


Figura 16-19. Efeitos do flúor na superfície adaxial da lâmina foliar de *Spondias dulcis* Forst F. (micrografias eletrônicas de varredura). 16. Tratamento controle: células túrgidas. 17-19. Flúor. 17. 5 mg L⁻¹: detalhe de células com paredes externas achatadas. 18. 10 mg L⁻¹: alteração no relevo celular (*). 19. 20 mg L⁻¹: concavidades (→).

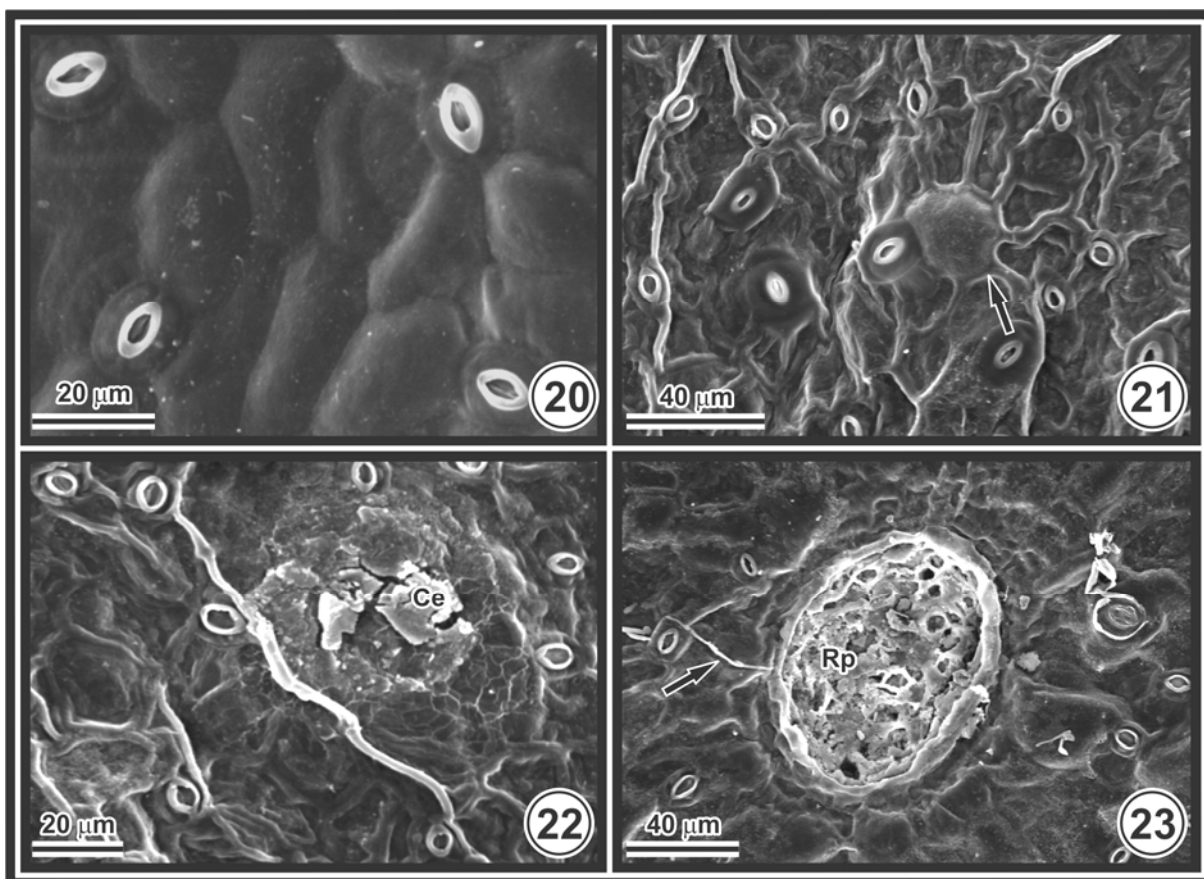


Figura 20-23. Efeitos do flúor na superfície abaxial da lâmina foliar de *Spondias dulcis* Forst F. (micrografias eletrônicas de varredura). 20. Tratamento controle: células túrgidas. 21-23. Flúor. 21. 10 mg L⁻¹: relevo celular alterado (→). 22. 15 mg L⁻¹: erosão das ceras epicuticulares (Ce). 23. 20 mg L⁻¹: ruptura da parede das células epidérmicas (Rp), expondo as células do parênquima ao flúor; presença de hifas fúngicas (→).

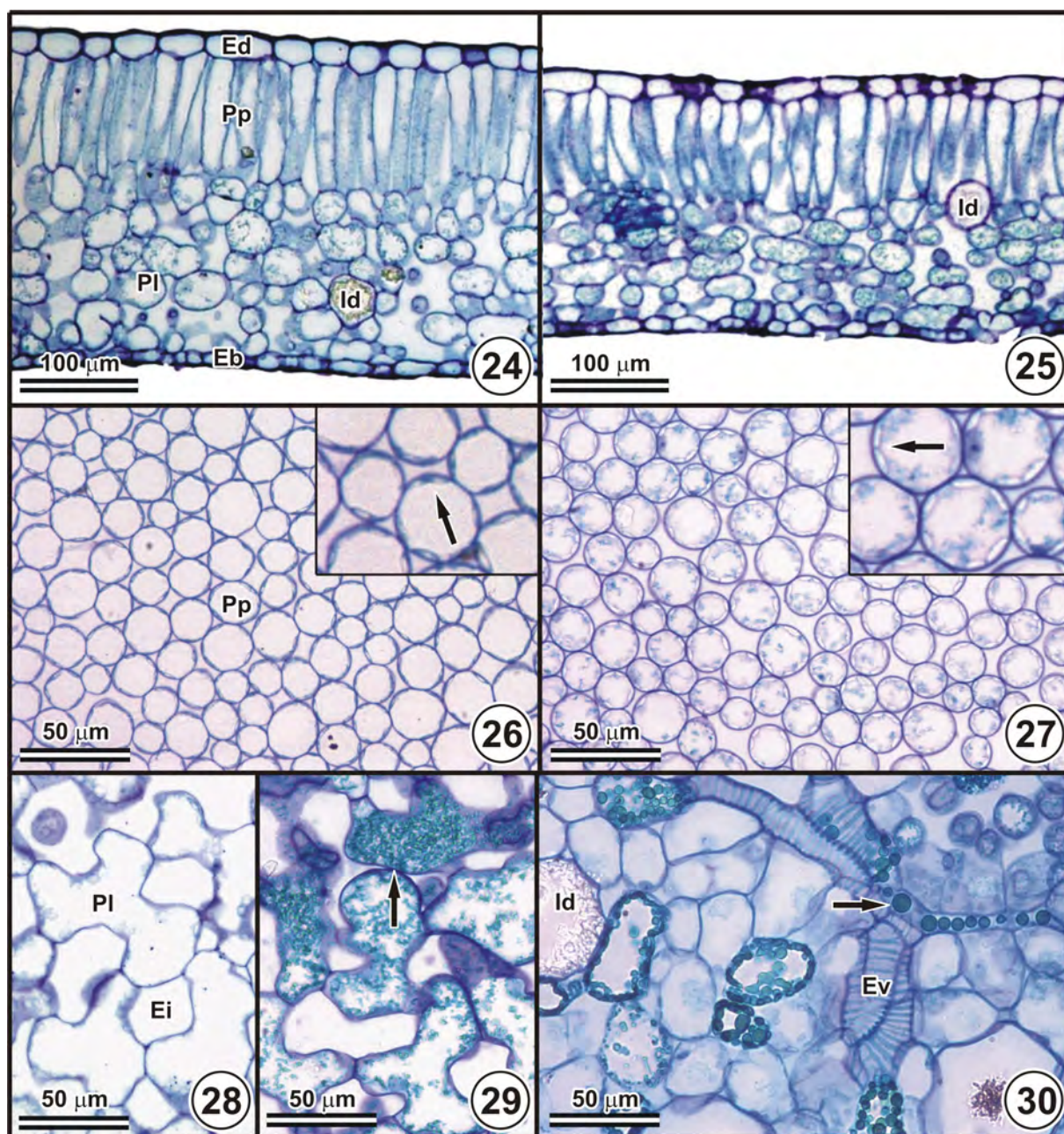


Figura 24-30. Alterações causadas pelo flúor na estrutura foliar de *Spondias dulcis* Forst F. após a exposição das plantas a nevoeiro simulado com flúor em secção transversal (24-25) e paradérmica (26-30) (microscopia de luz). 24, 26 e 28. Tratamento controle. 25, 27, 29 e 30. Flúor (20 mg L^{-1}). 24. Mesofilo dorsiventral. 25. Redução na espessura do mesofilo e acúmulo de grânulos intensamente corados de verde, pelo azul de toluidina, no parênquima lacunoso (Pl). 26. Células de parênquima paliçádico (Pp) com cloroplastos periféricos (→) evidenciados no detalhe. 27. Grãos de amido volumosos (→) mostrados no detalhe. 28. Células braciformes. 29. Grânulos (→). 30. Gotículas coradas de verde (→) na proximidade das terminações xilemáticas. Ed (face adaxial da epiderme); Eb (face abaxial da epiderme); Ev (elemento de vaso); Id (idioblasto).

CAPÍTULO 2

Alterações foliares em *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae), espécie tropical sensível ao flúor, em resposta às imissões de uma fábrica de alumínio

RESUMO – Para avaliar os efeitos das imissões de flúor em *Spondias dulcis*, plantas foram expostas a 78 (área não poluída - NP) e 0,78 km de uma fábrica de alumínio (área poluída - AP). As plantas foram expostas ao flúor durante nove e três dias no experimento 1 (E1) e experimento 2 (E2), respectivamente. O teor de fluoreto e a percentagem de área foliar necrosada foram mensurados de três em três dias no E1 e diariamente no E2. Fragmentos foliares sem sintomas foram coletados e submetidos a técnicas usuais para microscopia de luz e eletrônica de varredura e de transmissão. O teor de flúor aumentou com o tempo de exposição das plantas na AP e permaneceu constante na NP. As necroses, com coloração típica, ocupavam 7,5 e 14,5% da área foliar em plantas expostas por três dias na AP, no E1 e E2, respectivamente. Os danos micromorfológicos tiveram início a partir da face abaxial do folíolo, principalmente associados aos estômatos. O acúmulo de flúor, área foliar necrosada e danos micromorfológicos foram mais pronunciados no E2, sugerindo uma variação episódica nas imissões da fábrica. O acúmulo de grãos de amido foi pronunciado na nervura mediana, contudo, a análise ultra-estrutural também demonstra este evento entre a margem e a nervura. As membranas celulares e os cloroplastos foram afetados pelo poluente. Houve acúmulo de compostos fenólicos nas folhas das plantas expostas ao poluente e de material elétron-denso nas proximidades das terminações xilemáticas. Os eventos microscópicos descritos antecedem o surgimento de sintomas e, desta forma, possuem valor prognóstico. Estes resultados confirmam o potencial de *S. dulcis* como bioindicadora de reação e dos parâmetros visuais e microscópicos como biomarcadores.

Palavras-chave: Flúor, *Spondias dulcis*, anatomia foliar, bioindicação, ultra-estrutura.

Leaf changes in *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae), a fluoride-sensitive tropical species, in response to aluminum plant emissions

ABSTRACT - In order to evaluate the effects of fluoride emissions on *Spondias dulcis*, plants were exposed at 78 (not polluted area - NPA) and 0.78 km of an aluminum plant (polluted area - PA). Experiment 1 (E1) lasted nine days with sample collections every three days, whereas Experiment 2 (E2) lasted three days with daily collections. Percentage of necrotic area and fluoride content were evaluated in the leaves. Leaf fragments without symptoms were collected and examined by usual techniques of light, scanning electron and transmission microscopy. Fluoride content increased with time of plant exposure to PA but was kept constant in NPA. Necroses, with typical coloration, covered 7.5 and 14.5% of the leaf area in plants exposed for three days to PA, in E1 and E2 respectively. Micromorphological damages started on the abaxial surface of the leaflets, always associated with stomata. Fluoride accumulation, necrotic leaf area and micromorphological damages were more evident in E2, suggesting an episodic variation in the emissions. Starch grain accumulation in the midrib was clear, however, the ultra-structural analysis also showed this event between the margin and the rib. Cell membranes and chloroplasts were strongly affected by the pollutant. Granular material accumulation occurred inside and at the boundaries of the ending veinlets. The described microscopic events precede symptom appearance, and therefore have prognostic value. These results confirm the potential of *S. dulcis* as reaction bioindicator and the visual and microscopic parameters as biomarkers.

Key-words: Fluoride, *Spondias dulcis*, leaf anatomy, bioindication, ultra-structure.

Introdução

O monitoramento da qualidade do ar nas adjacências de grandes emissores de fluoreto atmosférico é geralmente restrito a investigações esporádicas a despeito da crescente importância das atividades antropogênicas que emitem flúor em países industrializados e em desenvolvimento (Franzaring *et al.*, 2007). O flúor figura entre os poluentes atmosféricos mais fitotóxicos, sendo comum o surgimento de lesões em plantas susceptíveis ao redor de fontes emissoras do poluente, especialmente fábricas de fertilizantes fosfatados, de alumínio, de vidros e cerâmicas (Weinstein & Davison, 2003).

Quando as concentrações de flúor ultrapassam os limites naturais de ocorrência na atmosfera, espécies susceptíveis apresentam manchas cloróticas e necróticas nas folhas, sendo esta resposta determinada por fatores edafoclimáticos e genéticos (Weinstein & Davison, 2003). Contudo, baixas concentrações do poluente, apesar de não ocasionarem o surgimento de sintomas, podem causar danos invisíveis em espécies muito sensíveis (Fornasiero, 2003), fazendo com que estudos microscópicos sejam ainda mais relevantes. As análises macro e microscópicas, na maioria dos casos realizadas de forma independente, devem ser integradas assegurando uma diagnose mais precisa do efeito dos poluentes sobre as plantas (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). Nos estudos sobre o ozônio, a análise microscópica vem sendo utilizada como ferramenta na validação da causa do estresse (Vollenweider *et al.*, 2003) e na detecção de injúrias em folhas sem sintomas (Reig-Arminañá *et al.*, 2004).

O uso de espécies susceptíveis tem se revelado uma metodologia adequada e de baixo custo para a detecção dos efeitos de poluentes atmosféricos sobre organismos (Klumpp *et al.*, 2001). Entretanto, alguns pré-requisitos devem ser considerados como utilização de uma espécie adaptada às condições climáticas da região alvo do estudo e que apresente potencial em desenvolver sintomas visíveis nas folhas (Strehl & Arndt, 1989), além do conhecimento prévio de respostas morfoanatômicas, fisiológicas e/ou bioquímicas específicas causadas pelo poluente (Oliva & Figueiredo, 2005). *Spondias dulcis* (cajá-mirim), espécie perenifolia originária da Polinésia e distribuída em quase todo o Brasil (Souza *et al.*, 1998), desenvolve sintomas foliares típicos em resposta ao flúor que já foram microscopicamente estudados em plantas submetidas a precipitação simulada contendo o poluente (Silva *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007). Contudo, resultados obtidos em estudos sob condições controladas devem ser extrapolados para condições de campo com cuidado, devido às condições artificiais dos experimentos (Reig-Arminañá *et al.*, 2004). Desta forma, torna-se essencial expor espécies com potencial biondicador às imissões de uma fonte poluidora no

campo e confrontar os dados obtidos com resultados de laboratório antes de afirmar que os danos morfoanatômicos possam ser utilizados como biomarcadores.

Assis *et al.* (2003) observaram, durante os anos de 2000 a 2002, concentrações de fluoreto com valores máximos situados entre 6,22 e 12,87 $\mu\text{g m}^{-3}$ em uma estação de monitoramento nas proximidades de uma fábrica integrada de semi-acabados de alumínio a partir da bauxita, que opera em Ouro Preto, MG, Brasil, desde 1950. A legislação ambiental brasileira não prevê padrão de qualidade do ar para fluoretos (Assis *et al.*, 2003). Contudo, os limites relevantes de qualidade de ar adotados em muitos países para proteção de espécies sensíveis situam-se entre 0,3 e 0,5 $\mu\text{g m}^{-3}$ de HF (VDI, 1989; EU, 2001; MOE, 2005). No processo industrial, a fabricação do alumínio resulta na formação de resíduos que devem ser dispostos no ambiente após tratamento adequado e seguro. De fato, avanços tecnológicos têm diminuído, virtualmente, emissões desta natureza, mas o flúor ainda é liberado em pequenas quantidades e pode causar danos (Fornasiero, 2003). Segundo Sharma (1985), concentrações baixas de flúor próximas a 0,6 $\mu\text{g m}^{-3}$, por exemplo, podem ser tóxicas.

A vegetação ao redor da fábrica de alumínio em Ouro Preto apresenta sinais claros de contaminação por fluoretos, o que pode ser comprovado pelos elevados teores do poluente observados nas folhas de espécies da flora local (Divan Junior *et al.*, 2008). Apesar de existir um esforço da empresa em diminuir suas emissões industriais, como a elaboração de sistemas de lavagem de gases (NOVELIS, 2007), o conteúdo de flúor encontrado em espécies nativas nas proximidades da fábrica atingiu níveis superiores a 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Divan Junior *et al.*, 2008) que, segundo Treshow & Anderson (1989), ocorrem próximo a fontes emissoras sem nenhum controle de suas emissões.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os efeitos das imissões de flúor de uma usina de alumínio em plantas de *S. dulcis* e o potencial de caracteres macro e microscópicos, identificados em experimentos simulados em laboratório, como biomarcadores de injúria por flúor no campo e identificar os danos ultra-estruturais causados pelo poluente.

Material e métodos

Condições de cultivo - As plantas de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae) foram obtidas a partir de propagação seminífera de um único indivíduo adulto situado a 280 m de altitude e localização determinada pelas coordenadas geográficas de 19°57'04'' de latitude sul e 42°50'27'' de longitude oeste, mapeado mediante utilização do sistema de posicionamento global (modelo GPS II plus, Garmin Ltd., Hampshire, UK), nas adjacências do Viveiro do Parque Estadual do Rio Doce-MG (VPERD).

As sementes foram plantadas em sacos plásticos de 100 mm de diâmetro por 220 mm de comprimento contendo mistura de solo, moinha de carvão e adubo, composição usualmente utilizada no VPERD (Tab. 1). Com dois meses de idade, as mudas foram transferidas para vasos de 2,6 dm³ e aclimatadas durante dois meses, em ambiente não poluído, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) localizada na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As plantas receberam solução nutritiva de Hoagland a 0,25 de força (Hoagland & Arnon, 1950) a cada cinco dias, seguindo metodologia proposta por Silva *et al.* (2000), até atingirem cerca de quatro meses de idade.

Local do experimento - As plantas foram expostas às imissões de poluentes da fábrica de alumínio situada no município de Ouro Preto, MG, Brasil, seguindo metodologia adotada por Divan Junior *et al.* (2007), a 0,78 km da fonte emissora, localizada a 1101 m de altitude, nas coordenadas geográficas de 20°24'09,7'' de latitude sul e 43°31'14,8'' de longitude oeste. A estação referência, a 78 km da fonte emissora, em área livre da poluição, foi instalada na UCP, na cidade de Viçosa, MG, Brasil, a 649 m de altitude e determinada pelas coordenadas geográficas de 20°45'20'' de latitude sul e 42°52'40'' de longitude oeste.

As plantas foram expostas no campo em dois períodos denominados de Experimento um e dois (E1 e E2, respectivamente). No E1, de 03/07/06 a 12/07/06, as coletas foram programadas de três em três dias. Contudo, as plantas começaram a apresentar sintomas antes da primeira coleta. Desta forma, no E2 (24/07/06 a 27/07/06), as coletas foram feitas diariamente. Todas as plantas foram dispostas em estantes, a 1,5 m do solo, conforme recomendado por Divan Junior *et al.* (2007). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições no E1 e três repetições no E2.

Avaliações - Nos dois períodos de exposição das plantas no campo foi realizado o acompanhamento diário do surgimento de sintomas. Para análise da percentagem de área foliar necrosada e quantificação de flúor na matéria seca (MS) foram feitas coletas aos três, seis e nove dias, durante o E1 e diariamente, durante o E2.

Para avaliação da percentagem de área foliar necrosada, todas as folhas de cada um dos indivíduos de *S. dulcis* foram digitalizadas e submetidas à análise de imagens com o auxílio do software Image Pro-Plus, versão 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Para a quantificação do teor do poluente na MS, todas as folhas de cada uma das repetições foram previamente secas em estufa, a 70°C, e reduzidas a partículas com

dimensões inferiores a 1 mm, em moinho do tipo Wiley. Posteriormente, alíquotas de 0,5 g, de cada repetição, foram submetidas à extração em ácido perclórico 0,1 M (Garcia-Ciudad *et al.*, 1985), utilizando-se o ajustador de força iônica (Larsen & Widdowson, 1971), para determinação potenciométrica do teor de fluoreto, através de eletrodo íon seletivo. As análises foram conduzidas em duplicata e repetidas duas vezes.

Para classificação das plantas quanto à susceptibilidade ao flúor levou-se em consideração a área foliar necrosada em relação ao conteúdo de flúor na MS das folhas, adotando-se a seguinte escala proposta por Klumpp *et al.* (1995): muito susceptível (plantas que apresentam sintomas foliares com acúmulo de flúor inferior a 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS) e susceptível (plantas que apresentam sintomas foliares com acúmulo de flúor entre 50 e 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS).

Para as análises microscópicas, as amostras foliares foram coletadas aos três, seis e nove dias, durante o E1, e aos três dias de exposição, durante o E2. Os fragmentos foram retirados da porção mediana de folíolos em expansão de folhas localizadas no terceiro ou quarto nó (a partir da gema apical). Com o intuito de identificar caracteres microscópicos prognósticos de injúria por flúor, todas as amostras foram coletadas de áreas assintomáticas de folíolos com necroses, nas plantas expostas à poluição, e destinadas a caracterização dos danos estruturais e ultra-estruturais, detecção de compostos fenólicos, amido e micromorfologia.

Para análise micromorfológica, amostras foliares foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) em tampão cacodilato de sódio pH 7,2 e acrescido de cloreto de cálcio 5 mM (Karnovsky, 1965). As amostras de folhas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série etílica, e secas ao ponto crítico em equipamento apropriado (modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers). A superfície das folhas foi coberta com ouro, em metalizador (modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers), e documentada em microscópio eletrônico de varredura com câmera digital acoplada (modelo Leo 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra). As análises foram conduzidas em duplicata.

Para microscopia de luz, após fixação na solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e desidratação em série etílica, as amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais, com 8 μm de espessura, foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e corados em azul de Toluidina/pH=4,0 (O'Brien & McCully, 1981) para análise anatômica. Para detecção de amido, os cortes foram submetidos ao lugol (Johansen, 1940). As lâminas permanentes foram montadas em Permout.

Para detecção de compostos fenólicos, adotou-se metodologia proposta por Johansen (1940). Parte das amostras foi fixada em solução de formalina com sulfato ferroso

(formaldeído-4% e sulfato ferroso-10%) durante 24 horas sob vácuo, lavada em água destilada e submetida à desidratação em série etílica/butílica. Após inclusão em parafina histológica, as amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo (10 µm de espessura), desparafinizadas e as lâminas, semipermanentes, montadas em gelatina glicerizada (Kaiser, 1980). Para extração dos compostos fenólicos (controle do teste), parte das amostras foi armazenada em metanol sob vácuo, durante 72 horas e, posteriormente, fixada seguindo o protocolo acima descrito para as amostras submetidas à detecção de fenóis. As imagens foram capturadas utilizando-se um microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo, com câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments inc. New York, USA), no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Para análise ultra-estrutural, após fixação na solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), as amostras foram submetidas a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série etílica crescente e incluídas em Spurr (Spurr, 1969). Os blocos foram preparados para ultramicrotomia num desbastador de blocos (modelo EM Trim, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Cortes transversais, com 70 nm de espessura, foram realizados em ultramicrotomo (modelo UCT, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e documentados em microscópio eletrônico de transmissão modelo Zeiss EM900, em 50 kV, com câmera digital acoplada.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (Euclides, 1983), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Resultados

Os teores do poluente aumentaram continuamente com o tempo de exposição nas plantas expostas na proximidade da fonte emissora, enquanto permaneceram constantes, e abaixo de $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$, na estação de referência, em ambos os períodos de exposição. No E1, aos três dias de exposição (DE), o teor de fluoreto acumulado nas folhas era quase oito vezes maior ($p < 0,01$) do que o observado na estação referência. No E2, o teor do poluente acumulado após o primeiro DE foi aproximadamente seis vezes maior ($p < 0,01$) do que o observado na estação referência, atingindo, aos três DE, 12 vezes mais flúor na MS. Em

relação ao E1, as plantas expostas no E2 acumularam, pelo mesmo período de tempo (três dias), 67% mais fluoreto nas folhas (Figs. 1 e 2).

No E1, as necroses surgiram aos dois DE atingindo, aos três DE, 7,5% da área foliar total necrosada e, ao final da exposição (nove DE), aproximadamente 60% (Fig. 3). No E2, as necroses surgiram mais cedo, logo após um DE, ocupando 4,5% da área foliar total. Aos três DE, 14,5% da área foliar apresentava-se necrosada (Fig. 4). Em relação ao E1, aos três DE, as plantas do E2 apresentavam 93% mais necroses. Os folíolos das plantas expostas em Viçosa possuíam coloração verde brilhante (Fig. 5). Já nas plantas expostas em Ouro Preto, nos dois períodos de exposição, necroses tiveram início a partir da margem, base e ápice dos folíolos (Figs. 6-8). As lesões apresentaram desenvolvimento gradual, se estendendo pela região das nervuras laterais e mediana atingindo, por completo, alguns folíolos. Não foram observadas manchas cloróticas nas folhas. As necroses apresentavam coloração típica: enegrecida, marrom e acinzentada (Figs. 9 e 10).

Ao microscópio eletrônico de varredura observou-se, nos folíolos de *Spondias dulcis* da estação referência, epiderme abaxial desprovida de tricomas e com estômatos (Fig. 11) e, na região da nervura mediana, células epidérmicas alongadas e paredes periclinais externas convexas (Fig. 22). Na epiderme adaxial, a epiderme apresentava os contornos das paredes anticlinais conspícuos e ceras epicuticulares com aspecto pulverulento (Fig. 24).

Nas plantas expostas em Ouro Preto no E1 e E2, os danos na face abaxial foram observados aos três DE estando restritos a esta face e, principalmente, associados aos estômatos. Além de ostíolos obliterados por fragmentos da cutícula (Fig. 12) observou-se, próximo e/ou associado a estas formações epidérmicas, hifas fúngicas (Fig. 13); cristas estomáticas deformadas (Figs. 14-16); concavidades na superfície (Fig. 17); ruptura da epiderme e exposição dos tecidos internos (Figs. 18-20). Contudo, no E2, os danos foram mais pronunciados do que no E1, havendo a ruptura da epiderme aos três DE (Fig. 21), evento observado somente a partir dos seis DE no E1 (Fig. 18). No E1, aos nove DE ocorreu o colapso das células epidérmicas da nervura mediana formando sulcos dispostos paralelamente ao maior eixo da folha (Fig. 23). Na face adaxial, os danos tiveram início somente aos seis DE, sendo caracterizados por ceras epicuticulares com aspecto amorfo e erosão das ceras epicuticulares (Fig. 25), contornos das paredes anticlinais pouco evidentes e presença de hifas fúngicas (Fig. 26) formando emaranhados em algumas porções (Fig. 27).

Ao microscópio de luz observou-se, nas plantas de *S. dulcis* da estação referência, folíolos hipoestomáticos, com epiderme unisseriada e mesofilo formado por uma camada de parênquima paliçádico, quatro a cinco camadas de parênquima lacunoso (Fig. 28), idioblastos cristalíferos contendo drusas (Figs. 28, 30 e 39) e elementos de vaso com espessamento

helicoidal da parede secundária nas nervuras laterais (Fig. 32). A nervura mediana apresenta feixes vasculares colaterais com uma camada de fibras entre o floema e parênquima cortical (Fig. 35). O teste com sulfato ferroso evidenciou a presença de idioblastos com compostos fenólicos somente na nervura mediana (Fig. 37). O teste com lugol evidenciou a presença de amiloplastos tanto na nervura mediana (Fig. 38) quanto na região entre margem e nervura (Fig. 41).

Os danos anatômicos na lâmina foliar das plantas expostas em Ouro Preto foram nítidos aos três DE, tanto no E1 quanto no E2, sendo caracterizados como plasmólise e retração do parênquima paliçádico (Figs. 29 e 31), acúmulo de compostos fenólicos no parênquima lacunoso, nas proximidades das terminações xilemáticas (Figs. 33 e 34), na epiderme e no parênquima medular da nervura mediana (Figs. 36 e 40). Na região da nervura mediana, o acúmulo de grãos de amido foi conspícuo nas células do parênquima medular (Fig. 40). Já na região entre margem e nervura, o acúmulo de grãos de amido foi semelhante ao observado nas plantas de *S. dulcis* da estação referência (Fig. 42).

Ao microscópio eletrônico de transmissão observou-se, nas amostras coletadas na estação referência, organelas com disposição periférica, cloroplastos com grana bem definida contendo grãos de amido de formato lenticular, parede celular lisa, membrana plasmática e tonoplasto pouco elétron-densos, vacúolo com conteúdo hialino (Figs. 43, 48 e 50) e elementos de vaso com espessamento da parede secundária (Fig. 53).

Os danos ultra-estruturais tiveram início aos três DE, tanto no E1 quanto no E2. As paredes celulares adquiriram formato ondulado (Fig. 44) exibindo reentrâncias (Fig. 45) e aspecto fibrilar (Fig. 47). Os cloroplastos apresentaram aspecto senescente (Figs. 44-45); aumento no volume do retículo periférico (Fig. 46); sistema lamelar frouxo (Fig. 51) e grãos de amido mais volumosos (Fig. 52) do que os observados na estação de referência. Houve aumento na elétron-densidade e ruptura das membranas celulares (Fig. 46) observando-se, em algumas células, a formação de fragmentos dispostos concentricamente (Fig. 52). Além do acúmulo de compostos fenólicos no vacúolo de células do parênquima paliçádico (Fig. 47) e lacunoso (Fig. 49) observou-se aumento na quantidade de material granuloso elétron-denso nas proximidades e dentro dos elementos de vaso, havendo um aumento gradual desse material com o aumento do tempo de exposição (Figs. 54-55).

Discussão

Nas regiões tropicais os trabalhos sobre biomonitoramento por flúor utilizando espécies vegetais são escassos. No Brasil, existem algumas iniciativas relatadas por Weinstein

& Hansen (1988), Arndt *et al.* (1995), Klumpp *et al.* (1995; 1996a; 1996b), Domingos *et al.* (2003); Fortes *et al.* (2003), Moraes *et al.* (2003); Furlan *et al.* (2006); Otto *et al.* (2007) e Divan Junior *et al.* (2007; 2008).

Spondias dulcis, quando exposta em Ouro Preto, apresentou acúmulo rápido de fluoreto nas folhas, conforme observado em plantas de *Chloris gayana* e *Panicum maximum* expostas na mesma área (Divan Junior *et al.*, 2007). Acréscimos elevados do poluente nas folhas em curtos períodos de exposição sugerem que as plantas ficaram expostas a elevados índices de fluoreto na atmosfera (Fornasiero, 2003).

Geralmente, o teor de fluoreto nas plantas é determinado pela sua concentração na atmosfera, tempo de exposição e capacidade de absorção da espécie (Vike, 1999). Na região de Ouro Preto, estudos com espécies herbáceas indicaram que o acúmulo de fluoreto independe da estação do ano (Divan Junior *et al.*, 2008). Nos dois experimentos realizados no inverno com *S. dulcis*, o conteúdo de fluoreto aumentou com o tempo de exposição das plantas em Ouro Preto e permaneceu constante na estação referência, ratificando a poluição por flúor nas proximidades da fonte emissora. No entanto, observou-se acúmulo maior do poluente no Experimento 2, em relação ao Experimento 1, indicando que a variação no acúmulo do poluente esteja correlacionada com uma variação episódica de emissão de flúor na atmosfera, evento comum nas adjacências de fontes emissoras (Divan Junior *et al.*, 2008).

A maior percentagem de sintomas observada três dias após a exposição das plantas em Ouro Preto no Experimento 2, em comparação com o Experimento 1, está correlacionada com a maior concentração de poluente observada na matéria seca. Em *S. dulcis*, as necroses ocupavam 29% da área de folhas com teores de flúor inferiores a $8 \mu\text{g g}^{-1}$, demonstrando uma maior sensibilidade desta espécie quando comparada com *P. maximum* (Divan Junior *et al.*, 2007) e justificando a classificação da espécie como “muito susceptível” segundo escala de Klumpp *et al.* (1995). Quando se acumula nos tecidos e atinge concentrações letais, o flúor causa lesões nas folhas (Coulter *et al.*, 1985), sendo que a susceptibilidade varia com a espécie (Weinstein & Davison, 2003; Mezghani *et al.*, 2005; Divan Junior *et al.*, 2008). Folhas de *Prunus harmonica* exibem necroses com $65 \mu\text{g g}^{-1}$ de flúor na matéria seca enquanto *Olea europaea* pode acumular até $300 \mu\text{g g}^{-1}$ de flúor na matéria seca de suas folhas sem exibir qualquer sintoma de fitotoxicidade ao poluente (Mezghani *et al.*, 2005). Variações entre a quantidade acumulada e a tolerância ao elemento ocorrem entre espécies (Mezghani *et al.*, 2005; Oliva & Figueiredo, 2005; Divan Junior *et al.*, 2008) e até mesmo entre cultivares (Fortes *et al.*, 2003; Oliva & Figueiredo, 2005).

No campo, a sintomatologia vem sendo utilizada para monitorar os efeitos do estresse causado por diversos fatores bióticos e abióticos (Vollenweider & Günthardt-Goerg, 2006)

como o flúor (Fornasiero, 2003; Mezghani *et al.*, 2005). Apesar de haver descrições detalhadas dos danos causados pelo poluente como as áreas vermelhas visíveis em ambas as faces das folhas e “queima” do ápice foliar em *Hypericum perforatum* (Fornasiero, 2003), os sintomas geralmente são descritos como cloroses e necroses marginais e apicais, tanto em laboratório (Silva *et al.*, 2000; Fornasiero, 2001; Chaves *et al.*, 2002) quanto no campo (Mezghani *et al.*, 2005; Divan Junior *et al.*, 2007; 2008). A carência de detalhes na descrição dos sintomas limita a utilização deste parâmetro numa diagnose mais precisa, em campo, da origem do estresse. A sintomatologia observada no presente experimento foi similar ao registrado em laboratório (Silva *et al.*, 2000; Sant’Anna-Santos & Azevedo, 2007) o que assegura determinar, em biomonitoramento, que a causa do estresse em *S. dulcis* seja consequência de quantidades anormais de flúor nas folhas.

De um modo similar à maioria dos poluentes atmosféricos, o flúor gasoso penetra nas plantas através dos estômatos (Peixoto *et al.*, 2005), formação epidérmica associada à maior parte dos danos presentes nas plantas de *S. dulcis* expostas em Ouro Preto. O surgimento inicial de danos a partir da face abaxial está relacionado ao fato dos estômatos serem restritos a esta superfície da folha nesta espécie (Silva *et al.*, 2000).

Os danos observados na face adaxial da folha das plantas expostas em Ouro Preto se devem, provavelmente, ao efeito potencializador do orvalho, freqüentemente observado durante o período de condução dos experimentos (inverno), que dissolve o poluente oriundo de deposição seca favorecendo a remoção da camada de ceras epicuticulares e a desestruturação da cutícula. A remoção destas camadas hidrofóbicas provavelmente facilitou o estabelecimento dos fungos observados em ambas as faces das folhas expostas às imissões da fábrica, já que superfícies que apresentam um filme de água favorecem a colonização por microorganismos (Barthlott, 1981). A remoção das ceras epicuticulares e a infestação por hifas fúngicas já foi relatado em laboratório (Sant’Anna-Santos & Azevedo, 2007), não tendo sido detectada a presença destes microorganismos nas plantas do tratamento controle. Isto também foi observado nas plantas expostas em Ouro Preto, o que comprova que a poluição é a responsável pela remoção das ceras epicuticulares favorecendo a infestação por fungos.

Provavelmente, a perda de turgidez das células epidérmicas nas plantas expostas em Ouro Preto foi a causa da modificação do contorno das paredes anticlinais, em ambas as faces da folha. A plasmólise das células epidérmicas foi mais acentuada na face abaxial da folha, onde os estômatos formam uma via preferencial de entrada para o poluente, e na região da nervura mediana. Apesar de ser praticamente desprovida de estômatos, a curvatura proeminente formada pela nervura mediana no relevo da folha pode predispor esta região a um maior tempo de contato com o poluente dissolvido pelo orvalho. Em plantas de *Magnolia*

ovata expostas à chuva simulada com flúor, as células epidérmicas sofrem redução gradual no volume, mais acentuada nas proximidades da necrose (Sant'Anna-Santos *et al.*, 2007).

Conteúdos escuros intensamente corados de verde pelo azul de toluidina foram observados na nervura mediana e nas proximidades das terminações xilemáticas nas folhas das plantas de *S. dulcis* expostas em Ouro Preto. Em geral, compostos fenólicos são corados de verde pelo azul de toluidina Briggs *et al.* (2005). Outros autores, como Silva *et al.* (2000) e Chaves *et al.* (2002), já haviam levantado a hipótese de acúmulo de fenóis em plantas expostas ao flúor, contudo, não efetuaram testes específicos para confirmar a suspeita de acúmulo destes compostos. O acúmulo de fenóis tem sido interpretado como um mecanismo de defesa das plantas, ativado por fatores bióticos e abióticos que induzem ao estresse (Vaughn & Duke, 1984).

As alterações ultra-estruturais observadas nas folhas de *S. dulcis* expostas em Ouro Preto são similares às descritas em trabalhos conduzidos em condições de laboratório (Azevedo, 1995; Hara, 2000; Fornasiero, 2001), o que confirma a confiabilidade da análise ultra-estrutural na detecção de níveis fitotóxicos do poluente.

O acúmulo de material elétron-denso no interior dos elementos de vaso, provavelmente reflete o transporte de flúor pelo xilema, conforme relatado por Fornasiero (2001) em *Hypericum perforatum*. Adicionalmente, as observações macroscópicas sugerem que a necrose avance por meio dos tecidos vasculares de forma mais pronunciada na nervura mediana, reforçando a hipótese de que o flúor atue no sistema vascular.

As alterações na ultra-estrutura da membrana plasmática observadas em *S. dulcis* foram semelhantes às constatadas no mesofilo de plantas de *Hypericum perforatum*, onde a membrana plasmática destaca-se da parede celular e, por vezes, rompe-se (Fornasiero, 2001). Os resultados obtidos por Rakowski *et al.* (1995) em plantas de *Pinus strobus* indicam que a membrana plasmática pode ser um dos sítios iniciais da injúria por flúor. Divan Junior *et al.* (2007) observaram um efeito significativo do flúor na integridade das membranas utilizando o aumento na liberação de eletrólitos celulares, como parâmetro, em plantas com grande acúmulo do poluente. O flúor modifica as interações lipo-proteicas das membranas alterando a função metabólica (Rakowski, 1997), como a atividade da enzima H⁺-ATPase (Façanha & de Meis, 1995), causando o aumento na permeabilidade da membrana.

Dentre as organelas, o cloroplasto foi a que exibiu maior variedade de alterações ultra-estruturais, nas plantas expostas em Ouro Preto. Na literatura, os sintomas atribuídos ao flúor normalmente são: inchaço do estroma, dilatação e enrolamento dos tilacóides; sistema lamelar pouco distinto; aumento do número e tamanho dos plastoglóbulos; acúmulo de grãos de amido; e, em alguns casos, aumento no número, tamanho e elétron-densidade dos

plastoglôbulos; ruptura do envoltório externo e alteração na forma dos cloroplastos (Wei & Miller, 1972; Thomson, 1975; Soikkeli & Tuovinen, 1979; Soikkeli, 1981; Zwiazek & Shay, 1987; Eleftheriou & Tsekos, 1991; Anttonen, 1992; Holopainen *et al.*, 1992; Miller, 1993; Azevedo, 1995; Wulff & Kärenlampi, 1996; Hara, 2000; Fornasiero, 2001).

Em *Spondias dulcis*, houve aumento expressivo no volume dos grãos de amido dos cloroplastos. A ocorrência de células com quantidades anormais de amido já foi relatada para *S. dulcis*, sob estresse ocasionado por chuva ácida simulada (Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006a; 2006b) e está relacionada ao efeito inibitório dos poluentes sobre a translocação de carboidratos das folhas para as raízes, causando o acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos (Rennenberg *et al.*, 1996). O acúmulo de grãos de amido também foi evidenciado no mesofilo de folhas de *Pinus halepensis* expostas a poluição urbana (Soda *et al.*, 2000). Estes autores sugeriram que o acúmulo de amido seja consequência do colapso e inativação dos elementos do floema. É possível que este fenômeno seja indicativo de aceleração no processo de envelhecimento celular sob influência de poluentes (Schmitt & Ruetze, 1990).

A elevada sensibilidade, especificidade dos sintomas, alta correlação entre sintomatologia e teores de flúor confirmam pela primeira vez, em experimentos de biomonitoramento ativo, o potencial de *Spondias dulcis* como bioindicadora de reação. O estudo microscópico das regiões aparentemente saudáveis das folhas coletadas em Ouro Preto assemelha-se ao observado em folhas assintomáticas (Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007) e sintomáticas (Silva *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2002) de plantas expostas ao flúor em laboratório, o que demonstra que todos os eventos descritos antecedem o surgimento de sintomas macroscópicos além de garantir o valor prognóstico de injúria por fluoreto destes parâmetros assegurando sua utilização como biomarcadores.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa ao primeiro autor, ao Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), pelo suporte físico, ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, da Universidade de São Paulo (USP), pelos suportes físico e técnico.

Referências bibliográficas

- Anttonen, S. 1992. Changes in lipids of *Pinus sylvestris* needles exposed to industrial air pollution. **Annales Botanici Fennici** 29: 89-99.
- Assis, C.M.; Silveira, I.L. & Anizelli, R.C.M. 2003. **Automonitoramento da qualidade do ar em Ouro Preto/MG**. In: Congresso Interamericano de Qualidade do Ar, 3., Canoas. Anais Porto Alegre, AIDIS, ABES, 2003. 1 CD-ROM.
- Azevedo, A.A. 1995. **Ação do flúor, em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de *Glycine max* (L.) Merrill**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 95p.
- Barthlott, W. 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic Journal of Botany** 1: 345-355.
- Briggs, C.L.; Morris, E.C. & Ashford, A.E. 2005. Investigations into seed dormancy in *Grevillea linearifolia*, *G. buxifolia* and *G. Sericea*: Anatomy and histochemistry of the seed coat. **Annals of Botany** 96: 965-980.
- Chaves, A.L.F.; Silva, E.A.M.; Azevedo, A.A.; Cano, M.A.O. & 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 Botanica Brasilica** 16: 395-406.
- Coulter, C.T.; Pack, M.R. & Sulzbach, C.W. 1985. An evaluation of the dose-response relationship of fluoride injury to *Gladiolus*. **Atmospheric Environment** 19: 1001-1007.
- Divan Junior, A.M.; Oliva, M.A.; Martinez, C.A. & Cambraia, J. 2007. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colonião. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67: 247-253.
- Divan Junior, A.M.; Oliva, M.A. & Ferreira, F.A. 2008. Dispersal pattern of airborne emissions from an aluminium smelter in Ouro Preto, Brazil, as expressed by foliar fluoride accumulation in eight plant species, **Ecological Indicators** 8: 454-461.

- Domingos, M.; Klumpp, A.; Rinaldi, M.C.S.; Modesto, I.; Klumpp, G. & Delitti, W.B.C. 2003. Combined effects of air and soil pollution by fluoride emissions on *Tibouchina pulchra* Cogn., at Cubatão, SE Brazil, and their relations with aluminum. **Plant and Soil** **249**: 297-308.
- Eleftheriou, E.P. & Tsekos, I. 1991. Fluoride effects on leaf cell ultrastructure of olive trees growing in the vicinity of Aluminium Factory of Greece. **Trees** **5**: 83-98.
- EU, 2001. **European Union Risk Assessment Report: Hydrogen Fluoride**, CAS-No.: 7664-39-3. 1st Priority List, vol. 8, 134pp.
- Euclides, R.F. 1983. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG) – Manual**. CPD/UFV, Divisão de Pesquisas e Desenvolvimento. Viçosa, Minas Gerais. 74p.
- Façanha, A.R. & de Meis, L. 1995. Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. **Plant Physiology** **108**: 241-246.
- Fornasiero, R.B. 2001. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science** **161**: 979-985.
- Fornasiero, R.B. 2003. Fluorides 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 de cerâmica, Araras (SP). **Bragantia** **62**: 275-281.
- Franzaring, J.; Klumpp, A. & Fangmeier, A. 2007. Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardised grass cultures. **Atmospheric Environment** **41**: 4828-4840.
- Furlan, C.M.; Santos, D.Y.A.C.; Salatino, A. & Domingos, M. 2006. n-Alkane distribution of leaves of *Psidium guajava* exposed to industrial air pollutants **Environmental and Experimental Botany** **58**: 100-105.

- Garcia-Ciudad, A.; Garcia-Criado, B. & Pontón-San Emeterio, C. 1985. Determination of fluoride in plant samples by a potentiometric method and near-infrared reflectance spectroscopy. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 16: 1107-1122.
- Günthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P. 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. **Environmental Pollution** 147: 467-488.
- Hara, S. 2000. **Alterações estruturais em folhas de *Panicum maximum* Jacq. submetidas à chuva simulada com flúor**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 48p.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil**. (California Agricultural Experiment Station: Berkeley, CA).
- Holopainen, T.H.; Anttonen, S.; Wulff, A.; Palomäki, V. & Kärenlampi, L. 1992. Comparative evaluation of effects of gaseous pollutants, acid deposition and mineral deficiencies: Structural changes in cells of forest plants. **Agriculture, Ecosystems & Environment** 42: 341-398.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. Mc GrawHill, New York, 523pp.
- Kaiser, E. 1980. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen glycerin-gelatine. **Botanisch Zentralb** 180: 25-26.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137-138.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. & Fomin, A. 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). **Revista Brasileira de Botânica** 24: 511-518.
- Klumpp, A.; Domingos, M. & Klumpp, G. 1996a. Assessment of the vegetation risk by fluoride emissions from fertiliser industries at Cubatão, Brazil. **The Science of the Total Environment** 192: 219-228.

- Klumpp, A.; Klumpp, G.; Domingos, M. & Silva, M.D. 1996b. Fluoride impact on native tree species of the atlantic forest near Cubatão, Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution** **87**: 57-71.
- Klumpp, G.; Klumpp, A.; Domingos, M. & Guderian, R. 1995. *Hemerocallis* as bioindicator of fluoride pollution in tropical countries. **Environmental Monitoring and Assessment** **35**: 27-42.
- Larsen, S., Widdowson, A.E. 1971. Soil fluorine. **Journal of Soil Science** **22**: 210-221.
- Mezghani, I.; Elloumi, N.; Abdallah, F.B.; Chaieb, M. & Boukhris, M. 2005. Fluoride accumulation by vegetation in the vicinity of a phosphate fertilizer plant in Tunisia. **Fluoride** **38**: 69-75.
- Miller, G.W. 1993. The effect of fluoride on higher plants. **Fluoride** **26**: 3-22.
- MOE, 2005. **Ontario Air Standards For Hydrogen Fluoride**. Standards Development Branch Ontario Ministry of the Environment, 112pp.
- Moraes, R.M.; Delitti, W.B.C. & Moraes, J.A.P.V. 2003. Gas exchange, growth, and chemical parameters in a native Atlantic forest tree species in polluted areas of Cubatão, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **54**: 339-345.
- NOVELIS, 2007. **A empresa: Ouro Preto**.
<http://www.novelis.com.br/NovelisInstitucional/NovelisBrasil/Ouro+Preto.htm> (02/2007).
- O'Brien, P.P. & McCully, M.E. 1981. **The study of plants structure principles and selected methods**. Melbourne-Australia: Termarcarphi Pty. Ltda, 45p.
- Oliva, M.A. & Figueiredo, J.G. 2005. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica** **28**: 389-397.
- Otto, R.; Faria, M.R.M.; Queiroz, F.E.C.; Moura, T.A.; Vitti, G.C. & Cantarella, H. 2007. Rendimento da cana-de-açúcar é afetado por flúor. **Bragantia** **66**: 505-509.

- Peixoto, P.H.P.; Pimenta, D.S. & Antunes, F. 2005. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **40**: 727-734.
- Rakowski, K.J. 1997. Hydrogen fluoride effects on plasma membrane composition and ATPase activity in needles of white pine (*Pinus strobus*) seedlings pretreated with 12 h photoperiod. **Tree - Structure and Function** **11**: 248-253.
- Rakowski, K.J.; Zwiazek, J.J. & Sumner, M.J. 1995. Hydrogen fluoride effects on plasma membrane composition, ATPase activity and cell structure in needles of eastern white pine (*Pinus strobus*) seedlings. **Tree - Structure and Function** **9**: 190-194.
- Reig-Arminañ, J.; Calatayud, V.; Cerveró, J.; García-Breijo, F.J.; Ibars, A. & Sanz, M.J. 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). **Environmental Pollution** **132**: 321-331.
- Rennenberg, H.; Herschbach, C. & Polle, A. 1996. Consequences of air pollution on shoot-root interactions. **Journal of Plant Physiology** **148**: 296-301.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. **Journal of Cell Biology** **17**: 208.
- Sant'Anna-Santos, B.F. & Azevedo, A.A. 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências** **5**: 48-50.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Duque-Brasil, R.; Azevedo, A.A.; Silveira, A.S.; Araújo, J.M. & Aguiar, R. 2007. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore** **31**: 761-771.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A. & Aguiar, R. 2006a. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** **49**: 313-321.

- Sant'Anna-Santos, B.F.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M.; Alves, E.F.; Silva, E.A.M. & Aguiar, R. 2006b. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany** **58**: 158-168.
- Schmitt, U. & Ruetze, M. 1990. Structural changes in spruce and fir needles. **Environmental Pollution** **8**: 187-190.
- Sharma, H. C. 1985. Effect of hydrogen fluoride fumigation in *Triticum aestivum*, *Brassica juncea* and *Phaseolus aureus* plants. **Fluoride** **18**: 15-22.
- 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** **23**: 385-393.
- Soda, C.; Bussotti, F.; Grossoni, P.; Barnes, J.; Mori, B. & Tani, C. 2000. Impacts of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. **Environmental and Experimental Botany** **44**: 69-82.
- Soikkeli, S. 1981. Comparison of cytological injuries in conifer needles from several polluted industrial environments in Finland. **Annales Botanici Fennici** **18**: 47-61.
- Soikkeli, S. & Tuovinen, T. 1979. Damage in mesophyll ultrastructure of needles of Norway spruce in two industrial environments in central Finland. **Annales Botanici Fennici** **16**: 50-64.
- Souza, F.X.; Sousa, F.H.L. & Melo, F.I.O. 1998. Aspectos morfológicos de endocarpos de cajarana (*Spondias cytherea* sonn. - Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Sementes** **20**: 141-146.
- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructural Research** **26**: 31-43.
- Strehl, T. & Arndt, U. 1989. Alterações apresentadas por *Tillandsia aeranthos* e *T. recurvata* (Bromeliaceae) expostas ao HF e SO₂. **Iheringia** **39**: 3-17.

- Thomson, W.W. 1975. Effects of air pollutants on plant ultrastructure. In: Mudd, J.B. & Kozlowski, T.T. (Eds.). **Responses of plants to air pollution**. Academic, New York, 179-194.
- Treshow, M. & Anderson, F.K. 1989. **Plant Stress from Air Pollution**. John Wiley, Chichester, 283pp.
- Vaughn, K. & Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum** 60: 106-112.
- VDI, 1989. **VDI 2310 Part 3: Maximum immission values to protect vegetation**. Maximum Immission values for Hydrogen Fluoride. VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 1, 48pp.
- Vike, E. 1999. Air-pollutant dispersal patterns and vegetation damage in the vicinity of three aluminium smelters in Norway. **Science of the Total Environment** 236: 75-90.
- Vollenweider, P. & Günthardt-Goerg, M.S. 2006. Erratum to “Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage” [Environ. Pollut. 137 (2005) 455-465]. **Environmental Pollution** 140: 562-571.
- Vollenweider, P.; Ottiger, M. & Günthardt-Goerg, M.S. 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. **Environmental Pollution** 124: 101-118.
- Wei, L. & Miller, G.W. 1972. Effect of HF on the fine structure of mesophyll cells from *Glycine max* Merr. **Fluoride** 5: 67-73.
- Weinstein, L.H. & Davison, A.W. 2003. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution** 125: 3-11.
- Weinstein, L.H. & Hansen, K.S. 1988. Relative susceptibilities of Brazilian vegetation to airborne fluoride. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 23: 1125-1137.

- Wulff, A. & Kärenlampi, L. 1996. Effects of long-term open-air exposure to fluoride, nitrogen compounds and SO₂ on visible symptoms, pollutant accumulation and ultrastructure of Scots pine and Norway spruce seedlings. **Trees** **10**: 157-171.
- Zwiazek, J.J. & Shay, J.M. 1987. Fluoride- and drought-induced structural alterations of mesophyll and guard cells in cotyledons of jack pine (*Pinus banksiana*). **Canadian Journal of Botany** **65**: 2310-2317.

Tabela 1. Resultado da análise química do solo utilizado como substrato nos vasos para cultivo das plantas de *Spondias dulcis* Forst. F. SB (Soma de bases trocáveis); CTC (t) (Capacidade de troca catiônica efetiva); CTC (T) (Capacidade de troca catiônica a pH=7,0); V (Índice de saturação de bases); m (Índice de saturação de alumínio); ISNa (Índice de saturação de sódio); MO (Matéria orgânica = C.Org $\times$ 1,724 – Walkley-Black); P-rem (Fósforo remanescente).

pH	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)
H ₂ O	mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³						
7,25	19,1	1727	-	6,16	1,12	0,0	1,0	11,7	11,7	12,7

V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
	%		dag kg ⁻¹	mg L ⁻¹			mg dm ⁻³			
92,1	0	-	3,68	23,3	-	21,6	54,1	0,48	6,84	262,6

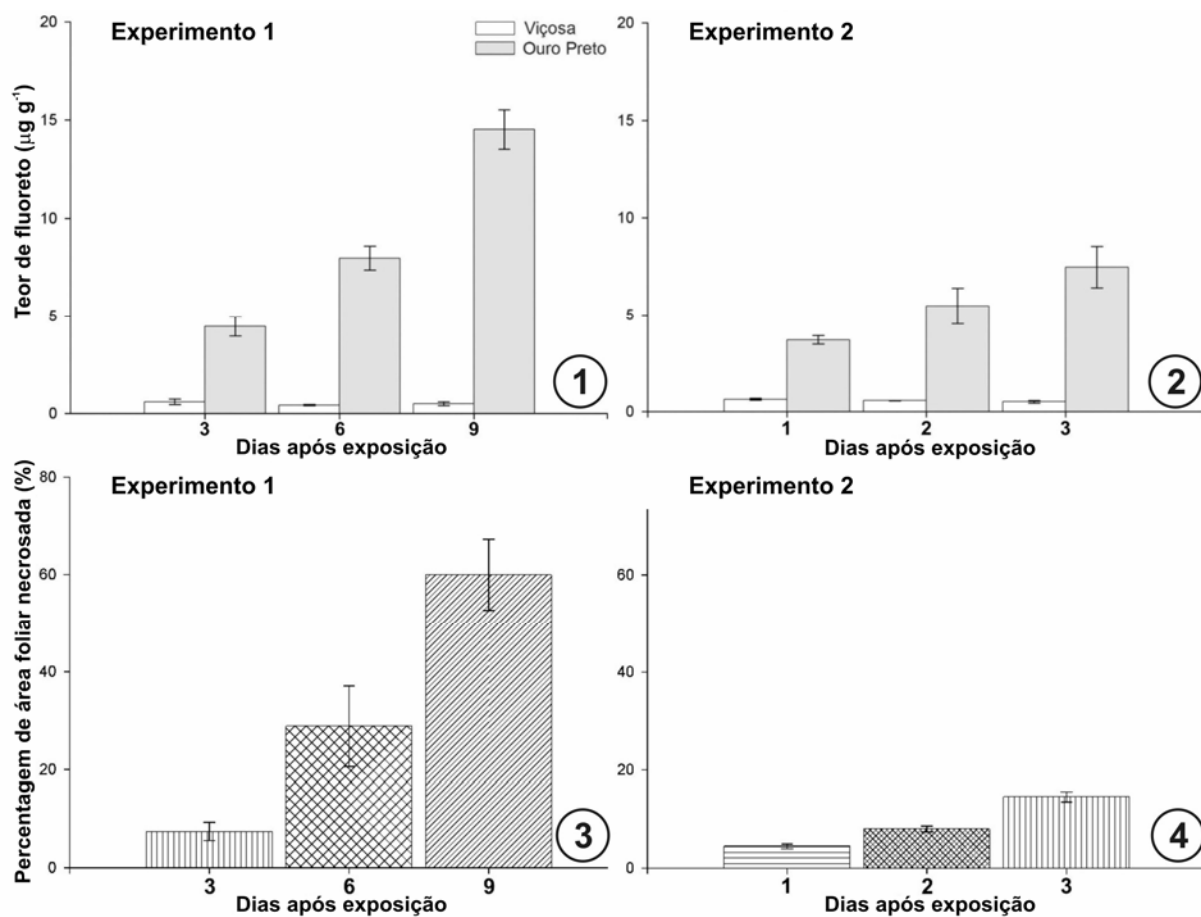


Figura 1-4. Teor de fluoreto (1-2) e percentagem de área foliar necrosada (3-4) em folhas de *S. dulcis* em função do tempo de exposição nas adjacências da fonte emissora de flúor (Ouro Preto) e na estação referência (Viçosa). 1 e 3. Experimento 1. 2 e 4. Experimento 2. As barras verticais indicam o desvio padrão.

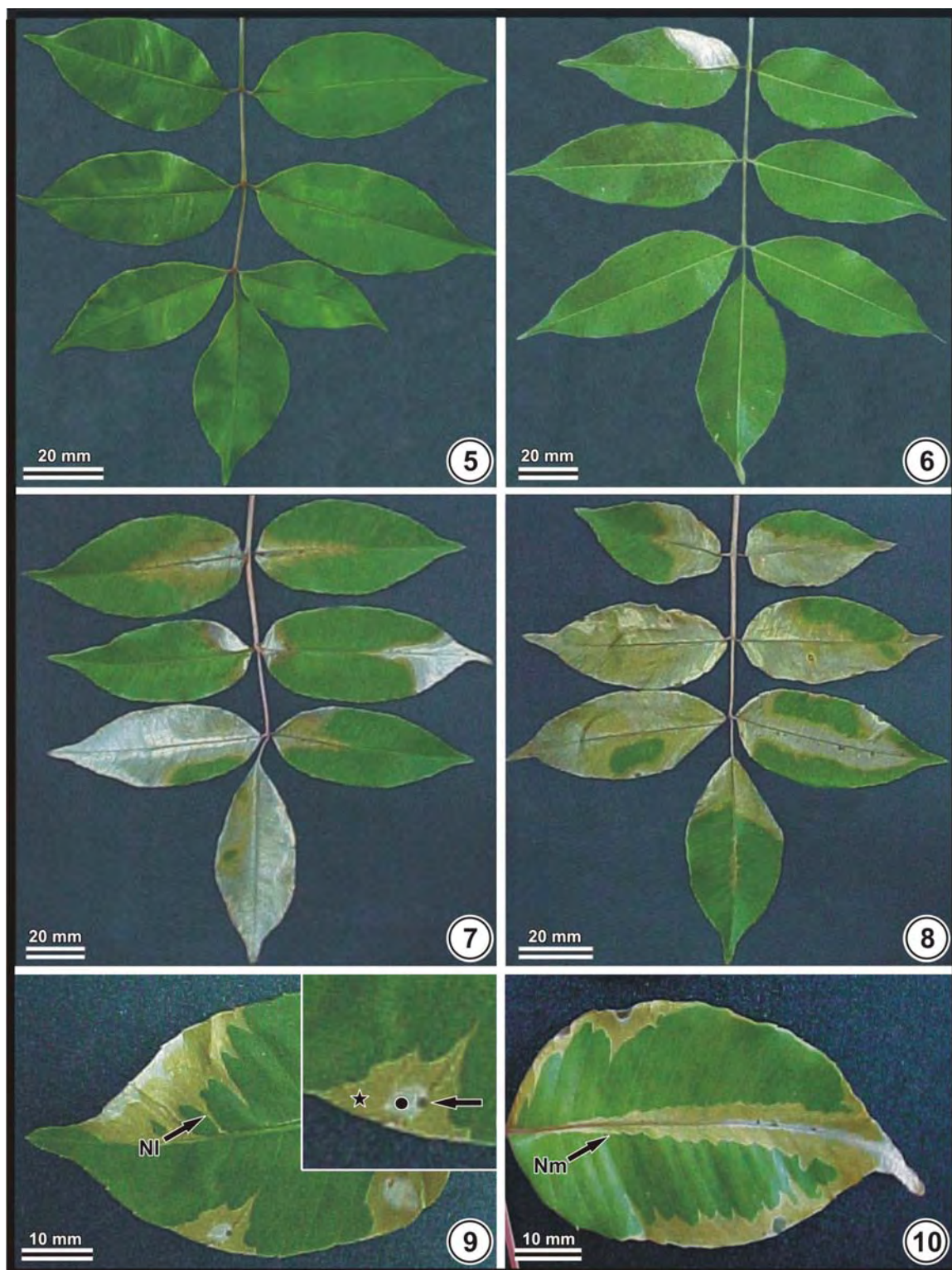


Figura 5-10. Folhas de *S. dulcis* na estação referência (5) e aos três (6), seis (7) e nove (8-10) dias de exposição a imissões de fábrica de alumínio (Experimento 1). 5. Coloração verde brilhante. 6. Surgimento das necroses. 7. Necroses ocorrendo em todos os folíolos. 8. Grande percentagem da área foliar necrosada. 9. Necrose progredindo pela nervura lateral e constituída por três zonas de coloração distintas: enegrecida (seta), acinzentada (círculo) e marrom (estrela). 10. Necrose avançando pela nervura mediana. Abreviaturas: NI (nervura lateral); Nm (nervura mediana).

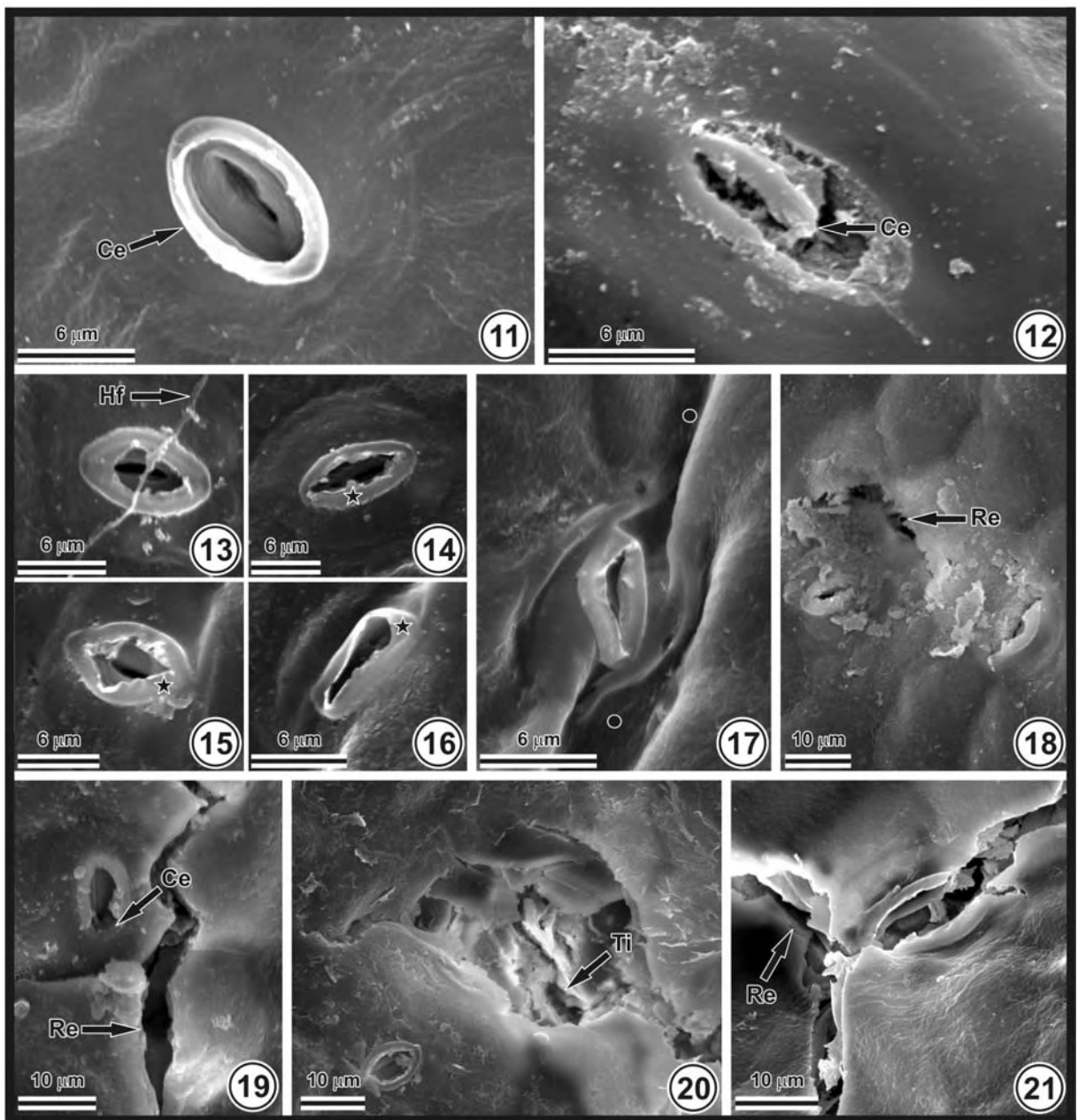


Figura 11-21. Superfície abaxial de folíolos de plantas de *S. dulcis* (micrografias eletrônicas de varredura) não expostas à poluição (11) e aos três (12 e 21), seis (13-18) e nove (19-20) dias de exposição a imissões de fábrica de alumínio nos experimentos 1 (11-20) e 2 (21). 11. Crista estomática. 12. Ostíolo obliterado por fragmento da cutícula. 13. Hifa fúngica. 14-16. Cristas estomáticas deformadas (estrelas). 17. Concavidades na superfície epidérmica (círculos). 18. Ruptura da parede periclinal externa. 19. Ruptura da crista estomática e da parede periclinal externa. 20. Exposição dos tecidos internos. 21. Ruptura da parede na adjacência de um estômato. Abreviaturas: Ce (crista estomática); Re (ruptura da epiderme); Hf (hifa fúngica); Ti (tecido interno).

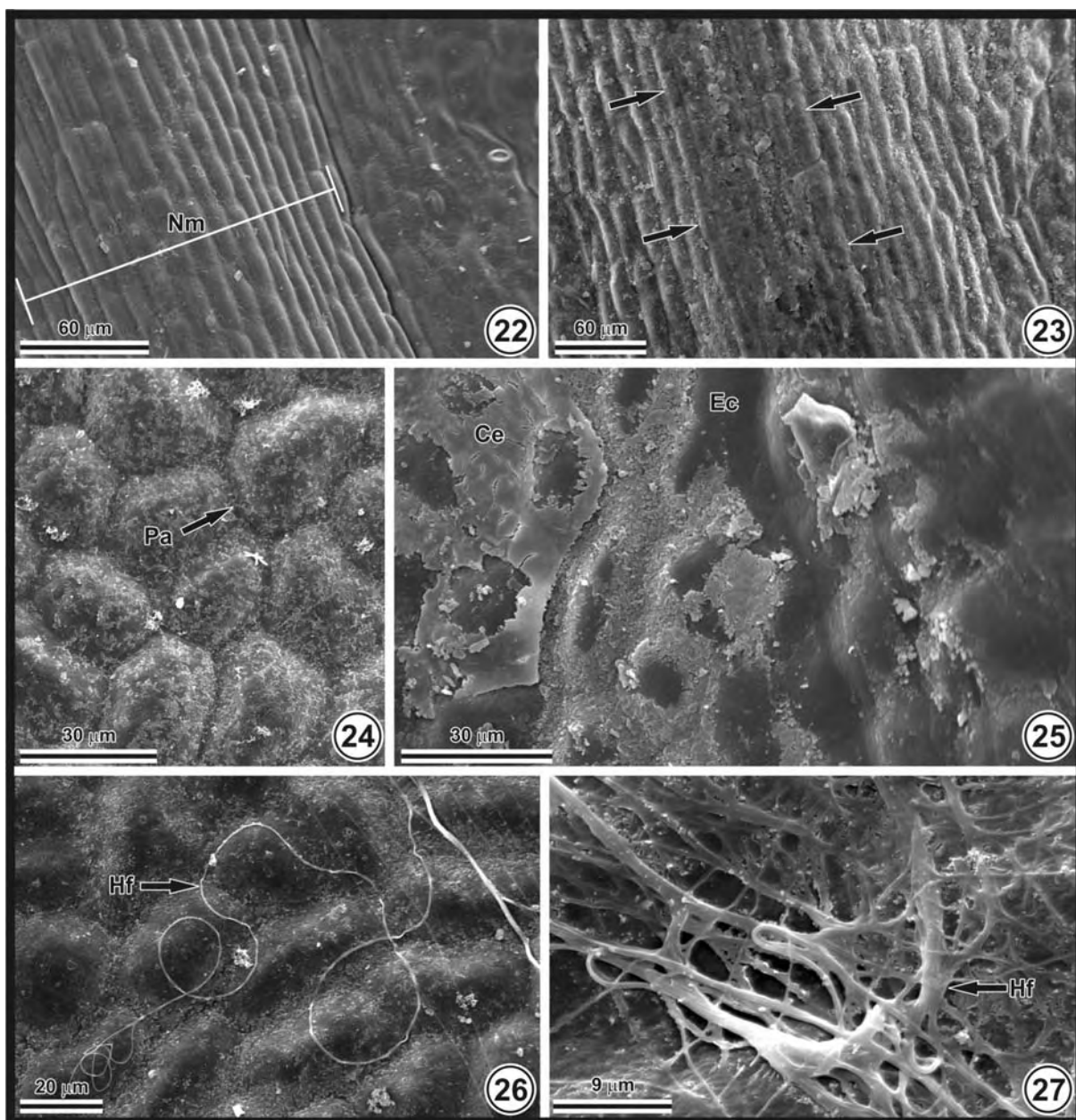


Figura 22-27. Superfície abaxial (22-23) e adaxial (24-27) de folíolos de plantas de *S. dulcis* (micrografias eletrônicas de varredura) não expostas à poluição (22 e 24) e aos seis (25-26) e nove (23 e 27) dias de exposição a imissões de fábrica de alumínio (Experimento 1). 22. Nervura mediana. 23. Sulcos (setas) na nervura mediana. 24. Paredes anticlinais bem delimitadas e ceras epicuticulares uniformemente distribuídas. 25. Erosão das ceras epicuticulares e aspecto amorfo. 26. Paredes anticlinais com contornos pouco evidentes e hifas fúngicas. 27. Emaranhado de hifas fúngicas. Abreviaturas: Nm (nervura mediana); Pa (parede anticlinal); Ce (cera epicuticular); Erosão das ceras (Ec); Hf (hifa fúngica).

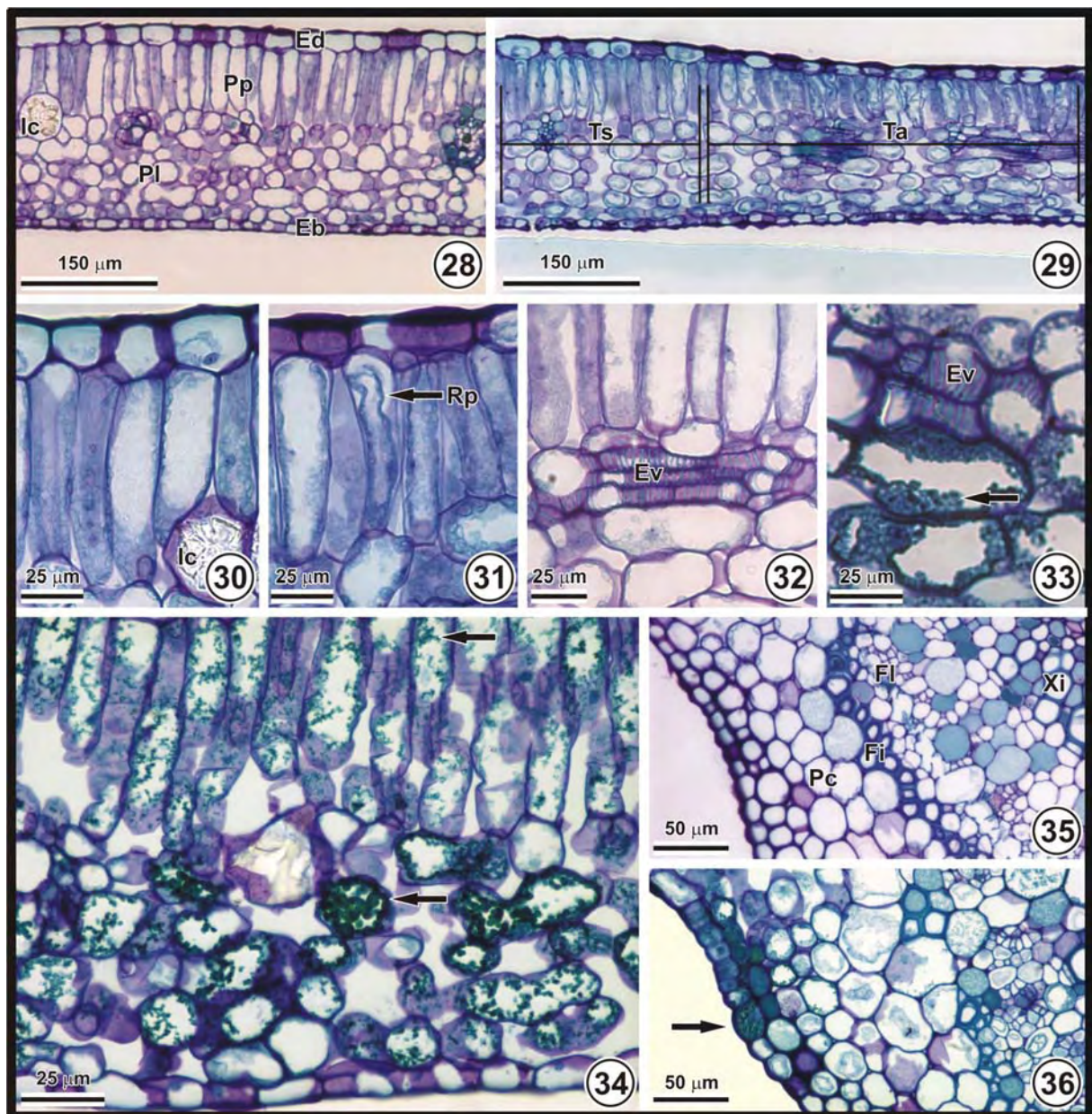


Figura 28-36. Estrutura foliar de *S. dulcis*, em seção transversal (microscopia de luz), na estação referência (28, 30, 32 e 36) e aos três (29 e 31), seis (33) e nove (34 e 36) dias de exposição a imissões de fábrica de alumínio (Experimento 1). 28. Lâmina foliar. 29. Plasmólise do parênquima paliçádico. 30. Idioblasto com cristal do tipo drusa. 31. Retração do protoplasto. 32. Elemento de vaso. 33. Acúmulo de compostos fenólicos (seta) nas proximidades da terminação xilemática. 34. Acúmulo de compostos fenólicos (seta) mais acentuado no parênquima lacunoso. 35. Nervura mediana. 36. Acúmulo de compostos fenólicos (seta) na epiderme. Abreviaturas: Ed (epiderme da face adaxial); Eb (epiderme da face abaxial); Ic (idioblasto cristalífero); Pp (parênquima paliçádico); Pl (parênquima lacunoso); Ts (tecido sadio); Ta (tecido afetado); Rp (retração do protoplasto); Ev (elemento de vaso); Pc (parênquima cortical); Fi (fibras); Fl (floema); Xi (xilema).

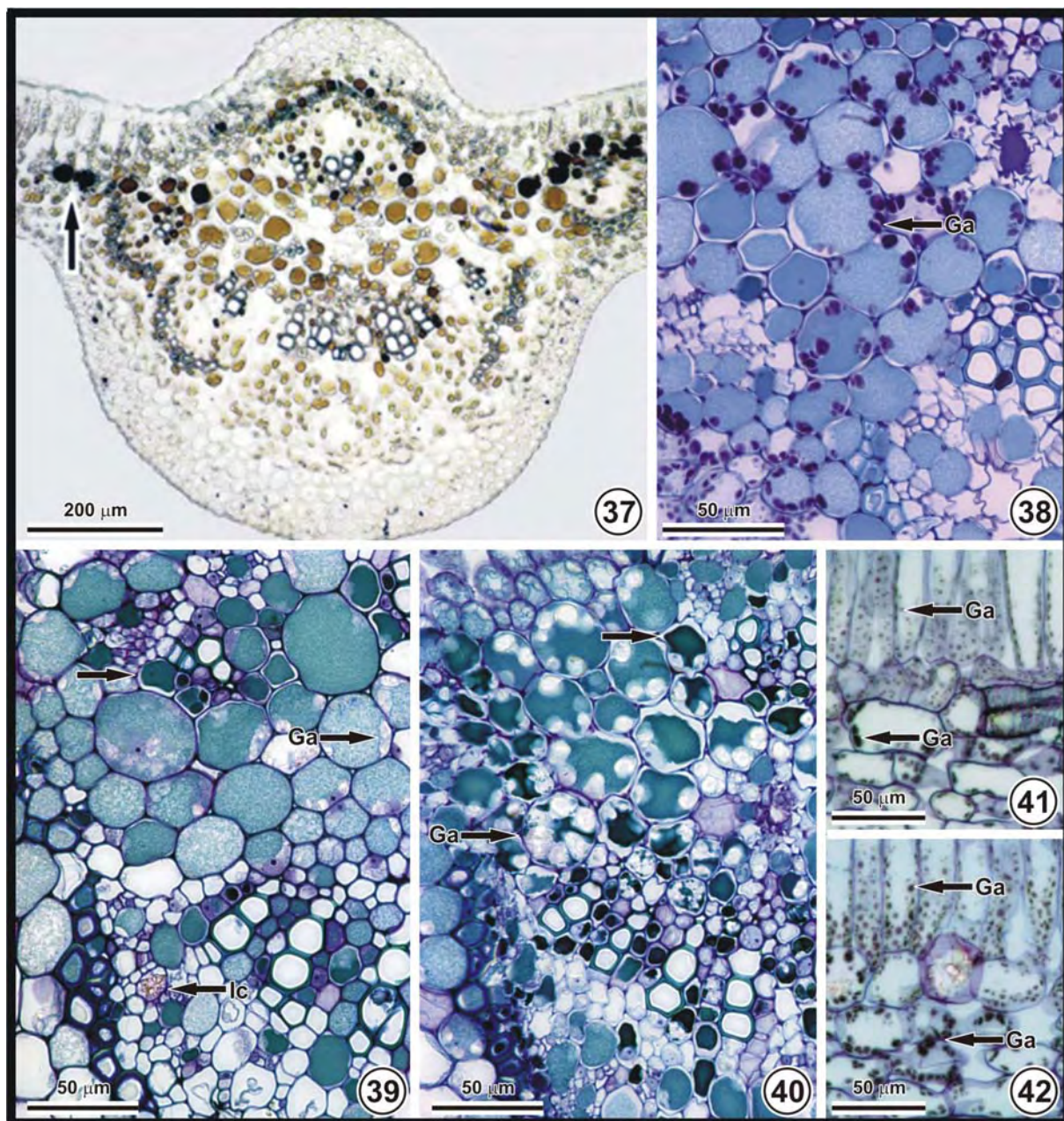


Figura 37-42. Estrutura foliar de *S. dulcis*, em secção transversal (microscopia de luz), na estação referência (37, 38, 39 e 41) e aos nove (40 e 42) dias de exposição a imissões de fábrica de alumínio (Experimento 1). 37. Nervura mediana: reação positiva ao sulfato ferroso evidenciando compostos fenólicos nos idioblastos (seta). 38. Reação positiva ao lugol: grãos de amido. 39. Grãos de amido periféricos e compostos fenólicos no parênquima (seta). 40. Acúmulo conspicuo de grãos de amido e de compostos fenólicos (seta). 41. Região intermediária. 42. Acúmulo incipiente de amido. Abreviaturas: Ga (grão de amido); Ic (idioblasto cristalífero).

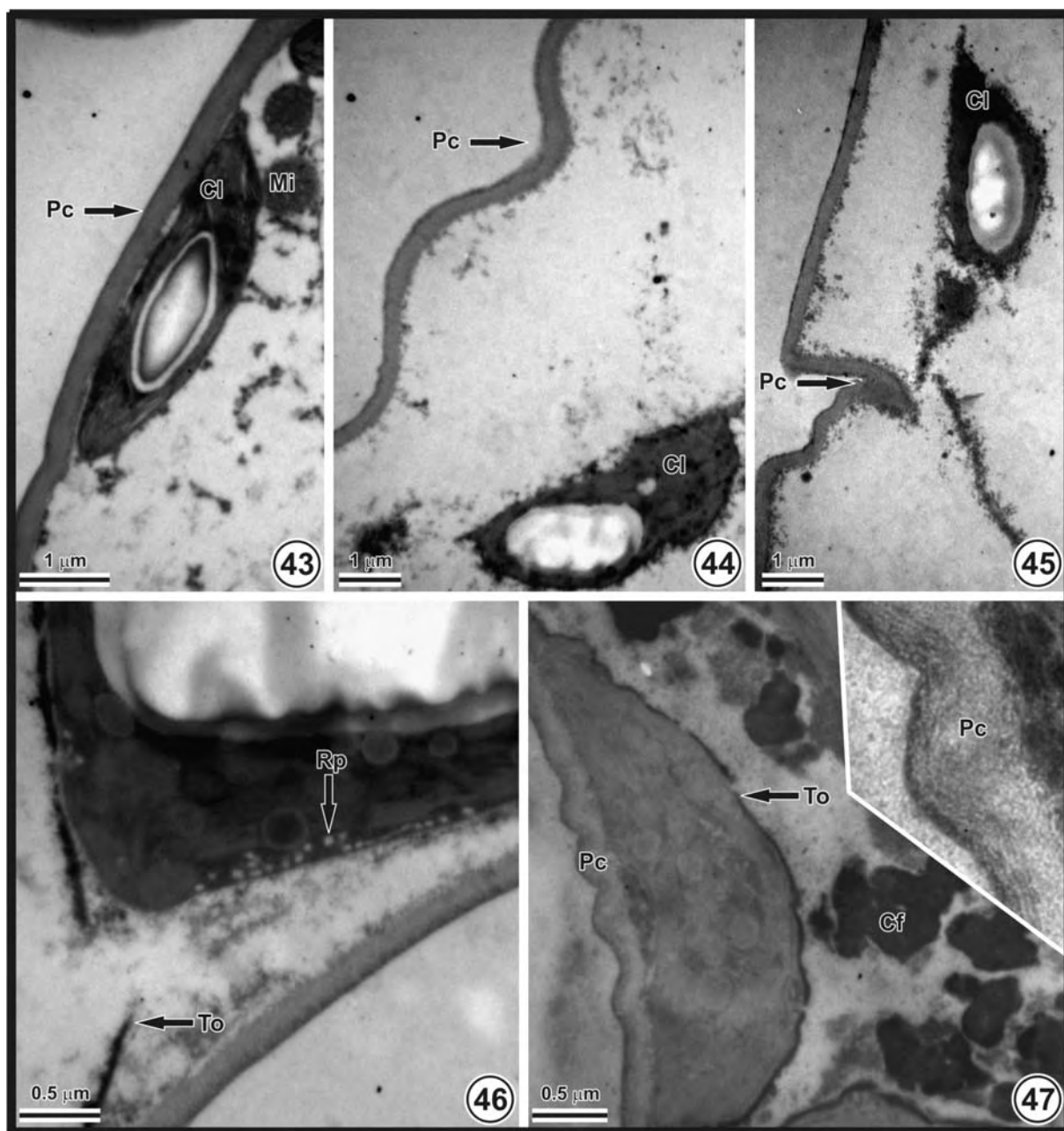


Figura 43-47. Parênquima paliçádico de *S. dulcis*, em secção transversal (microscopia eletrônica de transmissão), na estação referência (43) e aos três (44), seis (45 e 46) e nove (47) dias de exposição a imissões de fábrica de alumínio (Experimento 1). 43. Parede celular lisa. 44. Parede celular ondulada e cloroplastos com aspecto senescente. 45. Parede celular com reentrâncias e cloroplasto senescente. 46. Aumento no volume do retículo periférico e aumento na elétron-densidade e ruptura do tonoplasto. 47. Parede celular com aspecto fibrilar e acúmulo de compostos fenólicos no vacúolo. Abreviaturas: Cl (cloroplasto); Pc (parede celular); Mi (mitocôndria); To (tonoplasto); Rp (retículo periférico); Cf (composto fenólico).

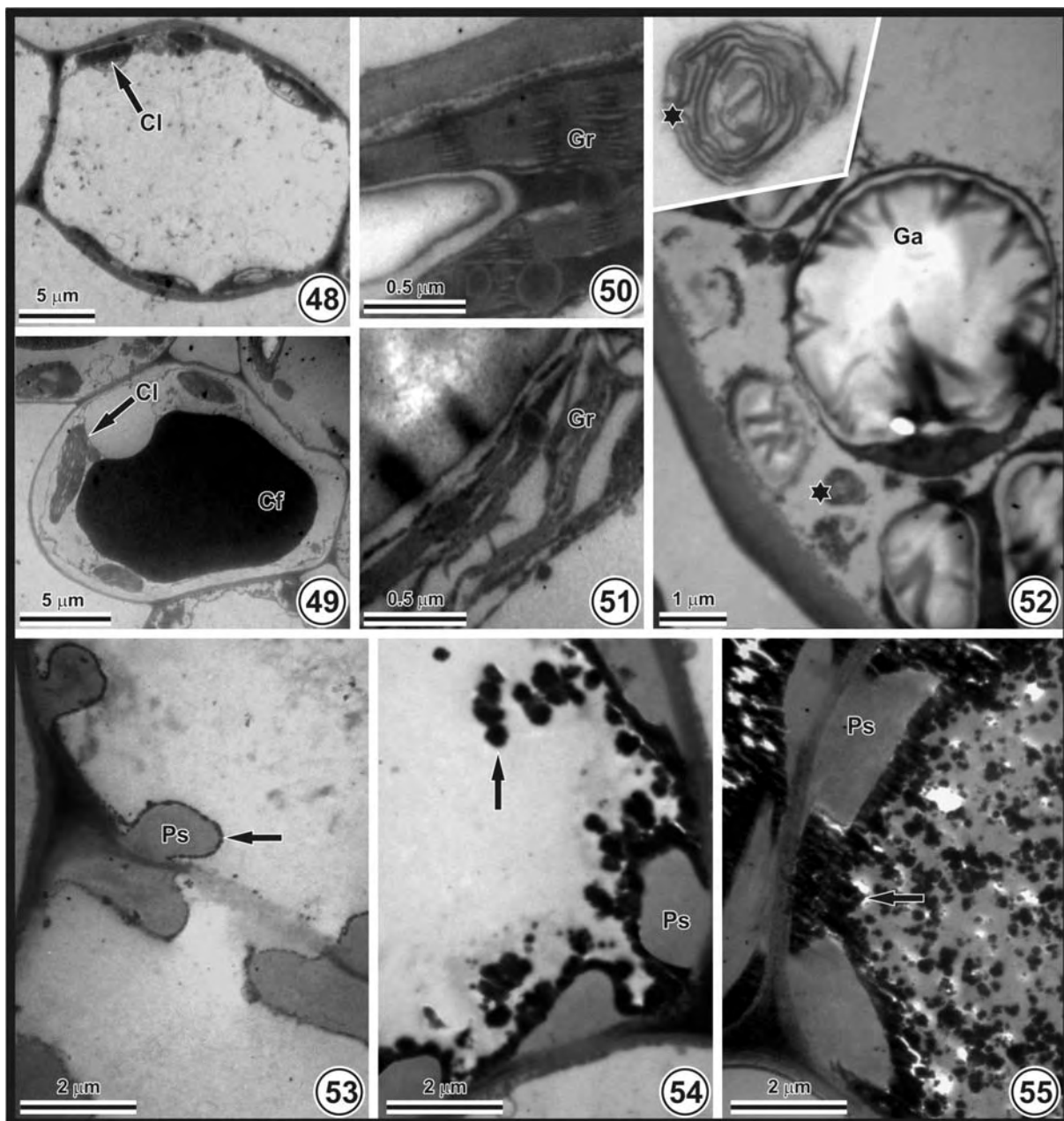


Figura 48-55. Parênquima lacunoso (48-52) e elementos de vaso (53-55) de *S. dulcis*, em secção transversal (microscopia eletrônica de transmissão), na estação referência (48, 50 e 53) e aos três (52 e 54) e nove (49, 51 e 55) dias de exposição a imissões de fábrica de alumínio (Experimento 1). 48. Vacúolo com conteúdo hialino. 49. Vacúolo repleto de compostos fenólicos. 50. Cloroplastos com grana bem definida. 51. Cloroplasto com sistema lamelar frouxo. 52. Grãos de amido volumosos e fragmentos de membranas celulares dispostos concentricamente (estrela) no detalhe. 53. Elementos de vaso com espessamento helicoidal da parede secundária. 54-55. Aumento na quantidade de material granuloso elétron-denso (seta) nas proximidades e dentro dos elementos de vaso. Abreviaturas: Cl (cloroplasto); Cf (composto fenólico); Gr (grana); Ga (grão de amido); Ps (parede secundária).

CAPÍTULO 3

Análise morfoanatômica e fisiológica da indução de injúrias por flúor em *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae)

RESUMO – Para correlacionar os efeitos morfoanatômicos e os fisiológicos do flúor, em baixas concentrações, em *Spondias dulcis*, plantas foram submetidas a nevoeiros simulados com 5 mg L⁻¹ do poluente. No controle utilizou-se somente água deionizada. A presença de sintomas nas plantas expostas ao flúor, 19 dias após o início das simulações, determinou a coleta de folíolos com sintoma (FCS) e sem sintoma (FSS), para quantificação de flúor e de pigmentos fotossintéticos e estudos microscópicos e fisiológicos, mediante técnicas usuais. Cloroses não foram observadas. As necroses apresentavam coloração amarronzada, entretanto não foi detectado o acúmulo de compostos fenólicos. Na porção basal dos FSS foram observadas alterações estruturais; as necroses surgiram nesta mesma região nos FCS, comprovando que os danos microscópicos antecedem a injúria visual. Nos FSS, houve redução na concentração de pigmentos fotossintéticos. Na epiderme, a parede celular foi o componente celular mais alterado e os danos causados pelo flúor estavam principalmente associados aos estômatos, porém, a concentração interna de CO₂ não variou, demonstrando que a redução na fotossíntese esteja, provavelmente, associada a um componente metabólico. A interpretação conjunta dos danos fisiológicos e microscópicos permitem inferir que a redução na fotossíntese dos FSS não ocorre devido a mecanismos de difusão de carbono e nem a danos na fase luminosa da fotossíntese, mas sim a alterações na estrutura dos cloroplastos e que o acúmulo de amido deve ser reflexo da inativação de células do floema, responsável pela translocação de fotoassimilados para as raízes.

Palavras-chave: *Spondias dulcis*, necrose, ultra-estrutura, fotossíntese.

Morphoanatomical and physiological studies of fluoride-induced injury in *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae)

ABSTRACT –In order to correlate the morphophysiological effects of low concentrations of fluoride in *Spondias dulcis*, plants were subjected to simulated fog containing 5 mg L⁻¹ of the pollutant. Control treatment contained only deionized water. Nineteen days after simulations started, the presence of symptoms in plants exposed to fluoride determined the collection of leaflets with symptoms (LWS) and with no symptoms (LWNS) for quantification of fluoride and photosynthetic pigments, and microscopic and physiological studies by usual techniques. No chlorosis was found in the samples. Necroses showed a brownish color, but without accumulation of phenolic compounds. The basal portion of LWNS, where the symptoms appeared in LWS, was more susceptible than the apical and middle portions, confirming that the microscopic damages precede visual injury symptoms. There was reduction in the concentration of photosynthetic pigments of LWNS. The cell wall was the most changed cell component in the epidermis and the damages caused by the fluoride were mainly associated with the stomata, however, the internal CO₂ concentration did not vary, showing that photosynthesis reduction is probably associated with a metabolic component. The joined interpretation of physiological and microscopic damages led to the conclusion that the reduction in photosynthesis of LWNS did not occur due to carbon diffusion mechanisms nor to damages to the luminous phase of photosynthesis, but due to changes in chloroplast structure, and that the starch accumulation must be caused by the inactivation of phloem cells that are responsible for the translocation of photoassimilates to roots.

Key-words: *Spondias dulcis*, necrosis, ultra-structure, photosynthesis.

Introdução

O flúor, dentre os poluentes comumente encontrados na atmosfera, é um dos mais fitotóxicos (Weinstein, 1977; Darrall, 1989). Muitos autores têm relatado os danos causados pelo poluente sobre a vegetação tropical (Weinstein & Hansen, 1988; Arndt *et al.*, 1995; Klumpp *et al.*, 1995; 1996a; 1996b; Domingos *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2003; Furlan *et al.*, 2007). No Brasil, fábricas de alumínio, fertilizantes e cerâmica têm sido responsabilizadas pela emissão de quantidades suficientes de flúor para causar injúrias em espécies sensíveis introduzidas (Divan Junior *et al.*, 2007) e da flora local (Divan Junior *et al.*, 2008) e por reduzir a produtividade de espécies economicamente importantes, como o milho (Fortes *et al.*, 2003) e a cana-de-açúcar (Otto *et al.*, 2007).

Apesar de ser extremamente fitotóxico, diferenças expressivas na susceptibilidade ao elemento existem entre espécies de diferentes famílias botânicas, da mesma família, do mesmo gênero e entre cultivares da mesma espécie (Weinstein, 1977; Weinstein & Hansen, 1988; Arndt *et al.*, 1995; Oliva & Figueiredo, 2005; Otto *et al.*, 2007). No entanto, além dos fatores genéticos, as condições edafoclimáticas também influenciam na susceptibilidade das espécies (Weinstein & Davison, 2003), tornando fundamentais os estudos com espécies tropicais sensíveis (Oliva & Figueiredo, 2005) como *Spondias dulcis*, que se destaca por apresentar sintomas com coloração típica em resposta ao poluente (Capítulo 1).

As cloroses costumam ser o primeiro sintoma foliar em resposta ao flúor, sendo o aumento na concentração do elemento e a duração da exposição os principais responsáveis pelo surgimento de necroses marginais e apicais (Arndt *et al.*, 1995; Fornasiero, 2001; Divan Junior *et al.*, 2007). Contudo, cloroses não foram observadas em *S. dulcis* quando exposta a elevadas concentrações do poluente em experimentos de curta duração (Silva *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007). Como elevadas concentrações de flúor podem levar ao surgimento e evolução muito rápidos das necroses (Arndt *et al.*, 1995), reforça-se a necessidade de estudos de maior duração e com concentrações mais baixas do elemento a fim de melhor caracterizar a sintomatologia e fitotoxidade do flúor nesta espécie.

Análises microscópicas têm sido utilizadas em conjunto com a sintomatologia tanto para assegurar o diagnóstico correto quanto para esclarecer os mecanismos de fitotoxidade (Günthardt-Goerg *et al.*, 2000; Soda *et al.*, 2000; Fornasiero, 2001; 2003; Vollenweider *et al.*, 2003; Furlan *et al.*, 2006; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). Porém, em algumas espécies, alterações na estrutura foliar antecedem o surgimento dos sintomas conferindo valor prognóstico à análise microscópica (Soda *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2007; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007). Adicionalmente, sabe-se que em concentrações abaixo

daquela capaz de promover sintomas, o flúor também promove alterações fisiológicas conforme observado em *Triticum aestivum* (MacLean & Schneider, 1981), *Pinus bunksiana* (Zwiazek & Shay, 1988) e *Spinacea oleracea* (Boese *et al.*, 1995). Dentre os danos fisiológicos causados pelo poluente destacam-se a redução da taxa fotossintética, da fluorescência da clorofila *a* e do teor dos pigmentos fotossintéticos (Wallis *et al.*, 1974; Parry *et al.*, 1984; Pushnik & Miller, 1990; Ballantyne, 1991; Murray, 1984; Fornasiero, 2003; Oliva & Figueiredo, 2005; Peixoto *et al.*, 2005; Divan Junior *et al.*, 2007). O flúor possui a capacidade de inibir a atividade de enzimas fotossintéticas como a ATPase do cloroplasto, a RUBP carboxilase/oxigenase e a sacarose sintase, afetando os mais importantes processos metabólicos como a fotossíntese, respiração e o metabolismo de carboidratos (Quick *et al.*, 1989; Giannini *et al.*, 1985; Parry *et al.*, 1984; Miller, 1993; Boese *et al.*, 1995; Oliva & Figueiredo, 2005; Divan Junior *et al.*, 2007). Contudo, estudos que correlacionam eventos microscópicos e fisiológicos com a sintomatologia são escassos (Vollenweider & Günthardt-Goerg, 2006) e, quando existentes, limitados a poucos parâmetros.

Diante do exposto objetivou-se: verificar, a partir da indução de injúrias utilizando baixa concentração do poluente por tempo prolongado de exposição, definida em experimentos anteriores (Capítulo 1), se a sintomatologia observada é a mesma que sob altas concentrações do poluente em tempo mais curto de exposição (Silva *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007); caracterizar as alterações fisiológicas causados pelo flúor, em níveis insuficientes para ocasionar sintomas; e correlacionar os resultados com os danos morfoanatômicas e dados obtidos em experimentos anteriores.

Material e métodos

Espécie e condições de cultivo - Foram utilizadas mudas de *Spondias dulcis* Forst. F (Anacardiaceae), espécie tropical sensível ao flúor (Silva *et al.*, 2000), fornecidas pelo Viveiro do Parque Estadual do Rio Doce-MG (VPERD). As mudas foram obtidas a partir de propagação seminífera de um único indivíduo adulto localizado a 280 m de altitude e nas coordenadas geográficas de 19°57'04'' de latitude sul e 42°50'27'' de latitude oeste, mapeado mediante utilização do sistema de posicionamento global (modelo GPS II plus, Garmin Ltd., Hampshire, UK), nas adjacências do VPERD.

A semeadura foi realizada em sacos plásticos de 10 cm de diâmetro por 22 cm de comprimento, contendo mistura de solo, moinha de carvão e adubo, composição usualmente utilizada no VPERD (Tab. 1). Após dois meses, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa,

localizada a 649 m de altitude, 20°45'20" de latitude sul e 42°52'40" de longitude oeste, para aclimação por dois meses. Após o transplante para vasos de 2,6 dm³, as plantas receberam solução nutritiva de Hoagland a 0,25 de força (Hoagland & Arnon, 1950) a cada 5 dias.

Tratamentos - As simulações de nevoeiro foram conduzidas na Sala de Estudos em Poluição da UCP, de 7 a 25 de maio de 2007. As médias de temperatura máxima, média, mínima e umidade relativa durante o período foram: 25,6, 18,8, 12,6°C e 80,8%, respectivamente.

O experimento de simulação foi adaptado a partir da metodologia proposta por Silva *et al.* (2000). As plantas de *S. dulcis* foram expostas a nevoeiros por períodos de 20 minutos diários totalizando 5,22 mm dia⁻¹ de precipitação em uma câmara de simulação, com sistema de "spray". O tratamento com flúor (pH=6,0) foi preparado adicionando-se fluoreto de potássio em água deionizada, na concentração de 5 mg L⁻¹ de flúor. Esta concentração foi definida, a partir de experimentos anteriores (Capítulo 1), com o objetivo de induzir injúrias de forma tênue, por um período mais prolongado de tempo. No tratamento controle, utilizou-se somente água deionizada (pH=6,0). Antes e depois da exposição, as plantas ficaram expostas sob um painel luminoso composto por oito lâmpadas incandescentes de mercúrio (E-27, 220-230 V, 250 W) por 15 min sob densidade de fluxo radiante de 95 W m⁻². No restante do tempo, as plantas foram mantidas em condições ambientais.

Todos os parâmetros foram avaliados após o décimo oitavo nevoeiro, quando todas as plantas do tratamento com flúor apresentavam, ao menos, uma folha necrosada. Os folíolos situados entre o 3º e o 4º nó (a partir da gema apical) foram selecionados para as coletas devido à predominância de sintomas nesta região, nas plantas expostas ao poluente, além de serem, segundo resultados de outros experimentos (Capítulo 1), metabolicamente mais ativos e mais sensíveis ao flúor.

Trocas gasosas - Após o período de exposição, as trocas gasosas foram avaliadas em folíolos do tratamento controle e folíolos sem sintoma do tratamento com flúor (FSS) (n=4). Nos folíolos com sintomas (FCS), as trocas gasosas não foram mensuradas para não provocar a queda dos folíolos, necessários para as posteriores medições de fluorescência da clorofila *a* e detecção histoquímica de compostos fenólicos.

Foram mensuradas as taxas de assimilação líquida de carbono (*A*, µmol CO₂ m⁻² s⁻¹), a condutância estomática (*g_s*, mol H₂O m⁻² s⁻¹) e a transpiração (*E*, mmol m⁻² s⁻¹), obtidas por meio de um sistema de medição de trocas gasosas portátil LI-6400 (LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA) equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6400-02B, LI-COR). As mensurações foram feitas sob concentração de CO₂, temperatura e vapor de H₂O do

ambiente do local de estudo, sendo o ar de referência coletado a 150 cm de altura do solo e homogeneizado em um galão de 20 L antes de alcançar a câmara foliar. Foram realizados dez registros por folha, um a cada 12 segundos, cuja média foi considerada uma medida, após o coeficiente que combina as variações de gás carbônico (ΔCO_2), água ($\Delta\text{H}_2\text{O}$) e fluxo de ar (Δu_e) apresentar-se abaixo de 1%. Simultaneamente, foram obtidas medidas da densidade de fluxo de fótons (DFF, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), da temperatura (T, °C) e umidade relativa (UR, %) do ar e da diferença de pressão de vapor de água entre a folha e o ar (VPD kPa), mediante sensores quânticos e termopares acoplados ao referido equipamento.

Conteúdo de pigmentos fotossintéticos - Para determinação de pigmentos foram coletadas amostras dos mesmos folíolos utilizados para medição de trocas gasosas (n=4). Os dados dos teores de clorofila e carotenóides foram obtidos segundo o método proposto por Hiscox & Israelstam (1979). Discos foliares de área conhecida ($0,3927 \text{ cm}^2 \text{ disco}^{-1}$) foram retirados e imediatamente imersos em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), em tubos vedados e envoltos em papel alumínio. Os tubos foram mantidos no escuro, em banho-maria, a 65°C por um período de aproximadamente 48 horas. Após a extração, a absorbância das amostras foi determinada a 480, 649 e 670 nm em espectrofotômetro de duplo feixe modelo Hitachi U-2000 (Hitachi Instruments Inc., Danbury, CT). O cálculo dos teores de clorofila e carotenóides, expressos em mg dm^{-2} , foi realizado de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994) para extratos em DMSO.

Fluorescência de imagem - Os efeitos fotoinibitórios, ocasionados pelo flúor, foram mensurados no tratamento controle e nos FSS e FCS (n=4), por meio de imagens de fluorescência, obtidas com fluorômetro de imagem modelo IMAGING-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), equipado com uma pinça especial para suporte da folha modelo IMAG-USH (Universal Sample Holder). Nos FCS, os valores foram obtidos em diferentes regiões: perto (Pne), adjacente (Ane) e na necrose (Nne). Para uma máxima resolução espacial (640×480 pixels), as medidas foram realizadas com uma distância mínima entre a câmara (CCD) e a folha, o que corresponde uma imagem com área de 17 x 22 mm. Após período de adaptação ao escuro, as imagens de fluorescência mínima (F_0) obtidas pela aplicação de pulsos de luz de baixa intensidade (1 Hz), e de fluorescência máxima, obtida por um pulso saturante de luz azul (470 nm) de alta intensidade (10 Hz), foram determinadas e utilizadas para o cálculo do rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m).

Em seguida, os folíolos foram iluminados com luz actínica ($204 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e pulsos de luz saturante aplicados a intervalos de 20 s durante 5 min para determinação dos

rendimentos de fluorescência (Fs) e fluorescência máxima (Fm') em amostras adaptadas a luz. O rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/Fm'$) foi calculado de acordo com Genty *et al.* (1989) como $(Fm' - Fs)/Fm'$. O coeficiente de extinção fotoquímica (qP) foi calculado como $[(Fm' - Fs)/(Fm' - Fo')]$, onde Fo' foi estimado de acordo como $[Fo/(Fv/Fm + Fo/Fm')]$.

O coeficiente devido à extinção não-fotoquímica do excesso de energia absorvida (NPQ) foi calculado a cada pulso de saturação como $[(Fm - Fm')/Fm']$ (Bilger & Björkman, 1990). Em todos os casos, as imagens e os valores dos parâmetros de fluorescência foram avaliados com o auxílio de uma escala de cores variando de 0.000 (preto) a 1.000 (rosa), a partir do software Imagingwin versão 2.0.

Análises microscópicas - Os mesmos folíolos avaliados no fluorômetro de imagem foram coletados para estudo anatômico. Os fragmentos foram fixados em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão cacodilato de sódio pH 7,2 e acrescido de cloreto de cálcio 5 mM (Karnovsky, 1965).

Para análise micromorfométrica (n=4) foram coletadas amostras do tratamento controle e, do tratamento com flúor (somente de FSS) com o intuito de verificar se o aumento no tempo de exposição a 5 mg L^{-1} de flúor altera os parâmetros quantitativos. Os fragmentos foram retirados das porções basal, mediana e apical dos folíolos, visando determinar se existe diferença de susceptibilidade ao poluente entre as diferentes porções da lâmina foliar já que, a partir de experimentos anteriores, verificou-se que os sintomas têm início principalmente a partir da porção basal (Capítulo 1). Após fixação, as amostras foram submetidas à desidratação em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais, com 8 μm de espessura, foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e corados em azul de Toluidina/pH=4,0 (O'Brien & McCully, 1981). As lâminas permanentes foram montadas em Permunt. As imagens foram capturadas utilizando-se um microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo, com câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments inc. New York, USA), no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV. Foram mensuradas a espessura do limbo, do parênquima paliçádico e do lacunoso e a altura das células epidérmicas das faces adaxial e abaxial, na porção da lâmina foliar entre a margem e a nervura mediana. Foram realizadas 27 medidas/repetição/parâmetro, totalizando 135 registros por repetição, utilizando-se o software Image Pro-Plus, versão 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Com o intuito de confirmar se a coloração amarronzada das necroses era resultado do acúmulo de compostos fenólicos, conforme proposto por Chaves *et al.* (2002) em folhas de gramíneas tropicais expostas ao poluente, adotou-se metodologia proposta por Johansen (1940) para detecção de compostos fenólicos. Foram utilizadas amostras Nne da região basal de FCS e do tratamento controle fragmentos foram retirados da mesma região (n=3). Parte das amostras foi fixada em solução de formalina com sulfato ferroso (formaldeído-4% e sulfato ferroso-10%) durante 24 horas sob vácuo, lavada em água destilada e submetida à desidratação em série etílica/butílica. Após inclusão em parafina histológica, as amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo (10 µm de espessura), desparafinizadas e as lâminas, semipermanentes, montadas em gelatina glicerizada (Kaiser, 1980). Para extração dos compostos fenólicos (controle do teste), parte das amostras foi armazenada em metanol sob vácuo, durante 72 horas e, posteriormente, fixada seguindo o protocolo acima descrito para as amostras submetidas à detecção de fenóis. As imagens foram capturadas utilizando-se um microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo, com câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments inc. New York, USA), no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Para análise micromorfológica (n=3), foram coletados fragmentos de folíolos do tratamento controle, de FSS e de FCS, adjacente à necrose (Ane). Foi amostrada a porção basal dos folíolos, incluindo a nervura mediana, onde os danos em *S. dulcis* têm início (Capítulo 1). Após fixação, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série etílica, e secas ao ponto crítico em equipamento apropriado (modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers). A superfície dos folíolos foi coberta com ouro em metalizador (modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers) e documentada em microscópio eletrônico de varredura com câmera digital acoplada (Leo 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Para análise ultra-estrutural (n=3), os fragmentos também foram retirados da porção basal de folíolos do tratamento controle, FSS e nos FCS, adjacente à necrose (Ane). As amostras, após fixação, foram submetidas a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série etílica crescente e incluídas em Spurr (Spurr, 1969). No Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ (Universidade de São Paulo-USP), os blocos foram preparados para ultramicrotomia num desbastador de blocos (modelo EM Trim, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Cortes transversais, com 70 nm de espessura, foram obtidos em ultramicrotomo (modelo UCT, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) com navalha de diamante. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo

(Reynolds, 1963) e documentados em microscópio eletrônico de transmissão modelo Zeiss EM900, em 50 kV, com câmera digital acoplada.

Determinação do teor de fluoreto na matéria seca (MS) das folhas - Para a quantificação do teor de flúor na MS, folhas (n=4) da região basal (5º nó a partir da gema apical até o 8º) e apical (1º nó a partir da gema apical até o 4º) da planta, dos dois tratamentos, foram previamente secas em estufa, a 70°C, e reduzidas, em moinho do tipo Wiley, a partículas com dimensões inferiores a 1 mm. Posteriormente, alíquotas de 0,5 g, de cada repetição, foram submetidas à extração em ácido perclórico 0,1 M (Garcia-Ciudad *et al.*, 1985), utilizando-se o ajustador de força iônica (Larsen & Widdowson, 1971), para determinação potenciométrica do teor de fluoreto, com eletrodo específico. As análises foram conduzidas em duplicata e repetidas duas vezes.

Análise dos dados - O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos (0 e 5 mg L⁻¹) e quatro repetições por tratamento. Para fins de análise estatística, as diferentes regiões amostradas para medições de fluorescência de imagem nos FCS (Pne, Ane e Nne) foram consideradas como tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (Euclides, 1983), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Resultados

Danos morfoanatômicos - Nas plantas expostas ao flúor, a maior parte dos folíolos apresentou aspecto visual semelhante ao observado no tratamento controle (Fig. 1A), sem necroses ou cloroses em resposta ao poluente (Fig. 1B). Nos folíolos com sintomas (FCS) não foram observadas cloroses, somente necroses com coloração típica caracterizada por apresentar três zonas com colorações distintas: enegrecida, acinzentada e marrom (Fig. 1C). As necroses tiveram início a partir da porção basal (região proximal) de folíolos situados entre o 3º e o 4º nó (a partir da gema apical) e começaram a aparecer, em uma das repetições, sete dias após o início dos nevoeiros. Aos 19 dias do início das simulações, todas as repetições do tratamento com flúor apresentavam de um a três folíolos necrosados.

No tratamento controle, a face adaxial dos folíolos de *S. dulcis* é formada por células epidérmicas com o contorno das paredes anticlinais nítido (Fig. 2A). Nos folíolos sem sintomas das plantas expostas ao flúor (FSS), além da alteração no contorno das paredes

anticlinais ocorreu a erosão das ceras epicuticulares (Fig. 2B) e nos FCS, a plasmólise generalizada do tecido de revestimento (Fig. 2C).

A face abaxial, no tratamento controle, apresenta estômatos com cristas proeminentes (Fig. 2D e G). Nos FSS, a plasmólise das células-guarda e a ruptura das cristas estomáticas (Fig. 2E e H) são os principais danos observados. Nos FCS, além da plasmólise das células-guarda observou-se também a infestação por hifas fúngicas (Fig. 2F e I).

Em comparação com o tratamento controle, houve redução de 18,9; 8,1 e 11,5% na espessura do limbo nas porções basal, mediana e apical dos FSS, respectivamente (Fig. 3) e significativa somente nas porções basal e apical do folíolo ($p < 0,01$). A correlação entre espessura do limbo e a altura das células do parênquima lacunoso foi a mais alta (0,94; 0,82 e 0,89 nas porções basal, mediana e apical dos FSS, respectivamente) e significativa ($p < 0,01$). No entanto, não houve alteração na proporção entre o parênquima paliçádico e o lacunoso, entre os dois tratamentos.

A nervura mediana dos folíolos de *S. dulcis* apresenta ilhota de colênquima subjacente à epiderme da face adaxial e uma camada contínua de colênquima em contato com a epiderme da face abaxial; observa-se a presença de canais secretores na região cortical e de conteúdos fenólicos principalmente no parênquima, próximo aos tecidos vasculares (Fig. 4A, C). Entre a margem e a nervura mediana do folíolo, o mesófilo é formado por uma camada de parênquima paliçádico e quatro a cinco camadas de parênquima lacunoso (Fig. 4E). Nos FCS, a necrose atingiu, em maior ou menor grau, quase todos os tecidos, verificando-se plasmólise principalmente nas células parênquimáticas tanto na nervura mediana (Fig. 4B, D) quanto na região entre a margem e a nervura mediana dos folíolos (Fig. 4F). No entanto, o teste histoquímico para compostos fenólicos não evidenciou o acúmulo destas substâncias nas regiões necrosadas (Fig. 4).

Danos ultra-estruturais – A figura 5A mostra a epiderme da face adaxial de folíolo no tratamento controle, com parede periclinal externa mais espessa, células vacuolizadas e paredes anticlinais retilíneas. Nos FSS, a parede anticlinal apresenta, muitas vezes, aspecto deformado (Fig. 5B). Nos FCS, a parede anticlinal aparece mais deformada, havendo retração do tonoplasto que fica elétron-denso (Fig. 5C-D). Na parede periclinal externa dos FCS, observa-se a formação de zonas claras além do aumento na eletron-densidade das ceras epicuticulares (Fig. 5E-F).

No parênquima paliçádico, os grãos de amido possuem formato lenticular e os cloroplastos disposição periférica, no tratamento controle (Fig. 6A e D). Nos FSS, os grãos de amido aparecem mais volumosos (Fig. 6B e E). Nos FCS, as células aparecem totalmente

plasmolizadas, havendo retração da membrana plasmática e deformação das paredes celulares (Fig. 6C, F).

No tratamento controle, as células companheiras do floema possuem núcleo evidente, citoplasma denso e numerosas mitocôndrias (Fig. 7A). Nos FSS, as células companheiras aparecem com o conteúdo celular formando uma massa escura (Fig. 7B-D).

O parênquima lacunoso dos folíolos das plantas do tratamento controle possui, em corte transversal, células de contorno arredondado (Fig. 8A) com cloroplastos e grãos de amido lenticulares (Fig. 9A). Nos FSS, os cloroplastos e grãos de amido ficam mais volumosos (Fig. 8B-C e 9C) e a membrana plasmática e o tonoplasto ficam mais elétrondensos e se rompem (Fig. 8B-C e 9B-C). Nos FCS, os cloroplastos aparecem dilatados (Fig. 8D e 9C-D). Em algumas células, também se observa a ruptura da dupla membrana do cloroplasto (Fig. 8E) e, em alguns cloroplastos, os tilacóides ficam desestruturados formando regiões de elétrondensidade distinta (Fig. 9D-E) não se observando grana na zona mais elétrondensa (Fig. 9E). As mitocôndrias não apresentam cristas nítidas (Fig. 9F) e observa-se, nas proximidades dos cloroplastos, a aglomeração dos conteúdos celulares em massas escuras (Fig. 9G-H).

No tratamento controle, as células epidérmicas da face abaxial dos folíolos de *S. dulcis* apresentam paredes anticlinal e periclinal externa retilíneas (Fig. 10A-C). No entanto, nos FSS (Fig. 10D-E) e FCS (Fig. 10F-G) observa-se a formação de deformações (Fig. 10E) e ondulações nestas paredes (Fig. 10D, F-G). O complexo estomático, no tratamento controle, possui células subsidiárias túrgidas e células-guarda com núcleo evidente e volumoso (Fig. 11A). No entanto, nos FSS, observam-se alterações tanto nas células subsidiárias quanto nas células-guarda (Fig. 11B). Nas células subsidiárias, que aparecem plasmolizadas, nota-se a membrana plasmática elétrondensa e não periférica, além de ondulações na parede periclinal externa (Fig. 11B). As células-guarda também sofrem redução no turgor além do aspecto fibrilar da parede (Fig. 11C) e do aumento da elétrondensidade das ceras epicuticulares (Fig. 11D).

Danos fisiológicos - Nos FSS das plantas expostas ao flúor houve decréscimo significativo ($p < 0,01$) de 77%, 76,3 e 77,3% na taxa de assimilação líquida de CO_2 , condutância estomática e na taxa de transpiração, respectivamente (Fig. 12B-C), em relação ao tratamento controle. Já a concentração interna de CO_2 apresentou aumento de 32,4% (Fig. 12D), contudo, não significativo ($p > 0,05$).

Em resposta ao flúor, houve redução significativa ($p < 0,01$) de 35,8% nos teores de clorofila *a* (Fig. 13). Observou-se decréscimo significativo ($p < 0,05$) de 33,2 e 17,5% nos

teores de clorofila *b* e carotenóides (Fig. 13), respectivamente, não havendo redução significativa ($p>0,05$) na relação clorofila *a/b* das plantas expostas ao flúor, em comparação com o tratamento controle.

O tratamento com flúor não teve efeito significativo ($p>0,05$) sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* nos FSS, em comparação com o tratamento controle (Fig. 14). Nos FCS, a medida que se aproxima da necrose observa-se redução gradual nos valores de rendimento de fluorescência mínima (F_0) e do rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), dos coeficientes de extinção fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ), bem como do rendimento quântico efetivo (Yield) e do rendimento de fluorescência máxima (F_m). Contudo, o poluente só afetou significativamente ($p<0,05$) a área adjacente (Ane) e na necrose (Nne), não havendo diferença significativa perto da necrose (Pne), em relação ao tratamento controle, para a maioria dos parâmetros avaliados (Fig. 14-15).

Teor de fluoreto - Na porção basal das plantas, as folhas apresentaram teor de flúor 101,2% maior do que no tratamento controle (Fig. 16). Já na porção apical das plantas, o teor do poluente foi 110,9% maior em comparação com o tratamento controle (Fig. 16). Os teores de flúor nas plantas expostas ao poluente foram estatisticamente distintos do tratamento controle ($p<0,01$), mas não houve diferença entre as porções basal e apical da planta ($p>0,05$).

Discussão

A exposição por tempo mais prolongado a baixas concentrações de flúor induziu sintomas similares aos observados nos experimentos anteriores, de curta duração e altas concentrações do poluente (Capítulo 1).

As pequenas manchas enegrecidas presentes nas necroses dos folíolos com sintomas de *Spondias dulcis* provavelmente indicam o ponto onde o poluente está mais concentrado, causando danos mais drásticos na região, enquanto as outras duas áreas da necrose, com coloração mais clara, refletem graus de injúria distintos como consequência de menores concentrações do elemento presentes no tecido. A necrose foliar é um sintoma típico em resposta ao flúor e ocorre quando este elemento atinge níveis letais na região afetada (Coulter *et al.*, 1985; Oliva & Figueiredo, 2005). Contudo, a quantificação de flúor na matéria seca de cada uma das três regiões da necrose, em experimentos futuros, será fundamental para comprovar a hipótese de que a diferença de coloração observada é consequência direta da quantidade do elemento.

Nos fragmentos foliares necrosados de *S. dulcis*, o teste específico para detecção de compostos fenólicos não evidenciou o acúmulo desta substância, porém, idioblastos repletos

destes compostos foram observados na nervura mediana, comprovando que os idioblastos descritos por Venning (1948) e Sant'Anna-Santos *et al.* (2006b) no caule da espécie também estão presentes nas folhas. Em experimento anterior, conduzido em campo, o acúmulo de fenóis foi evidenciado nas plantas expostas ao poluente (Capítulo 2) pelo azul de toluidina, que cora-se de verde na presença destes compostos (O'Brien *et al.*, 1964; Feder & Wolf, 1965). Segundo Azevedo (1995), nas regiões necrosadas pelo flúor, em *Glycine max*, o tecido adquire coloração escura provavelmente devido ao acúmulo de compostos fenólicos resultantes da degeneração celular, como observado nas células companheiras do floema no presente estudo. Segundo Feder & O'Brien (1968), alguns métodos de anatomia vegetal, como a fixação e a inclusão em parafina podem prejudicar características do tecido em análise. Provavelmente, o acúmulo de fenóis se dá, entretanto, a ruptura das células deve extravasar estes compostos e facilitar sua remoção durante a fixação e infiltração das amostras. Desta forma sugere-se, em estudos posteriores, utilizar testes histoquímicos com material a fresco, utilizando outros métodos além de quantificar os compostos fenólicos.

No presente trabalho, não se observou o aparecimento de cloroses antes da necrose, conforme já relatado em estudos conduzidos com *S. dulcis* e concentrações mais elevadas do poluente por períodos curtos de exposição (Silva *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007). Geralmente, o acúmulo de flúor primeiramente causa cloroses que, em geral, evoluem para necroses marginais e apicais (Ardnt *et al.*, 1995; Fornasiero, 2001; Weinstein & Davison, 2003; Peixoto *et al.*, 2005). A redução na concentração dos pigmentos fotossintéticos, significativa nos FSS de *S. dulcis*, pode ser resultado de danos à estrutura dos cloroplastos (Peixoto *et al.*, 2005), conforme observado nas células do mesófilo. O flúor também possui a capacidade de se ligar ao magnésio e formar compostos que possuem a capacidade de ocasionar distúrbios na biossíntese das clorofilas, levando ao aparecimento de cloroses em algumas porções foliares (Fornasiero, 2001).

Alterações no formato dos cloroplastos dos FSS e FCS de *S. dulcis* foram também citadas por Wei & Miller (1972) em *Glycine max*. Segundo Miller (1993), o cloroplasto é a organela que mais acumula fluoreto e tem sido citada como a mais afetada pela ação do poluente (Azevedo, 1995). O aumento no volume dos grãos de amido nos cloroplastos dos FSS e FCS de *S. dulcis* também ocorrem em resposta a chuva ácida Sant'Anna-Santos *et al.* (2006a). Geralmente, o acúmulo de amido está relacionado ao efeito inibitório dos poluentes sobre a translocação de carboidratos das folhas para as raízes, causando o acúmulo nos cloroplastos (Rennenberg *et al.*, 1996; Soda *et al.*, 2000). Nos FSS de *S. dulcis*, a degeneração do conteúdo citoplasmático das células companheiras é um indicativo de alterações no funcionamento do floema, conforme relatado por Soda *et al.* (2000) em folhas de *Pinus*

halipensis expostas ao ozônio. Este fenômeno parece ser indicativo de aceleração no processo de envelhecimento celular sob influência de poluentes (Schmitt & Ruetze, 1990). Adicionalmente, os fragmentos de membrana observados nas células parenquimáticas dos FSS e FCS de *S. dulcis* são semelhantes aos produtos resultantes do colapso celular que aparecem durante o processo de senescência celular (Wittenbach *et al.*, 1980), fornecendo mais indícios de que o flúor possa estar acelerando a senescência.

Tanto a membrana plasmática quanto o tonoplasto foram severamente afetados nos FSS e FCS de *S. dulcis*. A permeabilidade e o transporte do flúor através das membranas celulares é, provavelmente, a origem de todos os efeitos fitotóxicos do poluente na célula (Bhatnagar & Bhatnagar, 2000). As membranas podem ser afetadas tanto pela falta de energia para a síntese de componentes quanto pela hidrólise de lipídios que são utilizados como fonte alternativa de energia (Bhatnagar & Bhatnagar, 2000). Como os lipídios são os principais componentes das membranas celulares, qualquer alteração em sua composição pode alterar a estrutura e função das membranas ocasionando, desta forma, a perda acelerada de eletrólitos (McCullough & Simon, 1973; Zwiazek & Shay, 1988), conforme observado por Divan Junior *et al.* (2007) em *Chloris gayana* e *Panicum maximum*, em resposta ao flúor. Segundo Miller & Vedina (2000), a membrana mais sensível ao flúor é o tonoplasto e isto está relacionado à ATPase.

A parede celular das células epidérmicas foi um dos componentes celulares mais afetados pelo flúor nos FSS e FCS de *S. dulcis*. Devido à abundância de ácidos urônicos ionizáveis presentes nas paredes celulares, estas normalmente têm carga negativa (Brett & Waldron, 1990). O principal cátion associado a estas cargas negativas é o cálcio que pode ser deslocado pelo flúor ocorrendo como resultado um acúmulo de CaF_2 e modificações estruturais na parede. A formação de CaF_2 promove a liberação de sítios de fixação de cálcio e uma deficiência de cálcio, fisiologicamente ativo, nos tecidos (Garrec & Chopin, 1982). Nos experimentos anteriores conduzidos no campo (Capítulo 2), não foram observados danos tão severos nas paredes celulares já que o flúor, na forma gasosa, é absorvido principalmente pelos estômatos (McCune *et al.*, 1977).

Na face abaxial dos FSS e FCS, as injúrias microscópicas estavam principalmente associadas aos estômatos, conforme relatado em outras espécies (Chaves *et al.*, 2002; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2007), mas não exerceram influência sobre as trocas gasosas, já que a redução na taxa de assimilação líquida de CO_2 observada em *S. dulcis* não foi ocasionada por uma limitação difusional, uma vez que a redução na condutância estomática (gs) não restringiu a concentração interna do CO_2 (Ci) no

interior do mesófilo, sendo o ganho de carbono provavelmente limitado por um componente metabólico.

Neste estudo não foi observado efeito do flúor na eficiência máxima do fotossistema II de FSS, o que demonstra que o elemento não afeta as reações luminosas da fotossíntese em concentração abaixo da requerida para ocasionar sintomas, conforme observado por Boese *et al.* (1995) em *Spinacea oleracea*. Giannini *et al.* (1985) observaram a inibição do transporte de elétrons nos tilacóides de *Glycine max*. Contudo, após adição de um desacoplador, as taxas de evolução do oxigênio voltaram ao normal, indicando que a atividade do fotossistema II não é inibida pelo poluente. Relatos indicam que concentrações moderadas de fluoreto inibem a fotossíntese sob condições de alta irradiância, mas exercem pouco ou nenhum efeito sob baixa irradiância, levando Quick *et al.* (1989) a concluir que tanto reações luminosas quanto a produção de ATP são inibidas pelo elemento. Boese *et al.* (1995) verificaram que a fluorescência rápida (Fo, Fm ou a razão Fv/Fm) não foi afetada pelo flúor em folhas de *Spinacea oleracea*, entretanto, foi significativamente alterada com a adição de concentrações crescentes do elemento, levando a um aumento na taxa do *quenching* fotoquímico e um decréscimo no *quenching* não-fotoquímico. Foi sugerido que o flúor pode atuar com um desacoplador acelerando o fluxo de elétrons no fotossistema II, sem a formação simultânea de um gradiente de prótons.

Nos FSS, a concentração de flúor utilizada causou a redução na espessura do limbo, fato não observado em experimentos anteriores de curta duração com a mesma concentração (Capítulo 1), demonstrando que a injúria celular não está relacionada somente com o aumento na concentração do poluente no nevoeiro, mas com a duração do tempo de exposição, de acordo com Ardnt *et al.* (1995). O parênquima lacunoso foi o tecido mais afetado pelo poluente e, em consequência disto, o maior responsável pela redução em espessura do limbo. Provavelmente, este tecido fica mais exposto à ação do poluente devido à grande porcentagem de espaços intercelulares já que, segundo Oliva & Figueiredo (2005), o flúor se move via apoplasto. A porção mais afetada dos FSS foi a base, região onde as necroses têm início em *S. dulcis* (Capítulo 1), confirmando que os danos anatômicos antecedem o surgimento da injúria (Soda *et al.* 2000; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007; Sant'Anna-Santos *et al.* (2007). A maior susceptibilidade da base dos FSS pode ser reflexo da disposição das folhas, já que a base mais perpendicular ao caule pode favorecer a aderência de gotas com o poluente naquela região. Contudo, estudos anatômicos e ultra-estruturais deverão ser conduzidos para verificar se alguma outra característica da base pode influenciar na maior susceptibilidade em relação as outras porções do órgão.

Os dados aqui apresentados demonstram que a injúria celular não se restringiu aos FCS. Nos FSS, danos fisiológicos também ocorreram, demonstrando que, além das investigações anatômicas, conforme observado em experimentos anteriores em laboratório, e no campo (Capítulos 1 e 2), parâmetros fisiológicos detectam a injúria invisível, tornando esta ferramenta promissora no prognóstico de injúria por flúor em biomonitoramento ativo com *S. dulcis*. Os teores de flúor em folhas de *S. dulcis* tiveram tendências similares às observadas em experimento anterior de curta duração, demonstrando que o aparecimento de sintomas está associado ao aumento na concentração interna de flúor que depende do tempo de contato da planta com o poluente. Contudo, os valores observados foram significativamente inferiores aos de experimentos no campo, demonstrando que o flúor dissolvido penetra menos do que na forma gasosa e/ou no campo, as concentrações do poluente podem ser maiores.

Os presentes resultados confirmam que cloroses não antecedem necroses em *Spondias dulcis*, mesmo quando as plantas são expostas a baixas concentrações do poluente por períodos mais prolongados. A maior redução na espessura da base, em relação a porção mediana e apical dos FSS, confirma que esta porção do folíolo é mais susceptível ao poluente. O parênquima lacunoso foi o tecido mais afetado e a membrana plasmática, o tonoplasto e os cloroplastos os componentes celulares mais danificados pelo flúor em *S. dulcis*. A avaliação conjunta dos parâmetros visuais, fisiológicos e microscópicos demonstrou ser valiosa na análise dos efeitos causados pelo flúor em *S. dulcis*, levando a concluir que a redução na fotossíntese dos FSS não ocorre devido a mecanismos de difusão de carbono e nem a danos na fase luminosa da fotossíntese, mas sim a alterações na estrutura dos cloroplastos e que o acúmulo de amido deve ser reflexo da inativação de células do floema já que o tecido é responsável pela translocação de fotoassimilados para as raízes.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa ao primeiro autor, a Dra. Cláudia Martellet Fogaça, pela colaboração nas análises estatísticas, ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, da Universidade de São Paulo (USP), pelos suportes físico e técnico para realização das análises ao microscópio eletrônico.

Referências bibliográficas

- Arndt, U.; Flores, F.E.V. & Weinstein, L.H. 1995. **Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil**. UFRGS, Porto Alegre, 155pp.
- Azevedo, A.A. 1995. Ação do flúor, em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de *Glycine max* (L.) Merril. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 95p.
- Ballantyne, D.J. 1991. Fluoride and photosynthetic capacity of azalea (*Rhododendron*) cultivars. **Fluoride** 24: 11-16.
- Bhatnagar, M. & Bhatnagar, A. 2000. Algal and cyanobacterial responses to fluoride. **Fluoride** 33: 55-65.
- Bilger, W. & Björkman, O. 1990. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research** 25:173-185.
- Boese, S.R.; MacLean, D.C. & El-Mogazi, D. 1995. Effects of fluoride on chlorophyll *a* fluorescence in Spinach. **Environmental Pollution** 89: 203-208.
- Brett, C. & Waldron, K. 1990. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. Unwin Hyman Ltd, London, p.44-48.
- Chaves, A.L.F.; Silva, E.A.M.; Azevedo, A.A.; Cano, M.A.O. & 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 Botanica Brasilica** 16: 395-406.
- Coulter, C.T.; Pack, M.R. & Sulzbach, C.W. 1985. An evaluation of the dose-response relationship of fluoride injury to *Gladiolus*. **Atmospheric Environment** 19: 1001-1007.
- Darrall, N.M. 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. **Cell and Environment** 12: 1-30.
- Divan Junior, A.M.; Oliva, M.A.; Martinez, C.A. & Cambraia, J. 2007. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colonião. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67: 247-253.
- Divan Junior, A.M.; Oliva, M.A. & Ferreira, F.A. 2008. Dispersal pattern of airborne emissions from an aluminium smelter in Ouro Preto, Brazil, as expressed by foliar fluoride accumulation in eight plant species, **Ecological Indicators** 8: 454-461.
- Domingos, M.; Klumpp, A.; Rinaldi, M.C.S.; Modesto, I.; Klumpp, G. & Delitti, W.B.C. 2003. Combined effects of air and soil pollution by fluoride emissions on *Tibouchina pulchra* Cogn., at Cubatão, SE Brazil, and their relations with aluminum. **Plant and Soil** 249: 297-308.

- Euclides, R.F. 1983. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG) – Manual.** CPD/UFV, Divisão de Pesquisas e Desenvolvimento. Viçosa, Minas Gerais. 74p.
- Feder, N. & O'Brien, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany** 55: 123-142.
- Feder, N. & Wolf, M.K. 1965. Studies on nucleic acid metachromasy. II. Metachromatic and orthochromatic staining by toluidine blue of nucleic acids in tissue sections. **Journal of Cell Biology** 27: 327-336.
- Fornasiero, R.B. 2001. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science** 161: 979-985.
- Fornasiero, R.B. 2003. Fluorides 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 de cerâmica, Araras (SP). **Bragantia** 62: 275-281.
- Furlan, C.M.; Domingos, M. & Salatino, A. 2007. Effects of initial climatic conditions on growth and accumulation of fluoride and nitrogen in leaves of two tropical tree species exposed to industrial air pollution. **Science of the Total Environment** 374: 399-407.
- Furlan, C.M.; Santos, D.Y.A.C.; Salatino, A. & Domingos, M. 2006. n-Alkane distribution of leaves of *Psidium guajava* exposed to industrial air pollutants **Environmental and Experimental Botany** 58: 100-105.
- Garcia-Ciudad, A.; Garcia-Criado, B. & Pontón-San Emeterio, C. 1985. Determination of fluoride in plant samples by a potentiometric method and near-infrared reflectance spectroscopy. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 16: 1107-1122.
- Garrec, J.P. & Chopin, S. 1982. Calcium accumulation in relation to fluoride pollution in plants. **Fluoride** 15: 144-149.
- Genty, B.; Briantais, J-M. & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta** 990: 87-92.
- Giannini, J.; Miller, G.W. & Pushnik, J.C. 1985. Effects of NaF on biochemical processes of isolated soybean chloroplasts. **Fluoride** 18: 72-9.
- Günthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P. 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. **Environmental Pollution** 147: 467-488.

- Günthardt-Goerg, M.S.; McQuattie, C.J.; Maurer, S. & Frey, B. 2000. Visible and microscopic injury in leaves of five deciduous tree species related to current critical ozone levels. **Environmental Pollution** **109**: 489-500.
- Hiscox, J.D. & Israelstam, G.F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany** **57**:1332-1334.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil**. (California Agricultural Experiment Station: Berkeley, CA).
- Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. Mc GrawHill, New York, 523pp.
- Kaiser, E. 1980. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. **Botanisch Zentralb** **180**: 25-26.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** **27**: 37-138.
- Klumpp, A.; Domingos, M. & Klumpp, G. 1996a. Assessment of the vegetation risk by fluoride emissions from fertiliser industries at Cubatão, Brazil. **The Science of the Total Environment** **192**: 219-228.
- Klumpp, A.; Klumpp, G.; Domingos, M. & Silva, M.D. 1996b. Fluoride impact on native tree species of the atlantic forest near Cubatão, Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution** **87**: 57-71.
- Klumpp, G.; Klumpp, A.; Domingos, M. & Guderian, R. 1995. *Hemerocallis* as bioindicator of fluoride pollution in tropical countries. **Environmental Monitoring and Assessment** **35**: 27-42.
- Larsen, S. & Widdowson, A.E. 1971. Soil fluorine. **Journal of Soil Science** **22**: 210-221.
- MacLean, D.C. & Schneider, R.E. 1981. Effects of gaseous hydrogen fluoride on the yield of field-grown wheat. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological** **24**: 39-44.
- McCullough, C.H. & Simon, E.W. 1973. The effect of iodoacetate on phospholipid levels and membrane permeability. **Journal of Experimental Botany** **24**: 841-846.
- McCune, D.C. 1977. Hydrogen fluoride and sulfur dioxide. In: Legge, A.H. & Krupa, S. V. (Eds.). Air Pollutants and their effects on the terrestrial ecosystems. **Advances in Environment Science and Technology** **18**: 305-324.
- Miller, G.W. 1993. The effect of fluoride on higher plants. **Fluoride** **26**: 3-22.
- Miller, G.W. & Vedina, O.T. 2000. Fluoride metabolism on plants. **Fluoride** **33**: 11-12.
- Moraes, R.M.; Delitti, W.B.C. & Moraes, J.A.P.V. 2003. Gas exchange, growth, and chemical parameters in a native Atlantic forest tree species in polluted areas of Cubatão, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **54**: 339-345.

- Murray, F. 1984. Effects of long term exposure to hydrogen fluoride on grapevines. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological** 36: 337-349.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373.
- O'Brien, P.P. & McCully, M.E. 1981. **The study of plants structure principles and select methods**. Termarcarphi Pty. Ltda, Melbourne-Australia, 45p.
- Oliva, M.A. & Figueiredo, J.G. 2005. Gramíneas bioindicadoras de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica** 28: 389-397.
- Otto, R.; Faria, M.R.M.; Queiroz, F.E.C.; Moura, T.A.; Vitti, G.C. & Cantarella, H. 2007. Rendimento da cana-de-açúcar é afetado por flúor. **Bragantia** 66: 505-509.
- Parry, M.A.J.; Schmidt, C.N.G. & Gutteridge, S. 1984. Inhibition of ribulose-P e carboxylase/oxygenase by fluoride. **Journal of Experimental Botany** 35: 1177- 1181.
- Peixoto, P.H.P.; Pimenta, D.S. & Antunes, F. 2005. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 40: 727-734.
- Pushnik, J.C. & Miller, G.W. 1990. The influences of elevated environmental fluoride on the physiology and metabolism of higher plants. **Fluoride** 23: 5-19.
- Quick, P.; Neuhaus, E.; Feil, R. & Stitt, M. 1989. Fluoride leads to an increase of inorganic pyrophosphate and an inhibition of photosynthetic sucrose synthesis in spinach leaves. **Biochimica et Biophysica Acta** 973: 263-271.
- Rennenberg, H.; Herschbach, C. & Polle, A. 1996. Consequences of air pollution on shoot-root interactions. **Journal of Plant Physiology** 148: 296-301.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. **Journal of Cell Biology** 17: 208.
- Sant'Anna-Santos, B.F. & Azevedo, A.A. 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 48-50.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M.; Alves, E.F.; Silva, E.A.M. & Aguiar, R. 2006a. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany** 58: 158-168.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Thadeo, M.; Meira, R.M.S.A. & Ascensão, L. 2006b. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Revista Árvore** 30: 481-489.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Duque-Brasil, R.; Azevedo, A.A.; Silveira, A.S.; Araújo, J.M. & Aguiar, R. 2007. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore** 31: 761-771.

- Schmitt, U. & Ruetze, M. 1990. Structural changes in spruce and fir needles. **Environmental Pollution** 8: 187-190.
- 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** 23: 385-393.
- Soda, C.; Bussotti, F.; Grossoni, P.; Barnes, J.; Mori, B. & Tani, C. 2000. Impacts of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. **Environmental and Experimental Botany** 44: 69-82.
- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructural Research** 26: 31-43.
- Venning, F.D. 1948. The ontogeny of the laticiferous canals in the Anacardiaceae. **American Journal of Botany** 35: 637-644.
- Vollenweider, P. & Günthardt-Goerg, M.S. 2006. Erratum to “Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage” [Environ. Pollut. 137 (2005) 455-465]. **Environmental Pollution** 140: 562-571.
- Vollenweider, P.; Ottiger, M. & Günthardt-Goerg, M.S. 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. **Environmental Pollution** 124: 101-118.
- Wallis, W.J.; Miller, G.W.; Psenak, M. & Shieh, J. 1974. Fluoride effects on chlorophyll biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. **Fluoride** 7: 69-77.
- Wei, L. & Miller, G.W. 1972. Effect of HF on the fine structure of mesophyll cells from *Glycine max*, Merr. **Fluoride** 5: 67-72.
- Weinstein, L.H. 1977. Fluoride and plant life. **Journal of Occupational Medicine** 19:49-78.
- Weinstein, L.H. & Davison, A.W. 2003. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution** 125: 3-11.
- Weinstein, L.H. & Hansen, K.S. Relative susceptibilities of Brazilian vegetation to airborne fluoride. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 23: 1125-1137.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology** 144: 307-313.
- Wittenbach, V.A.; Ackerson, R.C.; Giaquinta, R.T. & Hebert, R.R. 1980. Changes in photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase, proteolytic activity, and ultrastructure of soybean leaves during senescence. **Crop Science** 20: 225-231.

Zwiazek, J.J. & Shay, J.M. 1988. Sodium fluoride induced metabolic changes in jack pine seedlings. II. Effect on growth, acid phosphatase, cytokinins and pools of soluble proteins, amino acids and organic acids. **Canadian Journal of Forestry Research** **18**: 1311-1317.

Tabela 1. Resultados da análise química do solo utilizado como substrato nos vasos para cultivo das plantas de *Spondias dulcis* Forst. F. SB (Soma de bases trocáveis); CTC (t) (Capacidade de troca catiônica efetiva); CTC (T) (Capacidade de troca catiônica a pH=7.0); V (Índice de saturação de bases); m (Índice de saturação de alumínio); ISNa (Índice de saturação de sódio); MO (Matéria orgânica = C.Org $\times$ 1.724 – Walkley-Black); P-rem (Fósforo remanescente).

pH	P	K	Na	Ca²⁺	Mg²⁺	Al³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)
H ₂ O		mg/dm ³					cmol _c /dm ³			
7.25	19.1	1727	-	6.16	1.12	0.0	1.0	11.7	11.7	12.7
V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
	%		dag/kg	mg/L				mg/dm ³		
92.1	0	-	3.68	23.3	-	21.6	54.1	0.48	6.84	262.6

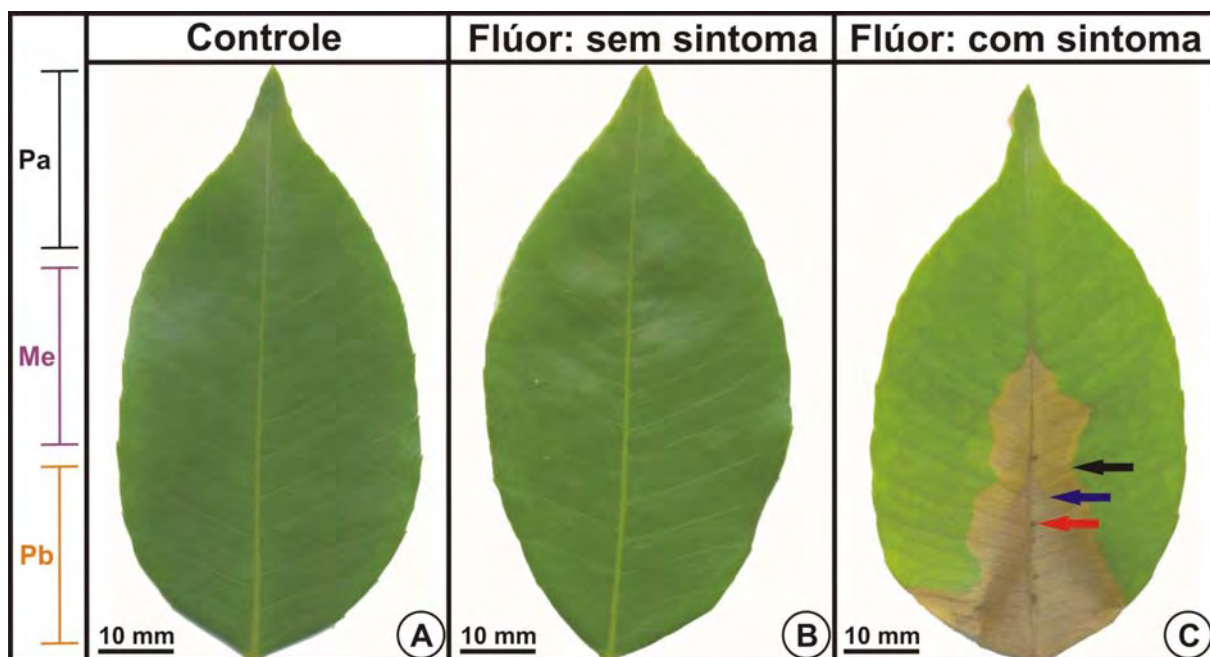


Figura 1. Foliolos de *Spondias dulcis* Forst. F. no tratamento controle (A) e quando expostos a 5 mg L⁻¹ de flúor (B -C), após 19 simulações de nevoeiro. A: Foliolo com coloração verde brilhante típica. B: Foliolo sem sintomas. C: Foliolo com necrose na porção basal (Pb) caracterizada por coloração típica: enegrecida (→), acinzentada (→) e marrom (→). Abreviaturas: Me (Porção mediana do foliolo) e Pa (Porção apical do foliolo).

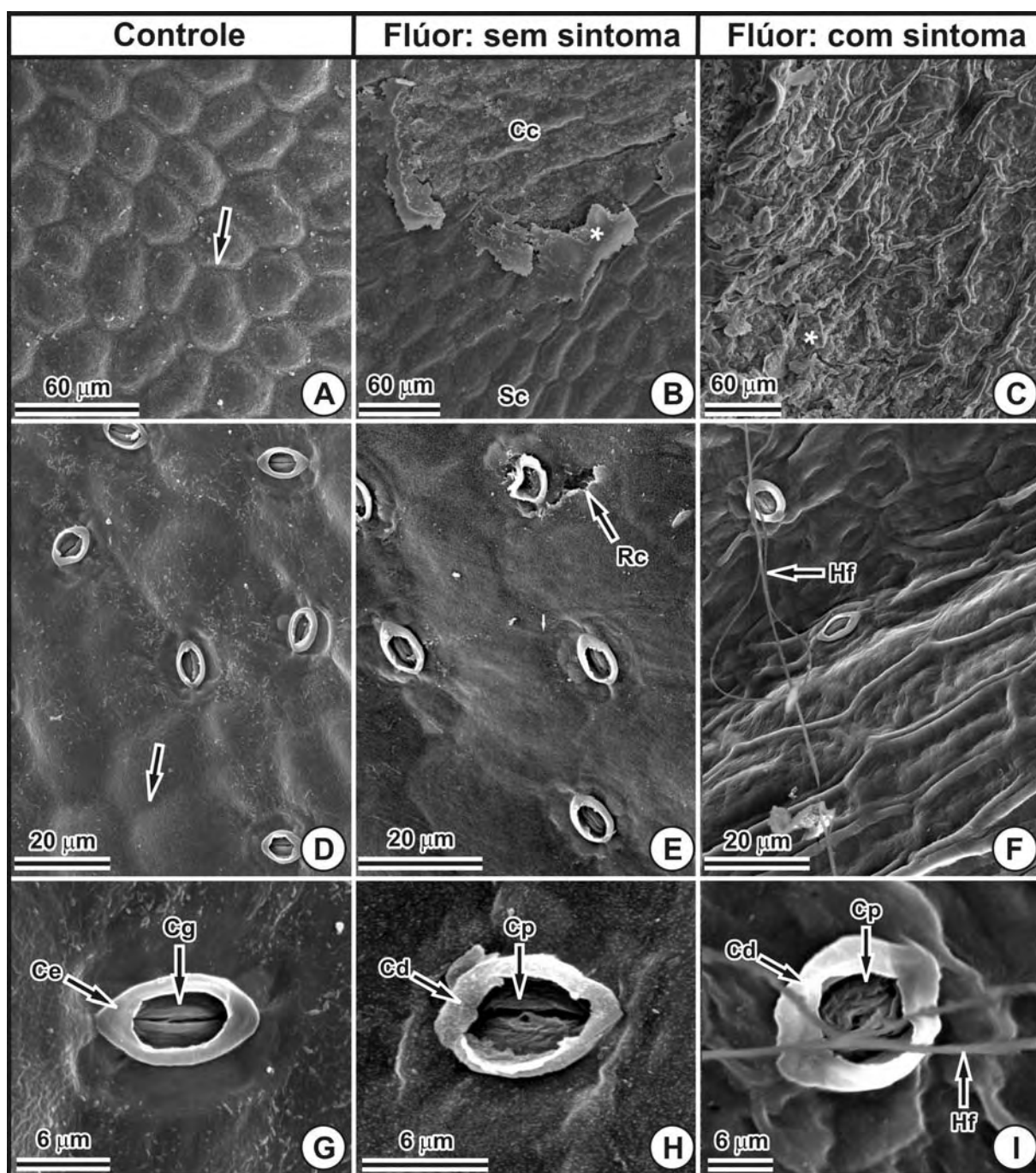


Figura 2. Superfície foliar de *Spondias dulcis* Forst. F. (microscopia eletrônica de varredura) no tratamento controle (A, D e G) e quando expostos a 5 mg L⁻¹ de flúor (B-C, E-F e H-I), após 19 simulações de nevoeiro. A-C: Face adaxial. A: Contorno das paredes anticlinais nítido (→). B: Superfície com (Cc) e sem (Sc) cera epicuticular (*). C: Células totalmente plasmolizadas e aglomerados de ceras epicuticulares (*). D-I: Face abaxial. D: Contorno das paredes anticlinais nítido (→). E: Estômatos danificados e ruptura da cutícula (Rc). F: Infestação por hifas fúngicas (Hf) na superfície plasmolizada. G: Estômato com células-guarda (Cg) túrgidas e crista estomática (Ce) intacta. H: Estômato com células-guarda plasmolizadas (Cp) e crista estomática deformada (Cd). I: Infestação por hifas fúngicas.

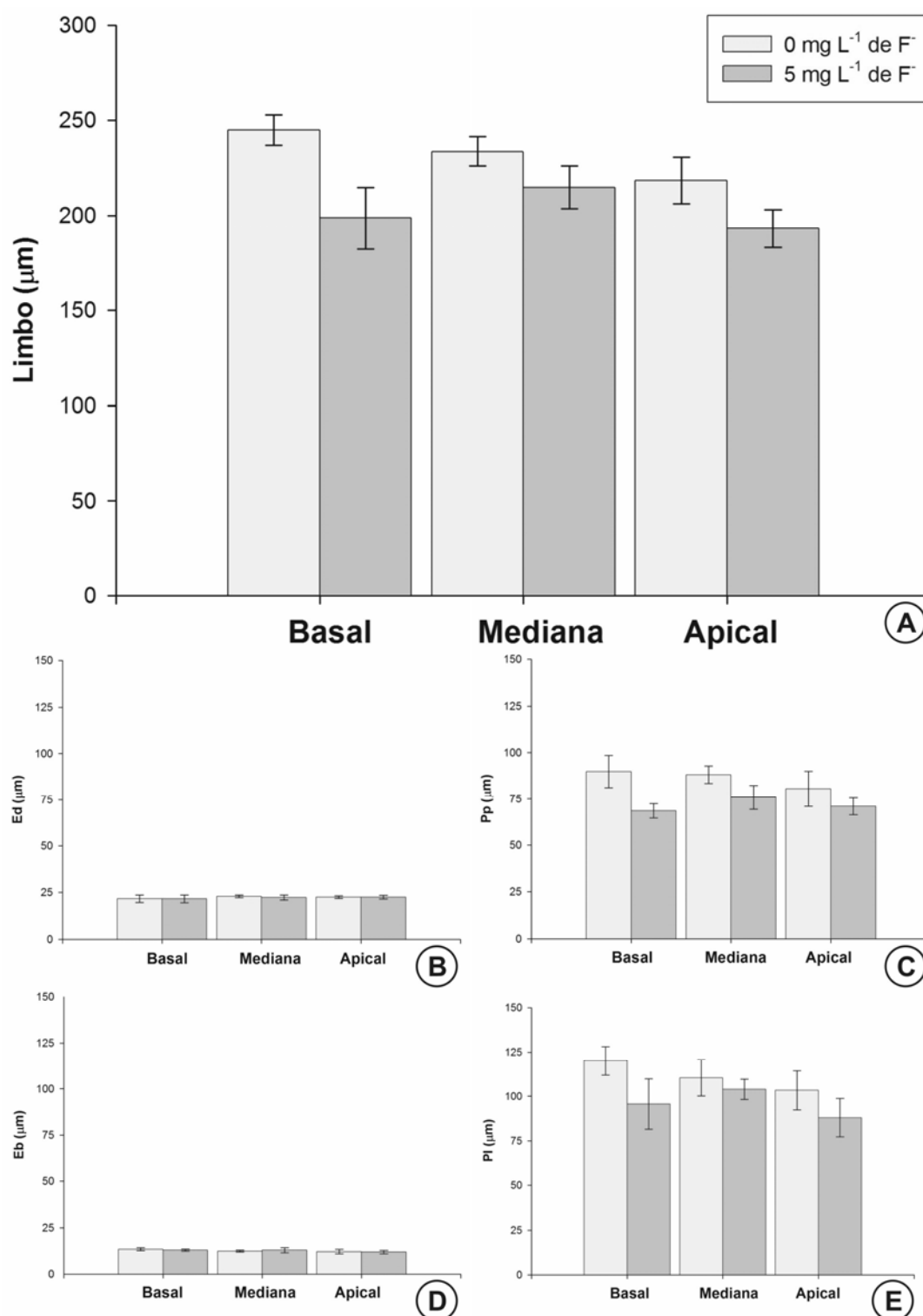


Figura 3. Espessura do limbo e altura dos tecidos nas porções basal, mediana e apical dos folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. no tratamento controle e quando expostos a 5 mg L⁻¹ de flúor (folíolos sem sintomas), após 19 simulações de nevoeiro. A: Limbo. B: Epiderme da face adaxial (Ed). C: Epiderme da face abaxial (Eb). D: Parênquima paliçádico (Pp). Parênquima lacunoso (Pl). As barras verticais indicam o desvio padrão.

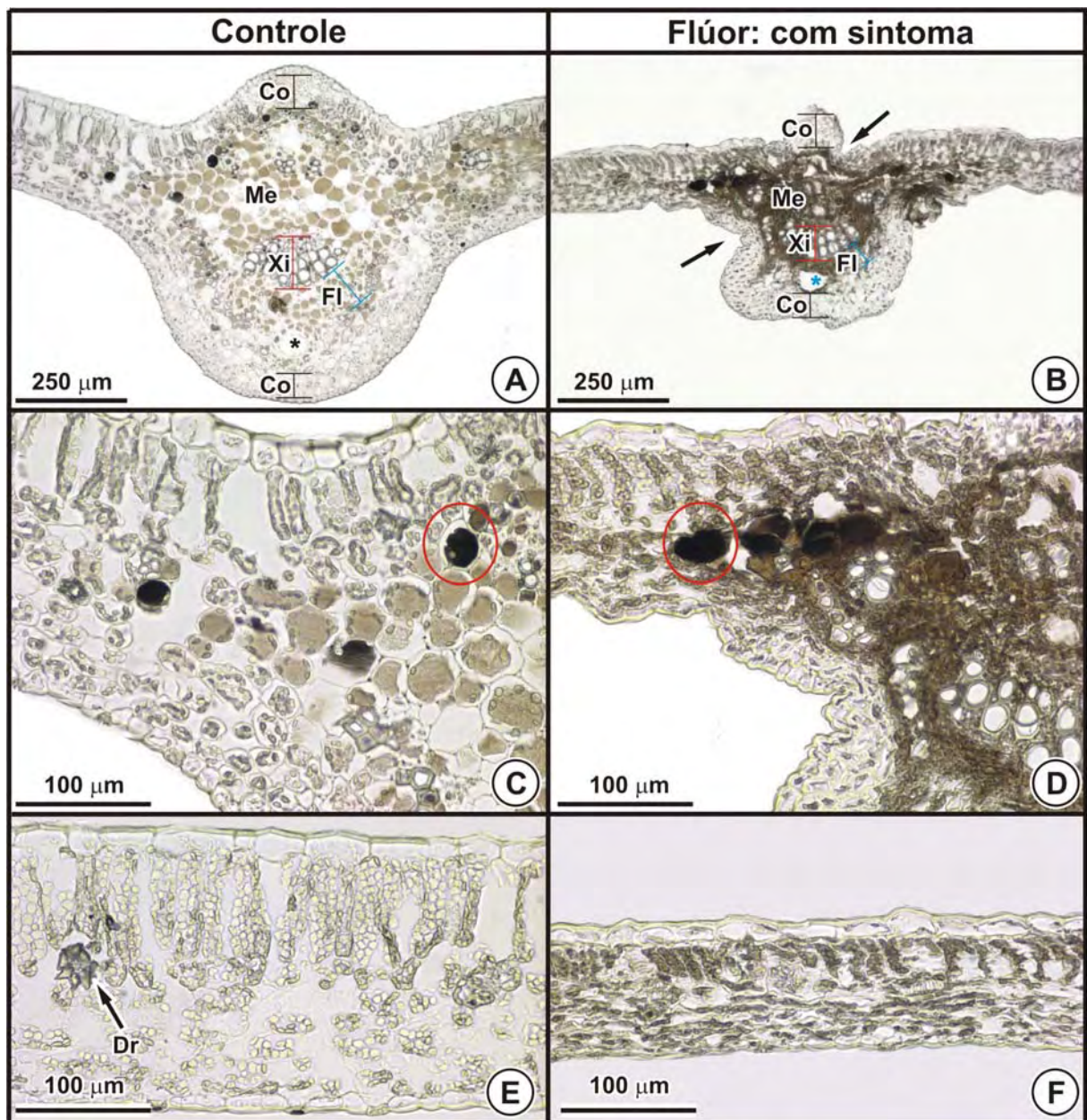


Figura 4. Detecção histoquímica de compostos fenólicos com formalina em sulfato ferroso na porção basal de folíolos de *Spondias dulcis* (secção transversal em microscopia de luz) no tratamento controle (A, C e E) e com sintomas, quando expostos a 5 mg L^{-1} de flúor (B, D e F), após 19 simulações de nevoeiro. A-D: Nervura mediana. A: Feixe vascular colateral, medula parênquimática com células volumosas (Me) e colênquima subepidérmico (Co). B: Plasmólise expressiva das células parênquimáticas do floema (Fl) e formação de depressões (→) em ambas as superfícies do folíolo. C-D: Reação positiva para compostos fenólicos (○) nas células parênquimáticas. E-F: Região intermediária do folíolo. E: Idioblastos cristafíferos contendo drusas (Dr) no mesofilo. F: Redução expressiva na espessura do mesofilo: células parênquimáticas totalmente colapsadas. Abreviatura: * (ducto secretor) e Xi (xilema).

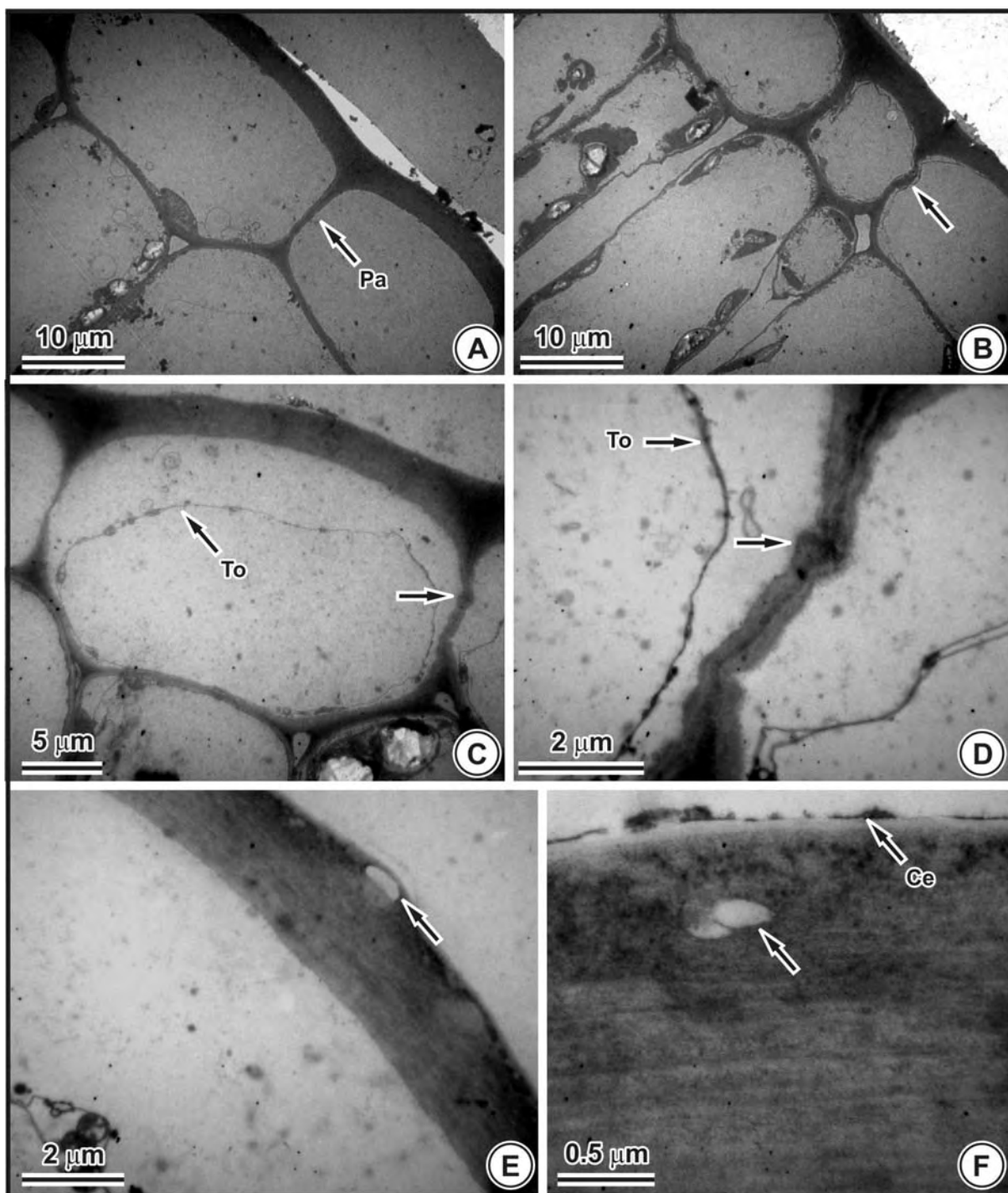


Figura 5. Células da epiderme da face adaxial de folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A) e, quando expostos a 5 mg L^{-1} de flúor, sem sintoma visível (B) e adjacente a necrose (C-F), após 19 simulações de nevoeiro. A: Parede anticlinal (Pa) retilínea. B: Parede anticlinal deformada ($\rightarrow$). C: Parede anticlinal deformada ($\rightarrow$) e tonoplasto (To) não periférico. D: Detalhe de C: tonoplasto elétron-denso. E-F: Formação de zonas claras ($\rightarrow$) na parede periclinal externa e ceras epicuticulares (Ce) elétron-densas.

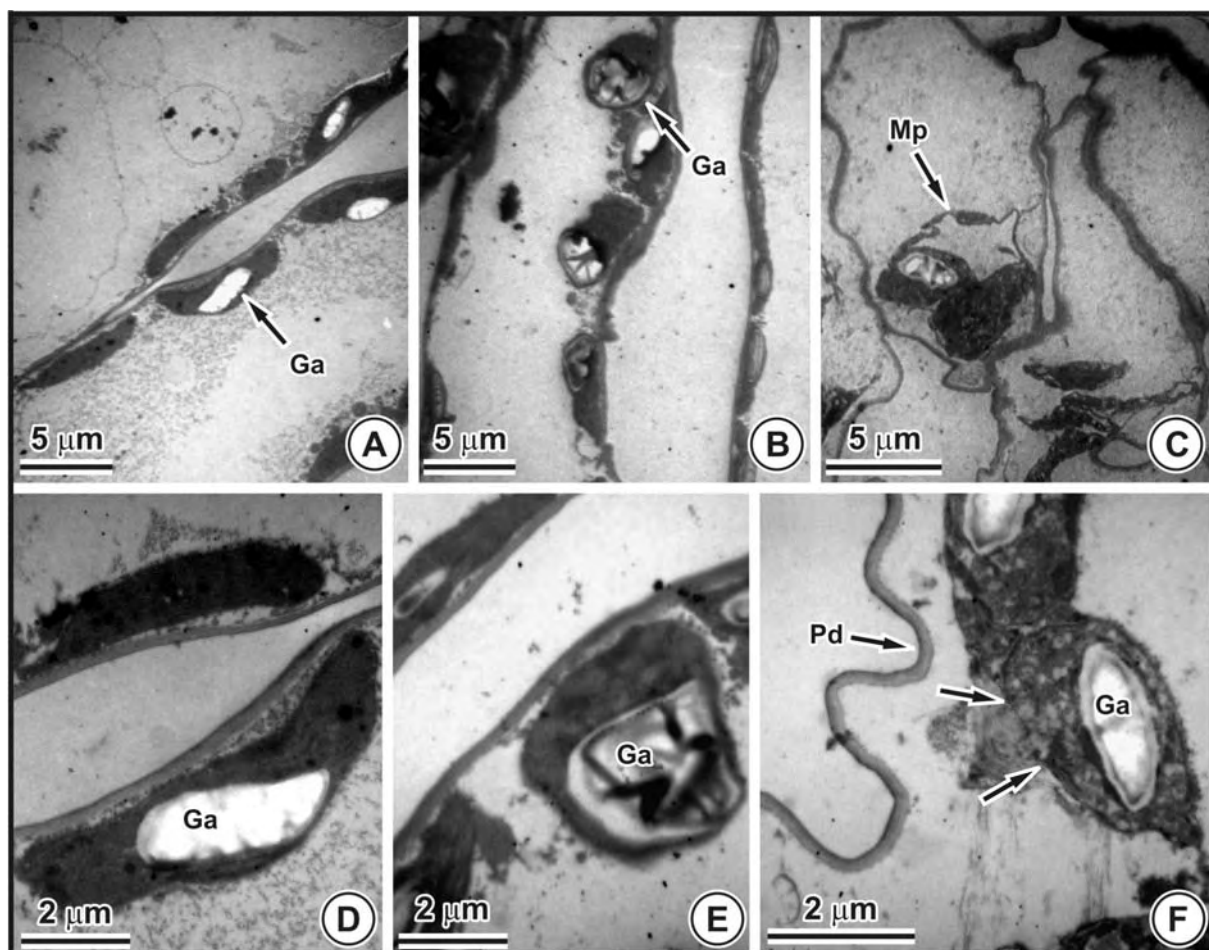


Figura 6. Células do parênquima paliádico de folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A e C) e, quando expostos a 5 mg L⁻¹ de flúor, sem sintoma (B e D) e adjacente a necrose (C, E-F), após 19 simulações de nevoeiro. A: Grão de amido (Ga) lenticular. B: Grão de amido (Ga) arredondado. C: Retração da membrana plasmática (Mp). D: Cloroplasto periférico. E: Grão de amido (Ga) arredondado. F: Parede deformada (Pd) e ruptura da dupla membrana do cloroplasto (→).

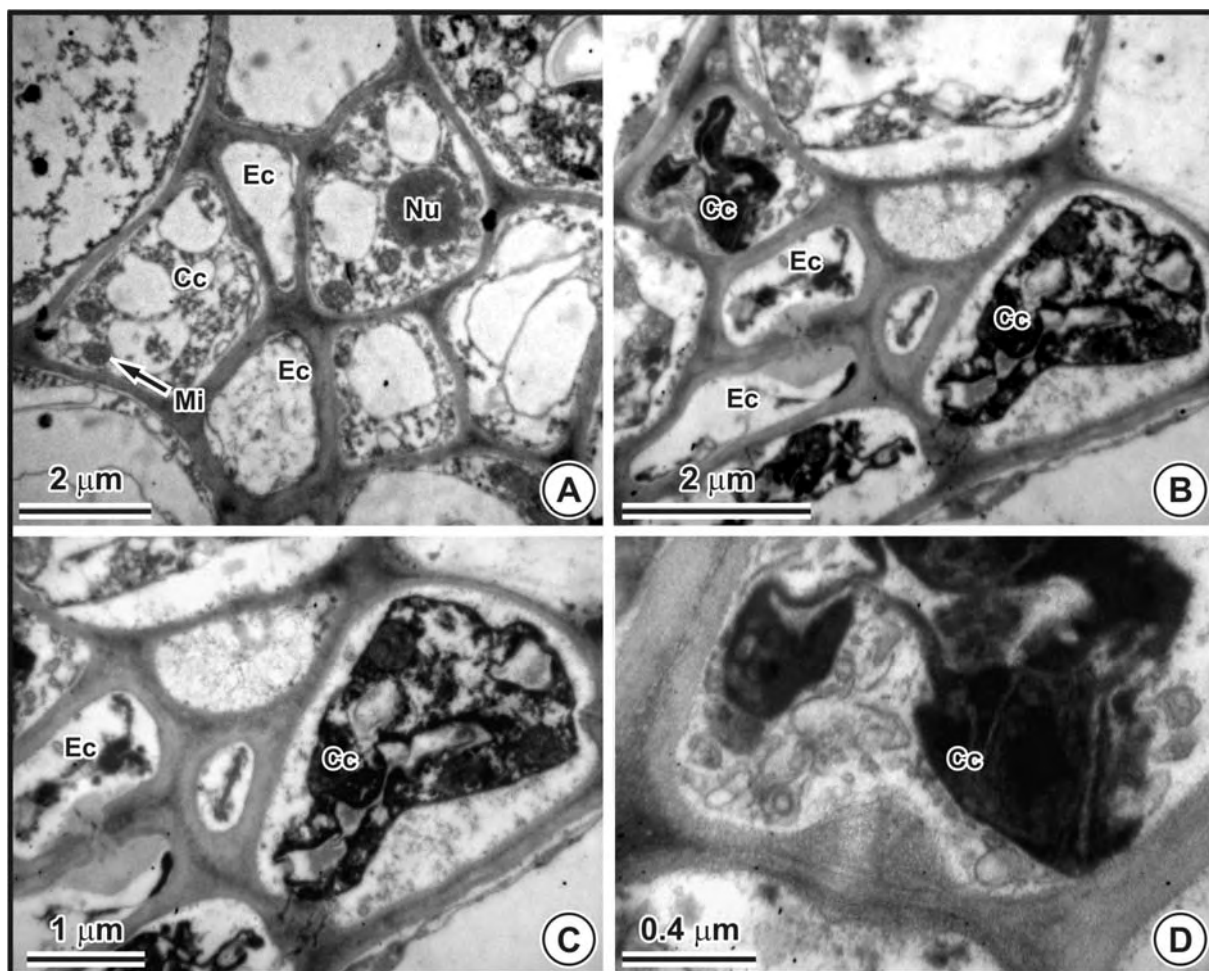


Figura 7. Células do floema de folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A) e sem sintomas (B-D) quando expostos a 5 mg L^{-1} de flúor, após 19 simulações de nevoeiro. A: Células companheiras (Cc) com núcleo evidente (Nu) e numerosas mitocôndrias (Mi). B. Aglomeração dos conteúdos celulares em massas escuras nas Cc. C e D: Detalhes de B. Abreviaturas: Ec (Elemento de tubo crivado).

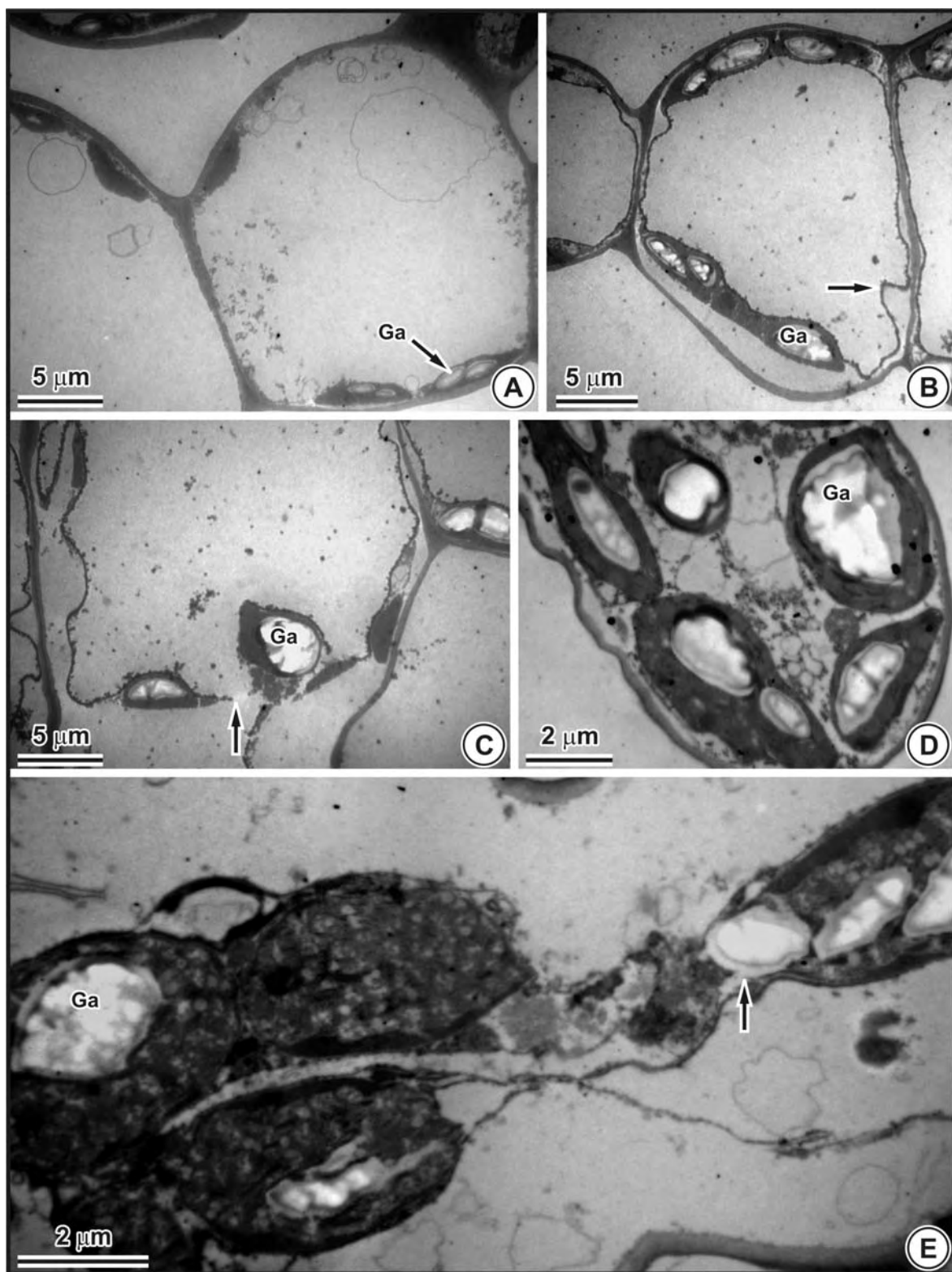


Figura 8. Células do parênquima lacunoso de folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A) e, quando expostos a 5 mg L^{-1} de flúor, sem sintoma (B-C) e adjacente a necrose (D-E), após 19 simulações de nevoeiro. A: Grãos de amido (Ga) lenticulares. B: Grãos de amido (Ga) arredondados e tonoplasto mais elétron-denso (→). C: Ruptura do tonoplasto (→). D: Cloroplastos dilatados. E: Ruptura da dupla membrana do cloroplasto (→).

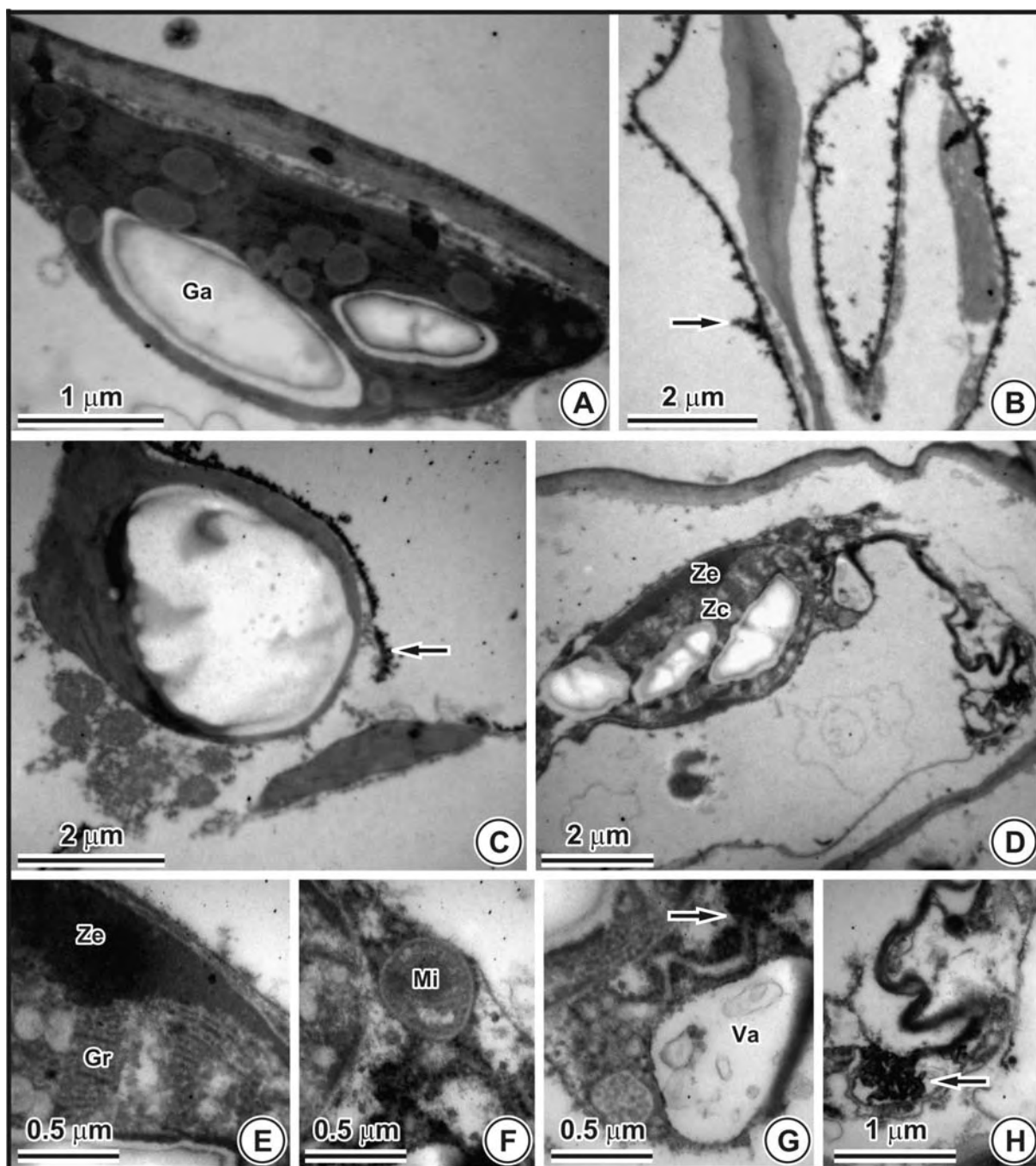


Figura 9. Células do parênquima lacunoso de folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A) e, quando expostos a 5 mg L^{-1} de flúor, sem sintoma (B-C) e adjacente a necrose (D-H), após 19 simulações de nevoeiro. A: Cloroplasto lenticular com grãos de amido (Ga). B: Membrana plasmática mais elétron-densa ($\rightarrow$). C: Ruptura do tonoplasto ($\rightarrow$). D: Cloroplastos com os tilacóides desestruturados apresentando zonas escuras (Ze) e claras (Zc). E: Detalhe da figura D: Grana (Gr) evidentes na Zc e ausentes na Ze. F: Mitocôndria (Mi) sem cristas nítidas. G-H: Vacúolo (Va) e aglomeração dos conteúdos celulares em massas escuras ($\rightarrow$).

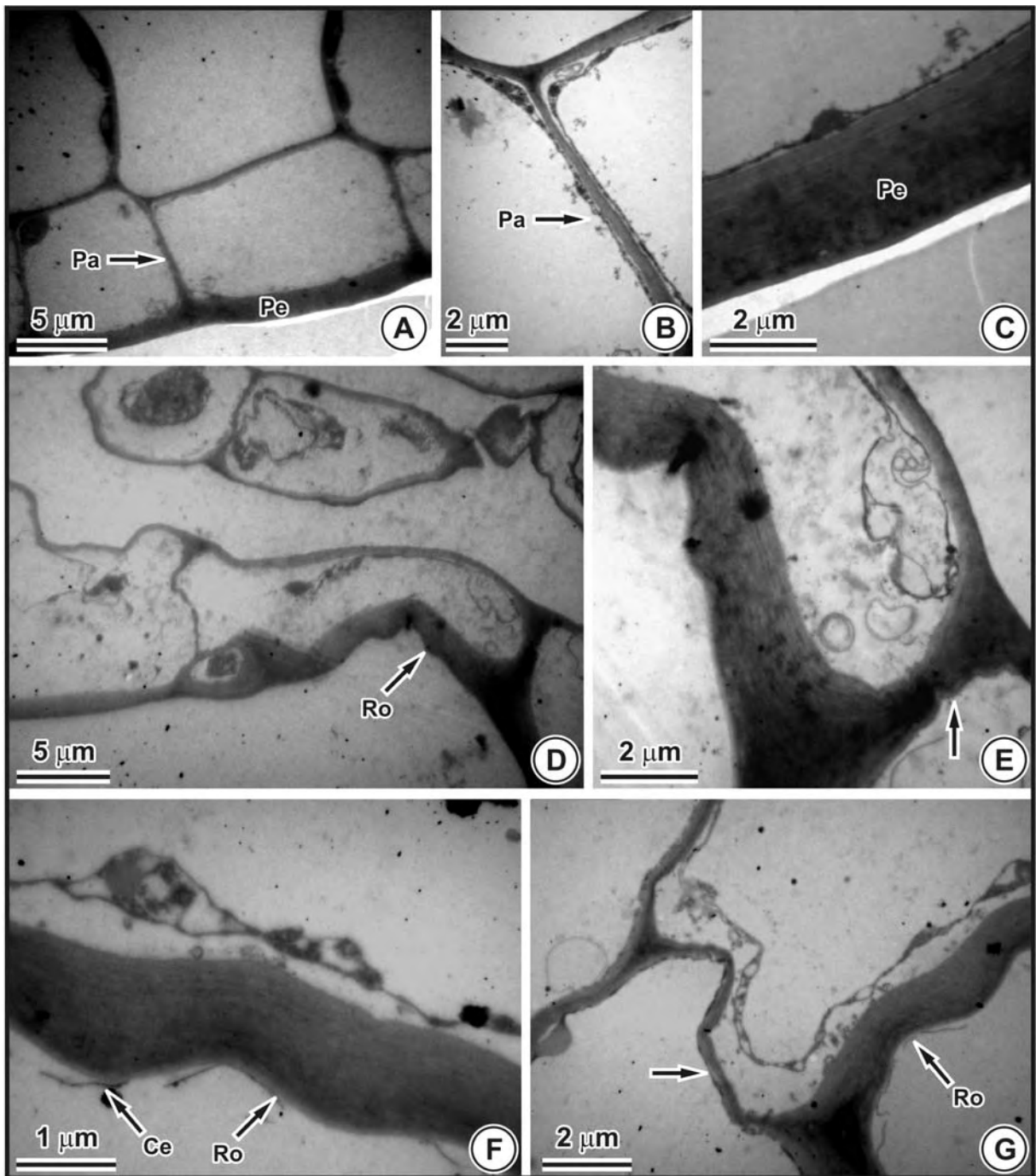


Figura 10. Células da epiderme da face abaxial de folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A-C) e, quando expostos a 5 mg L^{-1} de flúor, sem sintoma (D-E) e adjacente a necrose (F-G), após 19 simulações de nevoeiro. A: Paredes anticlinal (Pa) e periclinal externa (Pe) das células epidérmicas retilíneas. B: Detalhe de A: parede anticlinal. C: Detalhe de A: Parede periclinal externa. D: Parede periclinal externa com relevo ondulado (Ro). E: Parede anticlinal deformada ($\rightarrow$). F: Ceras epicuticulares (Ce) elétron-densas e parede periclinal externa com relevo ondulado (Ro). G: Parede anticlinal deformada ($\rightarrow$) e parede periclinal externa ondulada ($\rightarrow$).

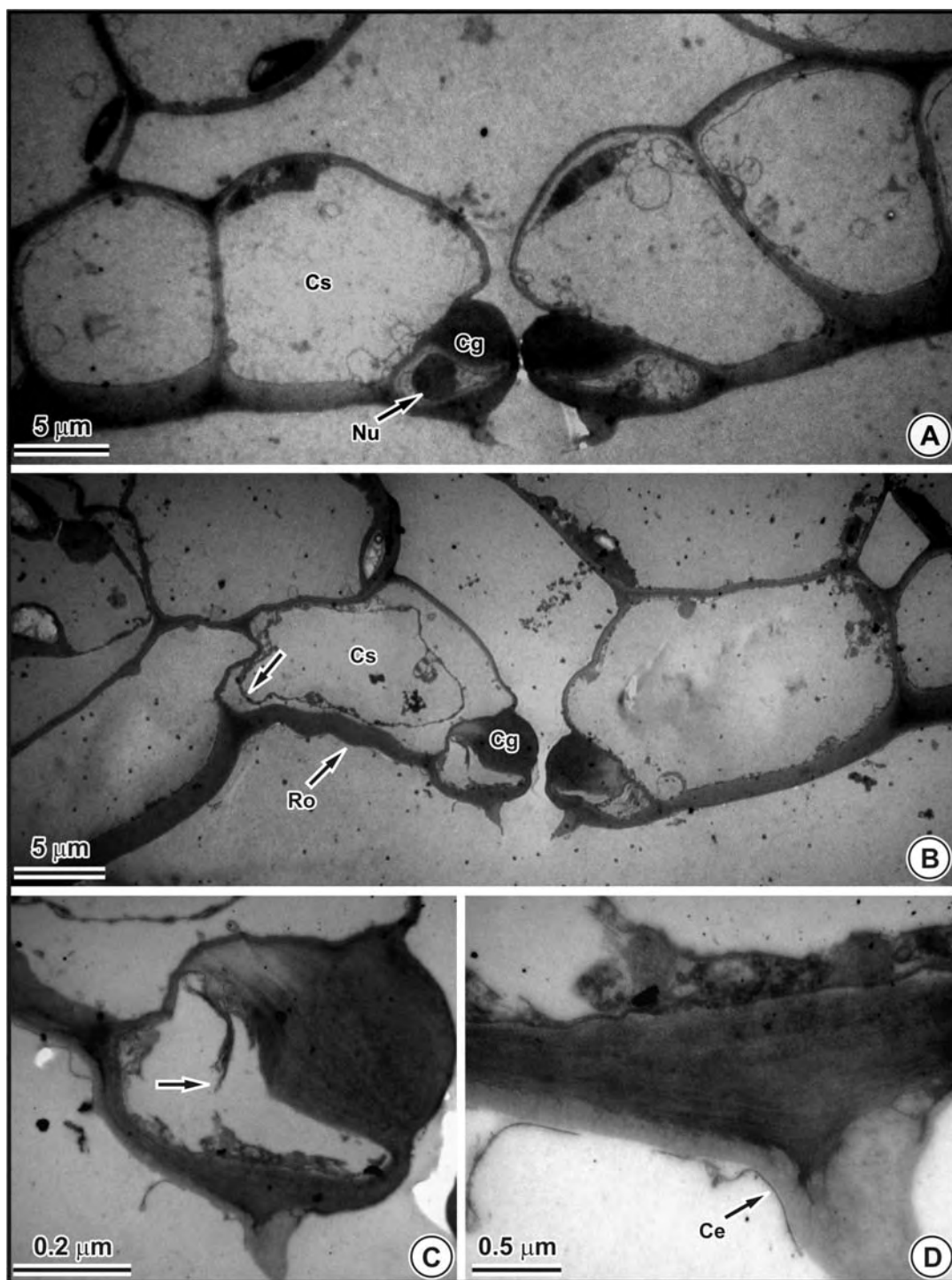


Figura 11. Células estomáticas de folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A) e, quando expostos a 5 mg L⁻¹ de flúor, sem sintoma (B-D), após 19 simulações de nevoeiro. A: Célula-guarda (Cg) com núcleo volumoso (Nu). B: Célula subsidiária plasmolizada, com membrana plasmática elétron-densa (→), parede anticlinal deformada e relevo da parede periclinal externa ondulado (Ro). C-D. Detalhes de B. C: Aspecto fibrilar da parede (→). D: Ceras epicuticulares (Ce) elétron-densas na parede periclinal externa das células-guarda.

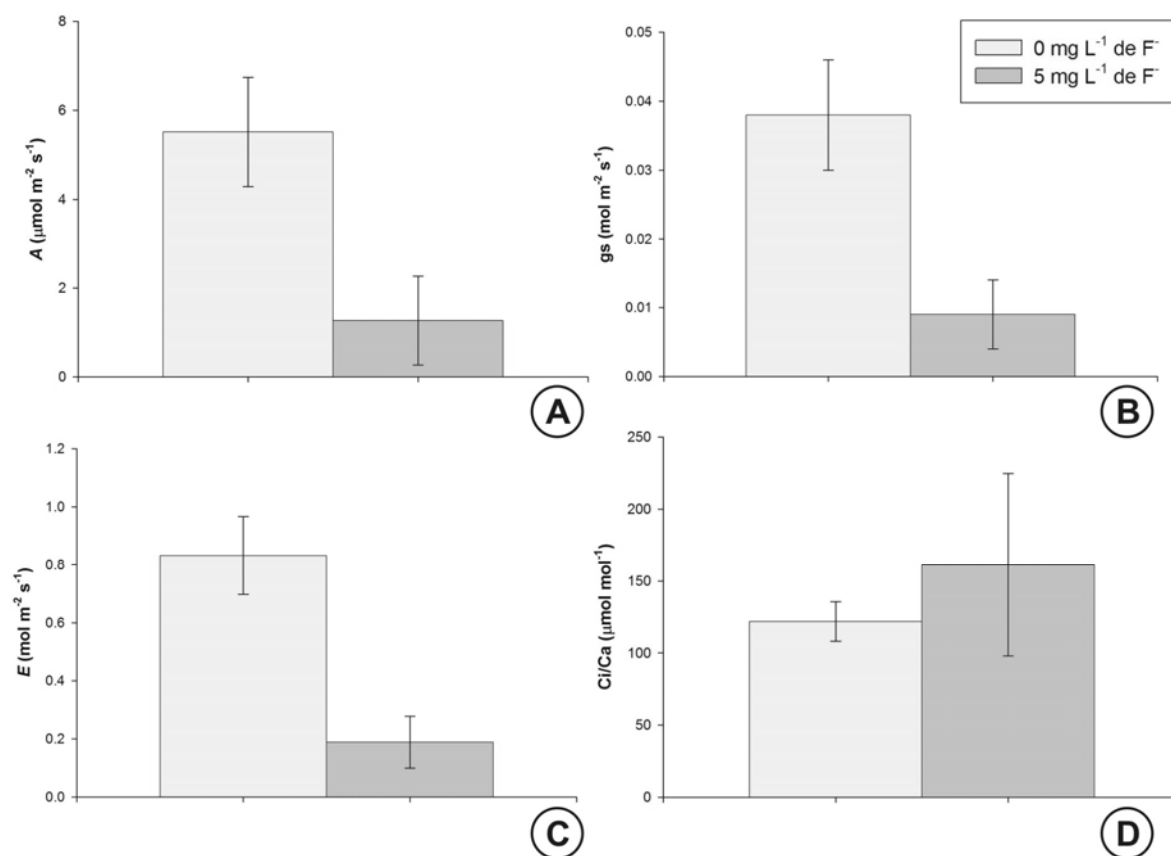


Figura 12. Trocas gasosas de folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. no tratamento controle e quando expostos a 5 mg L⁻¹ de flúor (folíolos sem sintomas), após 19 simulações de nevoeiro. A: Taxa de assimilação de CO₂ (A). B: Condutância estomática (gs). C: Taxa de transpiração (E). D. Concentração interna de CO₂ (Ci). As barras verticais indicam o desvio padrão.

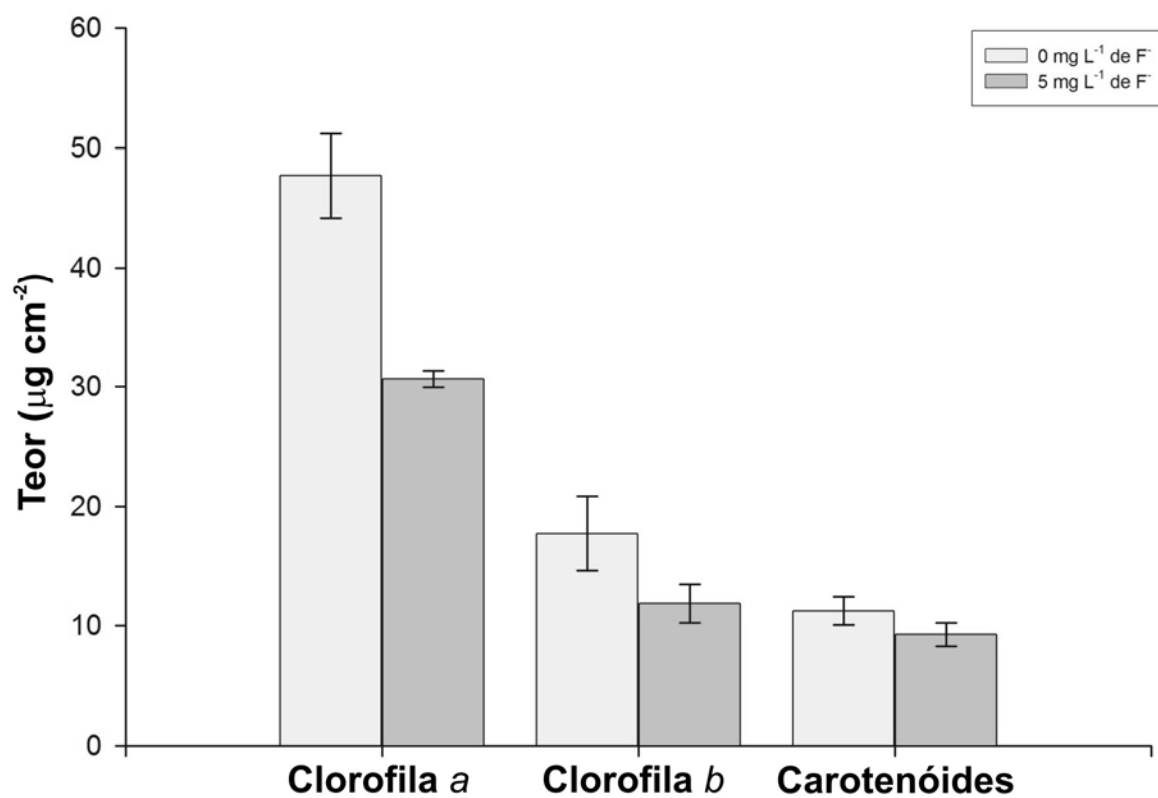


Figura 13. Teor de pigmentos fotossintéticos em folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. no tratamento controle e quando expostos a 5 mg L⁻¹ de flúor (folíolos sem sintomas), após 19 simulações de nevoeiro. As barras verticais indicam o desvio padrão.

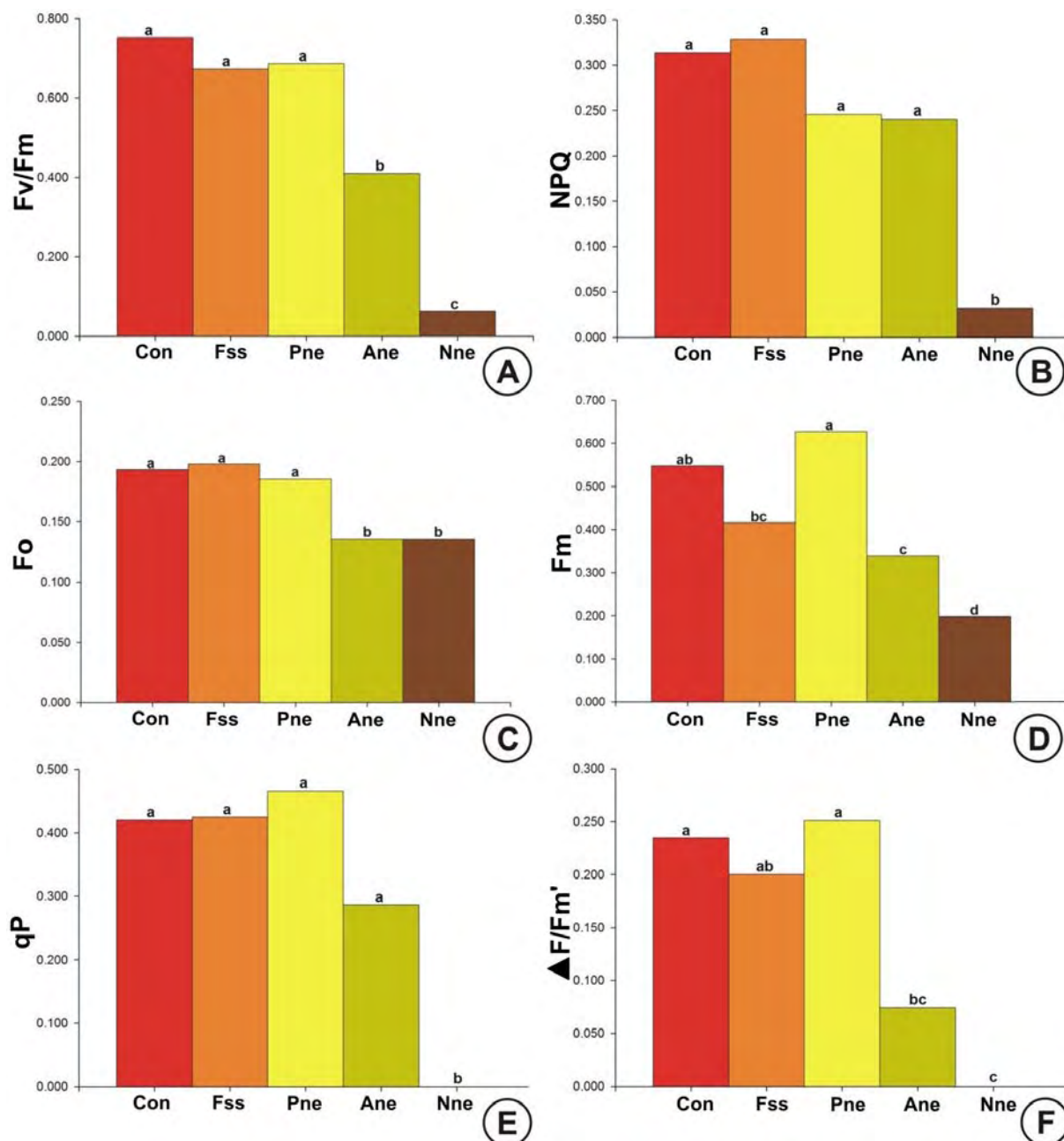


Figura 14. Parâmetros da fluorescência da clorofila *a* em folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. no tratamento controle (Con) e, quando expostos a 5 mg L⁻¹ de flúor, sem (FSS) e com sintoma (perto/Pne, adjacente/Ane e na necrose/Nne), após 19 simulações de nevoeiro. A: Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm). B: Coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ). C: Rendimento de fluorescência mínima (Fo). D: Rendimento de fluorescência máxima (Fm). E: Coeficiente de extinção fotoquímica (qp). F: Rendimento quântico efetivo (ΔF/Fm'). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, quando comparadas pelo teste de Tukey, a 5%.

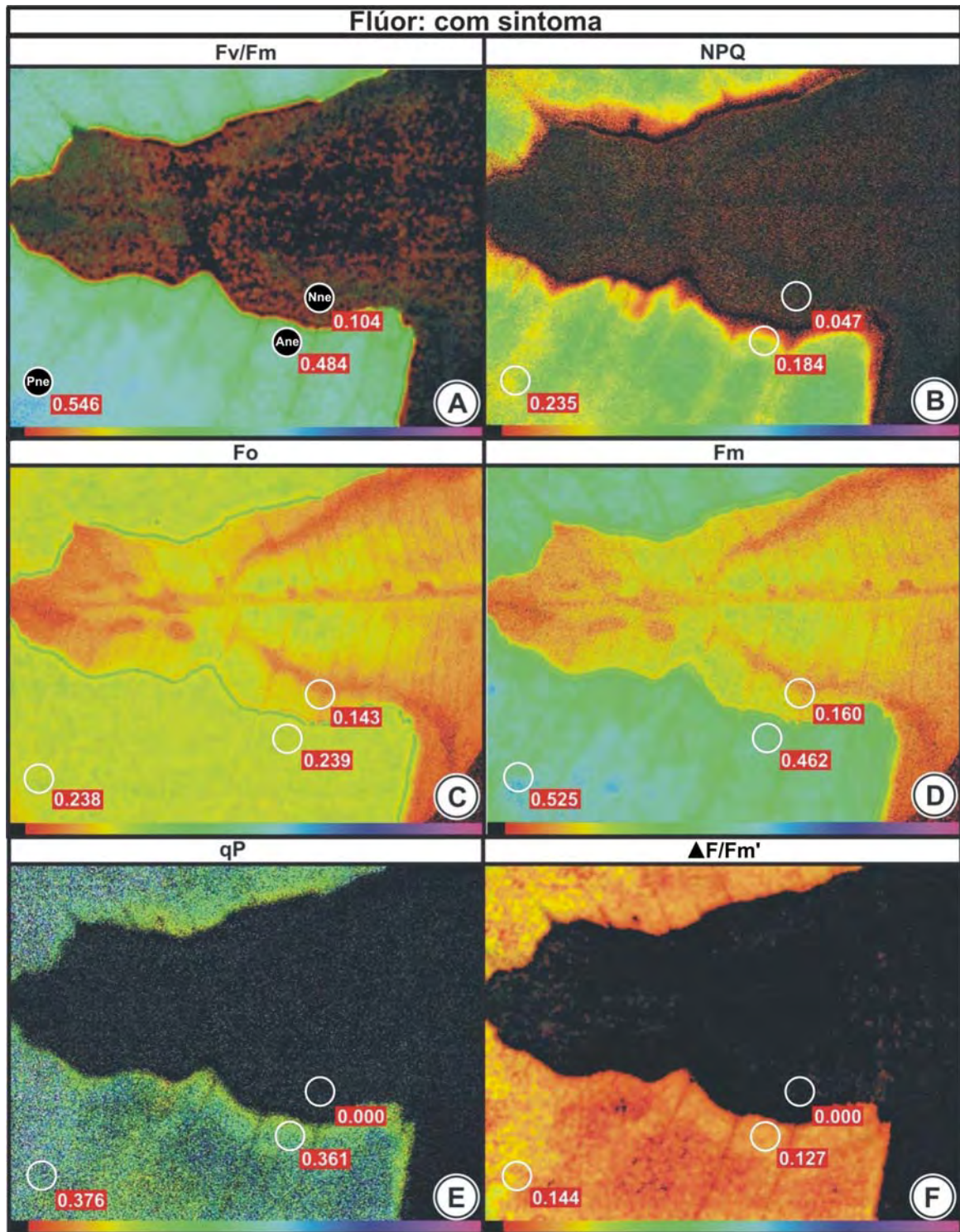


Figura 15. Fluorescência de imagem de folíolos de *Spondias dulcis* Forst. F. perto (Pne), adjacente (Ane) e na necrose (Nne), após 19 dias consecutivos de nevoeiro simulado com flúor (5 mg L^{-1}). A: Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm). B: Coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ). C: Rendimento de fluorescência mínima (Fo). D: Rendimento de fluorescência máxima (Fm). E: Coeficiente de extinção fotoquímica (qP). F: Rendimento quântico efetivo ($\Delta F/Fm'$).

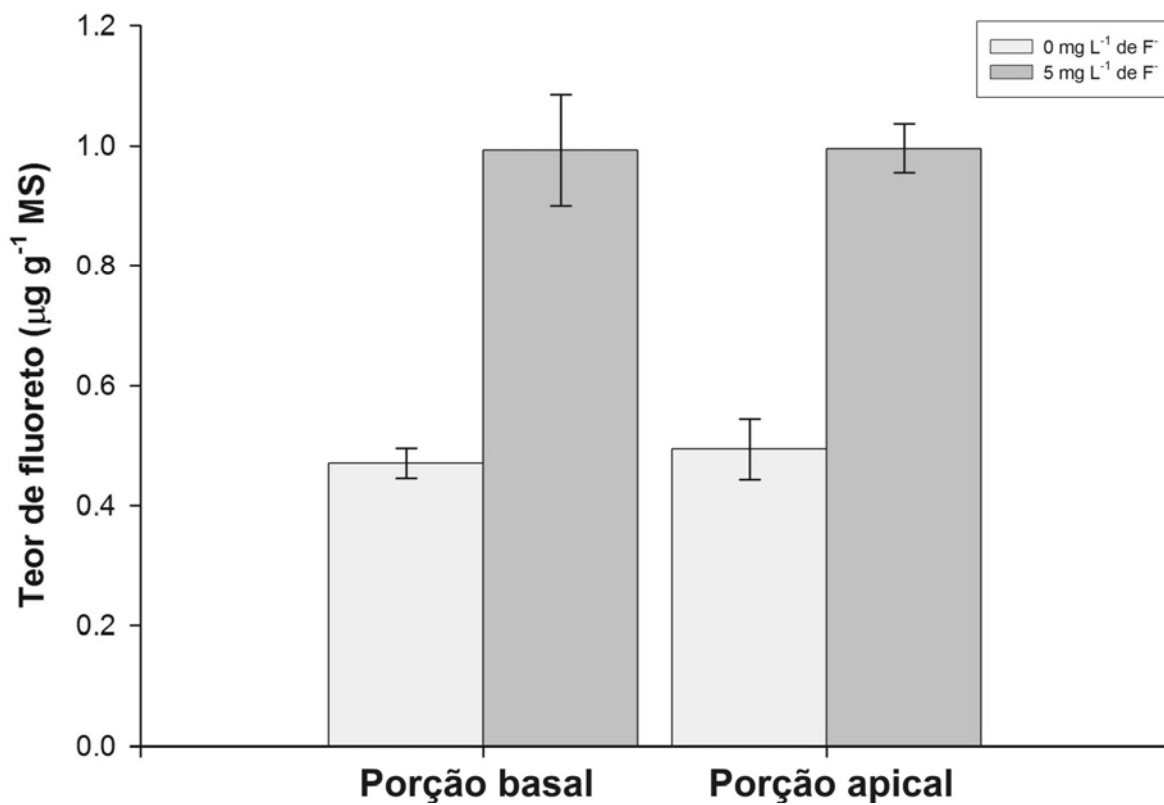


Figura 16. Teor de fluoreto ($\mu\text{g g}^{-1}$ de matéria seca-MS) de folhas em desenvolvimento (porção apical da planta) e expandidas (porção basal da planta) de *Spondias dulcis* Forst. F, após 19 dias consecutivos de nevoeiro simulado. As barras verticais indicam o desvio padrão.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, constatou-se que os danos microscópicos ocorrem em folhas com teores de flúor insuficientes para ocasionar danos visuais, tanto em campo quanto em laboratório, os quais antecedem o surgimento de necroses, que apresentam coloração típica e têm início na base de folíolos em expansão. Algumas peculiaridades relacionadas à forma como o flúor é absorvido foram observadas. Em campo, na forma gasosa, o flúor penetrou principalmente através dos estômatos, ocasionando os primeiros danos na face abaxial, sendo mais severos do que na face adaxial. Contudo, danos na face adaxial também ocorreram, já que o flúor particulado pode ser dissolvido pelo orvalho e penetrar através da cutícula. Em laboratório, dissolvido, o flúor causou danos similares em ambas as faces e as paredes celulares foram mais afetadas do que no campo.

Em todos os experimentos, a maior parte dos danos estava associada aos estômatos, contudo, em laboratório, as análises fisiológicas, avaliadas em conjunto com as microscópicas, levam a concluir que a redução observada na fotossíntese não é consequência direta de um componente difusional, mas provavelmente de um componente metabólico. O flúor não é capaz de interferir nas reações luminosas da fotossíntese em concentrações abaixo da capaz de ocasionar sintomas em *S. dulcis*. Os cloroplastos foram as organelas mais afetadas, além da alteração no formato, o acúmulo de grãos de amido foi marcante, tanto no campo quanto em laboratório. A ocorrência de células do floema com citoplasma colapsado sugere que o fluxo de carboidratos das folhas para as raízes seja interrompido, o que pode ser a causa do acúmulo de amido observada nos cloroplastos e fornece indícios de que o flúor atue como acelerador do processo de senescência foliar.

Os resultados obtidos permitem afirmar que *S. dulcis* é uma excelente bioindicadora de reação. A espécie é adaptada ao clima tropical, de fácil manejo e muito sensível a concentrações baixas do poluente, desenvolvendo sintomatologia típica. Adicionalmente, o emprego de técnicas microscópicas mostrou-se adequado para assegurar a diagnose correta e também possui valor prognóstico, já que em folhas aparentemente saudáveis, danos estruturais, micromorfológicos, ultra-estruturais e fisiológicos foram observados e, a maior parte deles, foi similar ao observado em laboratório sendo, desta forma, indicados como biomarcadores da presença de flúor como, por exemplo, as análises micromorfológicas, estruturais, ultra-estruturais e fisiológicas. A análise morfoanatômica, associada aos dados fisiológicos, efetivamente auxiliou na interpretação dos danos causados pelo flúor em *S. dulcis*.