

**LUZIMAR CAMPOS DA SILVA**

**AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS  
DOS EFEITOS DE POLUENTES ATMOSFÉRICOS SOBRE  
ESPÉCIES VEGETAIS DE RESTINGA.**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção do  
título de *Doctor scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003**

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

T

S586a  
2003

Silva, Luzimar Campos da, 1971-

Avaliações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas dos efeitos de poluentes atmosféricos sobre espécies vegetais de restinga / Luzimar Campos da Silva. – Viçosa : UFV, 2003.

109p. : il.

Orientador: Marco Antonio Oliva Cano

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Plantas das restingas - Poluição. 2. Plantas das restingas - Aspectos ambientais. 3. Ecofisiologia vegetal. 4. Monitoramento biológico. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 581.526325

CDD 20.ed. 581.526325

LUZIMAR CAMPOS DA SILVA

**AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS  
DOS EFEITOS DE POLUENTES ATMOSFÉRICOS SOBRE  
ESPÉCIES VEGETAIS DE RESTINGA.**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção do  
título de *Doctor scientiae*.

APROVADA: 12 de setembro de 2003.

---

Aristéa Alves Azevedo  
(Conselheiro)

---

José Cambraia  
(Conselheiro)

---

Rosane Maria Aguiar Euclides

---

Marco Aurélio Pedron e Silva

---

Marco Antonio Oliva Cano  
(Orientador)

*Dedico ao Álvaro, pela paciência, pelas inúmeras colaborações ao trabalho, pelo amor.*

*Aos filhos, Guilherme e Gustavo, motivos de alegria nos dias difíceis ao longo do curso, pelos imensos carinho e amor, pelos dias de mãe ausente.*

*Aos meus pais, pelo incentivo e confiança.*

*A Zezé, pelo incentivo e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

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

À Coordenação da Pós Graduação em Fisiologia Vegetal e aos professores deste, que resultaram na minha formação e neste trabalho.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A SAMARCO Mineradora pelo apoio técnico, financeiro e de infra-estrutura.

À Secretaria de Meio Ambiente do Espírito Santo, pela licença concedida para a realização da pesquisa no Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV).

Ao professor Marco Antônio Oliva Cano, pela orientação, pela confiança e pela amizade prestados ao longo do curso.

À professora Aristéa Alves Azevedo, pela amizade e pelos valiosos ensinamentos durante o curso.

Ao professor José Cambraia, pelas inúmeras colaborações durante este trabalho.

À professora Rosane Maria Aguiar pela colaboração nas avaliações ao microscópio eletrônico de varredura e pela amizade.

Ao professor João Marcos Araújo, do Departamento de Biologia Geral da UFV, pelas valiosas colaborações durante a execução das técnicas anatômicas e pela amizade.

Ao professor Marco Aurélio Pedron e Silva, pelas sugestões na banca de defesa.

Ao professor Clóvis Andrade Neves, do Departamento de Biologia Geral da UFV, pela colaboração e sugestões durante a realização do teste histoquímico.

Aos professores do Setor de Anatomia Vegetal da UFV, Renata Maria Strozi Alves Meira, Wagner Campos Otoni e Marília Contin Ventrela, pelas colaborações, sobretudo nas trocas de aulas, que viabilizaram a conclusão deste trabalho.

A todos os demais professores envolvidos na minha formação.

A Kacilda pelas traduções dos resumos da tese, pela colaboração durante algumas análises e principalmente pela amizade e incentivo.

A Celice, pela colaboração durante as avaliações na casa de vegetação, pelo estímulo e pela amizade.

Ao Francisco Lobo, pela ajuda na realização das análises estatísticas.

Aos colegas de curso, Ludimila, Alan, Karla, Carmen, Letícia, Silvane, entre outros, pelo agradável convívio e pela amizade, que vai deixar saudades.

A Rosane Cruz Portugal, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela amizade, pelo apoio e pela cooperação durante todo o curso.

A Rogério Mauro Gomide e João Bosco Soares de Freitas, funcionários do Setor de Ecofisiologia Vegetal da UFV, pela grande ajuda na realização deste trabalho, em especial ao Rogério pelas coletas dos dados de campo durante a fase em que estava amamentando.

A José Antônio Bhering, técnico do Laboratório de Biofísica, pelas colaborações durante as avaliações enzimáticas, e pela paciência.

Aos funcionários do Laboratório de Meio Ambiente da Limnos – Ubu, Pietra, Andréia, Anderson, José Luiz, Camila e Nelson, pelo agradável convívio.

Ao Luiz Santana, funcionário da TRANSMÁQUINAS, responsável pelo viveiro da SAMARCO, pela colaboração durante a execução dos trabalhos de campo.

Ao Álvaro, pelas imensuráveis colaborações prestadas ao longo de todo o curso, que viabilizaram este trabalho.

À vovó Zezé, peça fundamental durante a realização deste trabalho, pelo zelo e carinho prestados ao Guilherme, que tinha apenas três meses quando iniciei o curso, e a Gustavo, nascido durante o período de experimentos de tese.

À minha família, pela confiança e pelo incentivo muitas vezes necessário.

# ÍNDICE

Página

LISTA DE MAPAS, TABELAS, QUADROS E FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Bibliografia.....	3
CAPÍTULO I: Efeito da deposição particulada do ferro metálico e do dióxido de enxofre em <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Clusia hilariana</i> , visando biomonitoramento ativo.....	6
Resumo.....	6
Summary.....	7
Introdução.....	8
Material e métodos.....	9
Resultados.....	14
<i>Caracterização da Área de Estudo.....</i>	14
<i>Ação combinada da deposição de ferro metálico e SO<sub>2</sub>.....</i>	17
Discussão e Conclusões.....	30
Bibliografia.....	35
CAPÍTULO 2: Ação da chuva ácida sobre <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Clusia hilariana</i> .....	38
Resumo.....	38
Summary.....	39
Introdução.....	40
Material e métodos.....	41
Resultados.....	45
<i>Avaliações do crescimento e fitotoxicidez.....</i>	45
<i>Avaliações bioquímicas e fisiológicas.....</i>	45
<i>Alterações morfológicas e micromorfológicas apresentadas por E. uniflora expostas à chuva ácida.....</i>	48
<i>Alterações morfológicas e micromorfológicas apresentadas por C. hilariana expostas à chuva ácida.....</i>	53
Discussão e Conclusões.....	57
Bibliografia.....	61
CAPÍTULO 3: Biomonitoramento passivo das emissões de ferro particulado e SO <sub>2</sub> com espécies vegetais de restinga.....	67
Resumo / Summary.....	67
Introdução.....	69
Material e métodos.....	69
Resultados.....	72
Detecção histoquímica do ferro Particulado.....	91
Discussão e Conclusões.....	99
Bibliografia.....	105
CONCLUSÕES GERAIS.....	107

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Página

<b>CAPÍTULO I: Efeito da deposição particulada do ferro metálico e do dióxido de enxofre em <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Clusia hilariana</i>, sob biomonitoramento ativo .....</b>	<b>6</b>
Figura 1- Mapa indicando a região da fonte emissora (usina de pelotização) e as estações de biomonitoramento ativo.....	11
Tabela 1- Localização geográfica da fonte emissora (usina de pelotização) e das estações de amostragem.....	12
Figura 2- Dados climatológicos da área em estudo no período da exposição ativa. ....	15
Figura 3- Emissões da usina de mineração.....	16
Figura 4- A- Deposição de ferro; B- Teor de ferro total; C- Teor de enxofre total em folha de <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> as diferentes distâncias da fonte emissora.....	18
Figura 5- Número de folhas de plantas de <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> expostas às emissões da usina durante sete meses.....	19
Figura 6- Número de folhas cloróticas em <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> , expostas às emissões da usina por sete meses.....	20
Figura 7 - Folhas cloróticas em <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> expostas às emissões da usina por sete meses.....	22
Figura 8- Índice de fitotoxicidade de clorose em <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> , expostas às emissões da usina por sete meses.....	23
Figura 9- Número de folhas necrosadas em <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> expostas às emissões da usina por sete meses.....	24
Figura 10- Folhas necrosadas em <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> expostas às emissões da usina por sete meses.....	25
Figura 11- Teor de clorofila (índice SPAD) em <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> expostas às emissões da usina por sete meses.....	27
Figura 12- Permeabilidade iônica total em <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> expostas às emissões da usina por sete meses.....	28
Figura 13- Relações entre trocas gasosas com distâncias da fonte emissora, em <i>E. uniflora</i> e <i>C. hilariana</i> expostas às emissões da usina por sete meses.....	29

Tabela 2- Comparação entre a condutância estomática, a transpiração e a fotossíntese em plantas de *E. uniflora* e *C. hilariana* com menor e maior acúmulo de ferro nos tecidos vegetais.....31

Figura 14- Trocas gasosas em função do teor de enxofre foliar, em *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas às emissões da usina por sete meses.....32

## **CAPÍTULO 2: Ação da chuva ácida sobre *Eugenia uniflora* e *Clusia hilariana*.....38**

Quadro 1- Característica do solo coletado na fazenda da usina de pelotização e usado no experimento de chuva ácida (pH 3,0).....42

Figura 1- Efeito da deposição ácida em *Eugenia uniflora* e *Clusia hilariana* sobre a altura das mudas e o índice de fitotoxicidade de necrose.....46

Tabela 1- Condutância estomática, transpiração, assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, relação CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> externo, clorofila a, clorofila b, caroteno e razão F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, medidos após 40 dias de chuva simulada em *E. uniflora* e *C. hilariana*.....47

Figura 2- Efeito da chuva ácida sobre a permeabilidade de membranas de *E. uniflora* e *C. hilariana*.....48

Figura 3- Atividade da dismutase do superóxido, da peroxidase e da catalase em *E. uniflora* e *C. hilariana*.....49

Figuras 4 a 11- Cortes transversais da lâmina foliar de *Eugenia uniflora* observados ao microscópio fotônico.....50

Figuras 12 a 19- Alterações na superfície foliar de *E. uniflora* em resposta à chuva ácida (eletromicrografia de varredura) .....52

Figuras 20 a 29- Cortes transversais de *Clusia hilariana* em resposta à chuva ácida pH 3,0.....54

Figuras 30 a 37- Alterações na superfície da folha de *C. hilariana* em resposta à chuva ácida (eletromicrografia de varredura).....56

## **CAPÍTULO 3: Biomonitoramento passivo das emissões de ferro particulado e SO<sub>2</sub> com espécies vegetais de restinga.....67**

Figura 1- Dados climatológicos da área em estudo no período da exposição ativa.....73

Tabela 1- Característica química e física dos solos. **A** - Coletado no Parque Estadual Paulo César Vinha. **B** - Coletado na mata da usina de pelotização.....74

Figura 2- Emissões da usina de pelotização no período do experimento de bioindicação passiva.....75

Figura 3- Teor de ferro foliar em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> , nos locais expostos e não expostos às emissões da usina.....	76
Figura 4- Teor de enxofre foliar em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> , nos locais de coleta dos dados.....	77
Figura 5- Temperatura da massa foliar de <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> expostas e não-expostas às emissões da usina.....	78
Figura 6- Diferença de temperatura entre o ar e a planta em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> nos locais não-expostos e expostos às emissões da usina.....	80
Figura 7- Diferença de temperatura entre o ar e a planta em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> nos diferentes meses e locais expostos e não-expostos às emissões da usina.....	81
Figura 8- Número de folhas em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> nos locais de coleta e na interação entre meses e locais de coleta em <i>P. guineense</i> .....	82
Figura 9- Lançamento de novas folhas em <i>B. sericea</i> e <i>P. guineense</i> nos meses de coleta; em <i>B. sericea</i> , nos locais não-expostos e expostos às emissões da usina.....	83
Figura 10- Lançamento de folhas novas em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> na interação entre mês e local de coleta.....	84
Figura 11- Folhas cloróticas em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> nos diferentes meses de coleta.....	85
Figura 12- Folhas cloróticas em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> nos locais de coleta.....	86
Figura 13- Índice de fitotoxicidade de clorose em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> nos meses de coleta.....	87
Figura 14- Índice de fitotoxicidade de necrose em <i>B. sericea</i> e em <i>P. guineense</i> em relação aos locais de coleta e em <i>P. guineense</i> na interação entre os meses e os locais de coleta.....	88
Figura 15- Folhas necrosadas em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> nos diferentes meses de coleta.....	89
Figura 16- Folhas necrosadas em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> nos diferentes locais de coleta.....	90
Figura 17- Folhas necrosadas em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> nas interações entre os meses e locais de coleta.....	92

Figura 18- Índice de fitotoxicidade de necrose em <i>C. verbenacea</i> , nos meses de coleta e em <i>P. guineense</i> , em relação à interação entre os meses e locais de coleta.....	93
Figura 19- Índice de fitotoxicidade de necrose em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e em <i>P. guineense</i> nos locais de coleta.....	94
Figura 20- Teor de clorofila em plantas não-expostas e expostas, em <i>B. sericea</i> , <i>C. verbenacea</i> e <i>P. guineense</i> , e variação ao longo dos meses de avaliação em <i>P. guineense</i> .....	95
Figura 21- Número de inflorescências em <i>B. sericea</i> e em <i>C. verbenacea</i> nos meses de coleta; em <i>C. verbenacea</i> , variando com os locais de avaliação e com a interação entre os meses e locais de coleta.....	96
Figura 22- Número de eixo com frutos em <i>B. sericea</i> em função dos meses de coleta, em <i>C. verbenacea</i> e em <i>P. guineense</i> , nos locais de coleta e em <i>B. sericea</i> , na interação entre os meses e locais de coleta.....	97
Figuras 23-28- Detecção de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de folhas adultas de <i>B. sericea</i> , com azul de Prússia, observados ao microscópio fotônico.....	98
Figuras 29-35- Detecção de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de folhas adultas de <i>C. verbenacea</i> , com azul de Prússia, observados ao microscópio fotônico.....	100
Figuras 36-41- Detecção de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de folhas adultas de <i>P. guineense</i> , com azul de Prússia, observados ao microscópio fotônico.....	101

## RESUMO

SILVA, Luzimar Campos da, D.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2003. **Avaliações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas dos efeitos de poluentes atmosféricos sobre espécies vegetais de restinga.** Orientador: Marco Antonio Oliva Cano. Conselheiros: Aristéa Alves Azevedo, Carlos Alberto Martínez y Huaman e José Cambraia.

Com o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos do ferro particulado e do dióxido de enxofre liberados por uma usina de pelletização, localizada no município de Anchieta, ES, sobre parâmetros fisiológicos, bioquímicos e anatômicos, foram determinados os efeitos dos poluentes atmosféricos mediante metodologia de bioindicação ativa e passiva. As espécies avaliadas no biomonitoramento ativo, *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e *Clusia hilariana* Schlecht. (Clusiaceae), foram colocadas em estações padronizadas e distribuídas em diferentes distâncias: 200 m, 500 m, 800 m, 1400 m e 1700 m em relação à fonte emissora, durante 7 meses. Em experimento simultâneo, as mudas inseridas num solo removido de uma usina de pelletização foram submetidas à chuva ácida simulada constituída de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com pH 3,0 e à chuva controle com pH 6,5, durante 40 dias. Na bioindicação passiva, indivíduos das espécies: *Byrsonima sericea* DC. (Malpighiaceae), *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) e *Psidium guineense* SW. (Myrtaceae) foram avaliados numa mata remanescente de restinga, localizada a 200 m da usina (local exposto) e no Parque Estadual Paulo César Vinha (local não-exposto), durante um ano. *E. uniflora* recebeu deposição de maior quantidade de ferro particulado por área foliar do que *C. hilariana*, não variando quanto às distâncias da fonte emissora nas duas espécies. Os maiores teores foliares de ferro total foram verificados a 200 m da fonte emissora, nas duas espécies vegetais, enquanto que o maior teor de enxofre total foliar foi observado em *E. uniflora*, a 800 m e em *C. hilariana*, a 200 m da fonte emissora. Não se observou variação em altura nas duas espécies vegetais avaliadas e o número de folhas foi menor apenas a 800 m e 1700 m de distância em *C. hilariana*. O número e a percentagem de folhas cloróticas e necróticas, assim como o índice de fitotoxicidade de cloroses nas duas espécies aumentaram com o prolongamento do tempo de exposição às emissões da usina. Em *E. uniflora*, a percentagem de folhas cloróticas e necróticas não se modificou com a distância da fonte emissora, enquanto que em *C. hilariana*, as maiores médias foram observadas a partir de 500 m. Nas duas espécies, o teor de clorofila diminuiu com o tempo de exposição e apenas em plantas de *E. uniflora* localizadas a 800 m da

fonte emissora foram observados maiores teores de clorofila. As plantas de *C. hilariana* localizadas a 200 m e 500 m da fonte emissora apresentaram maior permeabilidade de suas membranas celulares, que se relacionou com o teor foliar de enxofre. As plantas de *C. hilariana* apresentaram condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ) e a assimilação líquida de  $CO_2$  ( $A$ ) mais elevadas nas estações mais próximas à usina emissora, embora isto não tenha contribuído para o aumento da massa seca total. A relação trocas gasosas e teor foliar de enxofre sugeriu que *C. hilariana* acumulou grande quantidade de enxofre enquanto que *E. uniflora* praticamente não absorveu o enxofre emitido pela usina de pelotização. Ambas as espécies são bioindicadoras de reação, podendo ser usadas como bioindicadoras ativas de poluição por deposição particulada e dióxido de enxofre. Em relação ao experimento com chuva ácida, nenhuma das espécies apresentou variação na altura das mudas tratadas em relação ao controle, enquanto o índice de fitotoxicidade de necroses foi maior nas plantas de *E. uniflora* expostas à chuva ácida. Os teores de clorofila **a**, de clorofila **b** e de carotenóides foram reduzidos em *E. uniflora* após o tratamento, enquanto que a relação  $F_v/F_m$  foi maior nas plantas tratadas. Em *C. hilariana*, nenhum destes parâmetros foi alterado com a chuva ácida. A  $g_s$ ,  $E$  e  $A$  não variaram nas plantas tratadas em relação ao controle, nas duas espécies avaliadas, após as 40 chuvas simuladas. Nenhuma das espécies mostrou alteração na permeabilidade de suas membranas. Em *E. uniflora*, apenas a atividade da peroxidase aumentou com o tratamento, enquanto que em *C. hilariana*, as atividades da dismutase do superóxido, da peroxidase e da catalase aumentaram após as 40 simulações. Nas três espécies avaliadas no biomonitoramento passivo, o teor de ferro foliar foi maior no local exposto às emissões da usina e o teor foliar de enxofre variou nas diferentes espécies analisadas. Os efeitos mais marcantes das deposições da usina sobre as espécies avaliadas no biomonitoramento passivo foram: Em *B. sericea*, maior teor de clorofila, menor temperatura foliar, maior número de folhas; em *C. verbenacea*, maior teor de clorofila, maior temperatura foliar, menor número de folhas, flores e frutos; em *P. guineense*, menor teor de clorofila, maior diferencial de temperatura entre a folha e o ar, maior lançamento de folhas, menor número de folhas. Não foram verificadas flores e frutos neste local. *C. verbenacea* acumulou maior quantidade de ferro que as demais espécies ocorrendo maior deposição nas reentrâncias nas bases dos tricomas glandulares. As plantas de *B. sericea* apresentaram menor conteúdo de ferro provavelmente, devido a presença

de hipoderme e tricomas malpighianos, enquanto que em *P. guineense*, a proteção parece ter sido viabilizada pela hipoderme.

## ABSTRACT

SILVA, Luzimar Campos da, D.S., Universidade Federal de Viçosa, September, 2003. **Biochemical, physiological and anatomical assessment of atmospheric pollutants effects upon restinga plant species.** Advisor: Marco Antonio Oliva Cano. Committee Members: Aristéa Alves Azevedo, Carlos Alberto Martínez y Huaman and José Cambraia.

In order to evaluate the toxic effects of particulate iron and sulfur dioxide, emitted by an iron ore factory located at Anchieta county, ES, passive and active biomonitoring methodologies were tested. Biochemical, physiological and anatomical parameters were evaluated on native plant species of restinga. On the active biomonitoring test, *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) and *Clusia hilariana* Schlecht. (Clusiaceae) saplings were placed, during seven months, in standardized strands arranged at 200 m, 500 m, 800 m, 1400 m and 1700 m from the source emissions. Simultaneously, an experiment with simulated acid rain was tested on the two species, cultivated in original soil, at Universidade Federal de Viçosa. The saplings were submitted, for 40<sup>th</sup> days, to acid rain pH 3.0 and pH 6.5 (control). For the passive bioindicating test saplings of *Byrsonima sericea* DC. (Malpighiaceae), *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) and *Psidium guineense* SW. (Myrtaceae) were assessed during one year, in two locations: at a remaining fragment of restinga nearby the ore factory (exposed site) and at the Parque Estadual Paulo César Vinha (control site). *E. uniflora* received a greater amount of particulate iron, per foliar area, than *C. hilariana*, which did not change with the distance from the emission source. To both species, the highest total iron content in the leaves was detected at 200 m from the emission source. The sulfur content in the leaves, however, was higher at 800 m and 200 m, for *E. uniflora* and *C. hilariana*, respectively. There was no variation on the plant height, for both species, and the number of leaves only decreased on *C. hilariana*, at 800 and 1700 m from the source. The amount and the percentage of chlorotic and necrotic leaves, as well as the chlorosis phytotoxicity index, on both species, increased with the time exposure to the emissions. The necrotic and chlorotic leaf percentages of *E. uniflora* did not vary with the distance from the emission source, while *C. hilariana* showed the highest percentages beyond the 500 m from the source. For both species, the chlorophyll content decreased with the time exposure, but in *E. uniflora* this content was higher at 800 m from the emission source. Plants of *C. hilariana* standing at 200 m and 500 m, from the emission source, displayed a higher membrane permeability which was related to the sulfur

content in the leaves. The stomatal conductance ( $g_s$ ), the transpiration ( $E$ ) and the net CO<sub>2</sub> assimilation ( $A$ ) of *Clusia hilariana* was higher at those sets near the factory, however the total dry weight did not vary. The foliar sulfur content and gas exchange traits in *C. hilariana*, suggested that this specie accumulated greater quantity of sulfur, probably from the factory emissions, than *E. uniflora*. Both species studied in this essay are reaction bioindicators and can be used as active bioindicators of particulate and sulfur dioxide emissions. In the acid rain simulation test, none of the species showed variation on the plant height, but in *E. uniflora* displayed a higher necrosis phytotoxicity index when the saplings were exposed to the lowest pH rain. Plants of *E. uniflora*, exposed to pH 3.0 rain had their chlorophylls **a**, **b** and carotenoids contents reduced after the treatment. However, the  $F_v/F_m$  ratio of those plants increased. The same parameters, in *C. hilariana*, did not suffer any alteration after the rain simulation. The gas exchange constituents,  $g_s$ ,  $E$  and  $A$ , did not alter in none of the treatment for both species, even after 40 days. The membrane permeability, in both species, also remained unaltered. In *E. uniflora*, only the peroxidase activity enhanced with the treatment exposed, while in *C. hilariana* all the enzymes tested, had their activity improved at the end of the pH 3.0 treatment. All three species, on the passive biomonitoring test, showed a higher iron content on those saplings kept in the exposed site, while the sulfur content in the leaves varied according to the species. The effects of the factory depositions was remarkable different among the species, causing: in *B. sericea* an elevation on the chlorophyll content, lower foliar temperature and higher number of leaves; in *C. verbenacea* an elevation on chlorophyll content, lower foliar temperature, lower number of leaves, flowers and fruits; in *P. guineense* lower chlorophyll content, higher leaf air temperature difference, greater release of new shoots, but fewer leaves, and no flowers or fruits. *C. verbenacea* accumulated higher quantity of iron than the other species, mainly deposited between the gaps on the trichomes base. Plants of *B. sericea* had the lowest iron content, probably due to the presence of a hypoderm, malpighians trichomes, while in *P. guineense* the protection was guaranteed only by the a hypoderm.

## INTRODUÇÃO GERAL

A restinga de Setiba, localizada no município de Guarapari, no Espírito Santo, é composta por várias formações vegetacionais, que têm relação direta com a incidência de ventos e a influência da salinidade, devido à proximidade com o mar. Nesta restinga, formada no período quaternário e de origem eólica, o solo é arenoso e pobre em nutrientes podendo se distinguir as formações: Halófitas, Psamófila Reptante, Pós-Praia, Palmae, Mata de Myrtaceae, Mata Seca, Brejo Herbáceo, Floresta Periodicamente Inundada, Floresta Permanentemente Inundada, Restinga Aberta de Ericaceae e Formação Aberta de *Clusia* (Pereira, 1990).

Parte deste complexo vegetacional nativo está sujeito ao impacto da poluição aérea emitida por uma usina de pelotização, inserida na sua vizinhança, no município de Anchieta, Espírito Santo.

Os principais poluentes emitidos pela usina de pelotização em estudo são o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e o ferro particulado, além de NO<sub>x</sub> (óxidos de nitrogênio), CO e CO<sub>2</sub> (monóxido e dióxido de carbono, respectivamente). O SO<sub>2</sub> e os NO<sub>x</sub>, estão incluídos entre os principais poluentes atmosféricos e podem ser transportados até cerca de mil quilômetros do local de emissão (Mudd e Kozlowski, 1975). O SO<sub>2</sub> pode atuar diretamente na forma de gás, ou como deposição ácida, originada a partir das reações fotoquímicas na atmosfera. Todos estes elementos atuam direta ou indiretamente sobre os diferentes níveis estruturais das plantas.

Tendo em vista que as plantas apresentam diferenças de sensibilidade à poluição, suas respostas podem ser muito variadas. O crescimento de uma espécie pode, por exemplo, ser estimulado em função do efeito inibidor da poluição sobre a outra espécie. Este fato pode alterar a competição natural entre as espécies, dando espaço às espécies oportunistas, que descaracterizam a vegetação original (Murray, 1981; Kozlowski e Pallardy, 1997; Domingos et al., 2000).

Devido às respostas diferenciadas das plantas à poluição, estas podem ser usadas como bioindicadoras da qualidade do ar. Algumas espécies são particularmente susceptíveis à poluição (bioindicadores de reação), enquanto outras podem acumular os poluentes em altas concentrações sem que sintomas visíveis sejam observados (bioindicadores de acumulação) (Mudd e Kozlowski,

1975; Kozlowski, 1980; Arndt et al., 1995). Os bioindicadores podem ser empregados como passivos, quando estão presentes em seu ambiente natural, ou ativos, quando são introduzidos, de forma padronizada, na área de estudo (Ellenberg et al., 1991).

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. Ellenberg et al., (1991) listaram possíveis bioindicadores tropicais e subtropicais, relatando para o Brasil apenas *Tillandsia aeranthes* (Bromeliaceae) como bioindicador passivo da presença de SO<sub>2</sub> (Strehl e Arndt, 1989). Em 1998, Klumpp et al. observaram que *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae) poderia ser usada como bioindicadora de acumulação dos elementos: flúor, enxofre, nitrogênio, ferro, manganês e zinco. Com relação ao fluoreto, Arndt et al. (1995) listaram espécies tropicais e subtropicais, brasileiras e de outros países, em sensíveis e tolerantes. Algumas gramíneas tropicais também foram testadas em relação ao fluoreto (Figueiredo, 1994; Chaves, 1997; Divan Júnior, 2002). Apesar destes trabalhos, ainda não se tem uma panorâmica das respostas das plantas tropicais nativas à poluição.

A folha é o órgão mais sujeito à ação dos poluentes atmosféricos. Por isso, vários parâmetros foliares podem ser utilizados para qualificar e quantificar a influência desses poluentes sobre as plantas, como: lesões foliares, percentagem de folhas injuriadas, área foliar necrosada, crescimento, taxa de fotossíntese e de respiração, conteúdo de clorofila e acúmulo de poluentes no tecido foliar (Prado Filho, 1993).

Nas folhas, a deposição particulada de ferro produz graves alterações na transpiração, na fotossíntese e no balanço térmico das mesmas, por obstruir os estômatos. Pode ocorrer, também, aumento na degradação das clorofilas com o aumento das partículas em suspensão (Carreras e Pignata, 2001).

Os efeitos da deposição ácida nas plantas são muito variados e às vezes, contraditórios, podendo ocorrer: redução ou estímulo no crescimento, inibição da germinação de sementes, inibição da nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas, remoção da cera epicuticular e de constituintes da cutícula, alterações nas trocas gasosas e taxas respiratórias, redução dos teores de clorofilas a e b e da taxa fotossintética, aumento na lixiviação de nutrientes (K, Ca, Mg, Na e Mn) das folhas, clorose e necrose das folhas e intoxicação celular,

decorrentes de distúrbios enzimáticos (Dekock et al., 1960; Mudd e Kozlowski, 1975; Kozlowski, 1980; Evans, 1984; Percy, 1986; Singh e Agrawal, 1996).

Existem diversas metodologias para avaliar os impactos dos poluentes atmosféricos nas plantas. Ultimamente, tem sido desenvolvidas metodologias “in vivo” que permitem monitorar os processos fisiológicos alterados pela ação de poluentes. O emprego de métodos não-invasivos em espécies nativas é uma ferramenta imprescindível pois parâmetros ecofisiológicos como fotossíntese, respiração, transpiração, temperatura foliar, teor de clorofila e outros podem ser avaliados em campo, sem destruir as plantas, permitindo um acompanhamento temporal dos reais efeitos da poluição. Para tanto, estudos prévios com cada espécie em particular são necessários para a correta interpretação dos dados, antes de extrapolar a análise dos efeitos da poluição para a vegetação como um todo.

Entre as espécies de restinga, serão estudadas *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e *Clusia hilariana* Schlecht. (Clusiaceae) em experimentos de bioindicação ativa, no qual as plantas foram expostas às deposições particuladas (ferro metálico) e gasosas (SO<sub>2</sub>), emitidas por uma usina de pelotização e, também, em experimentos de chuva ácida simulada. Representantes de *Byrsonima sericea* DC. (Malpighiaceae), *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) e *Psidium guineense* SW. (Myrtaceae) foram avaliadas numa mata remanescente de restinga, localizada na área da usina emissora, em experimentos de bioindicação passiva. Objetivou-se avaliar os impactos na vegetação mediante parâmetros fisiológicos, bioquímicos e anatômicos.

As hipóteses a serem testadas neste trabalho são de que as plantas nativas apresentam sensibilidade diferenciada a diferentes poluentes atmosféricos; a sensibilidade diferenciada permite avaliar os efeitos da poluição e utilizar espécies vegetais na bioindicação; e existem processos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos que são afetados diferentemente e podem ser utilizados como sinalizadores do impacto da poluição.

## BIBLIOGRAFIA

ARNDT, U., FLORES, F., WEINSTEIN, L. **Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil**. Porto Alegre: UFRGS, 155p, 1995.

- CARRERAS, H.A., PIGNATA, M.L. Compararison among air pollutants, meteorological conditions and some chemical parameters in the transplanted lichen *Usnea amblyoclada*. **Environmental Pollution**, v.111, n.1, p.45-52, 2001.
- CHAVES, A. L. F. **Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-Rhodes) – Poaceae.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 79 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- DEKOCK, P.C., COMMISSIONG, K., FARMER, V.C., INKSON, R.H.E. Interrelationships of catalase, peroxidase, hematin, and chlorophyll. **Plant Physiology**, v.35, n.1, p.599-604, 1960.
- DEKOCK, P.C., COMMISSIONG, K., FARMER, V.C., INKSON, R.H.E. Interrelationships of catalase, peroxidase, hematin, and chlorophyll. **Plant Physiology**, v.35, n. 1, p. 599-604, 1960.
- DIVAN JÚNIOR, A.M. **Impacto das emissões de fluoreto em Ouro Preto, MG, avaliados mediante bioindicadores vegetais ativos e passivos.** Viçosa, MG: UFV, 2002. 81p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- DOMINGOS, M.; KLUMPP, A. & KLUMPP, G. **Effects of air pollution and soil contamination on the Atlantic Forest (Mata Atlântica) in the vicinity of the industrial complex of Cubatão (SE – Brasil).** In: 1. Symposium der A. F. W. Schimper – Stiftung. Stuttgart, Verlag Günter Heimbach, p.397-402, 2000.
- ELLENBERG, H., ARNDT, U., BRETTHAUER, R., RUTHSATZ, B., STEUBING, L. **Biological monitoring: signals from the environment.** Berlin: Vieweg, 318p., 1991.
- EVANS, L. S. Botanical aspects of acidic precipitation. **Botanical Review**, v.50, n.4, p.449-490, 1984.
- FIGUEIREDO, J.G. **Avaliação de gramíneas tropicais como bioindicadoras da presença de flúor.** Viçosa:UFV, 1994, 87p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 1994.
- KOZLOWSKI, T.T. Impacts of air pollution on forest ecosystems. **BioScience**, v.30, n.1, p.89-93, 1980.
- KOZLOWSKI, T.T., PALLARDY, S.G. (Eds.). **Growth control in woody plants.** London: Academic Press, 641 p., 1997.
- KLUMPP, A., DOMINGOS, M., MORAES, R.M., KLUMPP, G. Effects of complex air pollution on tree species of the Atlantic rain forest near Cubatão, Brazil. **Chemosphere**, v.36, n.4, p.989-994, 1998.
- MUDD, J.B., KOZLOWSKI, T.T. (Eds.). **Responses of plants to air pollution.** New York: Academic Press, 383 p., 1975.

- MURRAY, F. Effects of fluorides on plant communities around an aluminium smelter. **Environmental Pollution**, v.24, n.1, (Serie A), p.45-56, 1981.
- PEREIRA, O.J. Caracterização fitofisionômica da restinga de Setiba - Guarapari - Espírito Santo. In: **II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira - Estrutura, função e manejo**, 2. Águas de Lindóia, São Paulo, ACIESP, v.3, p.207-219, 1990.
- PERCY, K. The effects of simulated acid rain on germinative capacity, growth and morphology of forest tree seedlings. **The New Phytologist**, v.104, n.3, p.473-484, 1986.
- PRADO FILHO, J.F.P. Uso de bioindicadores para monitoramento do ar. **Ambiente**, v.7, n.1, p.57-64, 1993.
- SINGH, A.; AGRAWAL, M. Responses of two cultivars of *Triticum aestivum* L. to simulated acid rain. **Environmental Pollution**, v.91, n.2, p.161-167, 1996.
- STREHL, T., ARNDT, U. Alterações apresentadas por *Tillandsia aeranthos* e *T. recurvata* (Bromeliaceae) expostas ao HF e SO<sub>2</sub>. **Iheringia**, v.39, n.1, p.3-17, 1989.

## CAPÍTULO 1

### EFEITO DA DEPOSIÇÃO PARTICULADA E DO DIÓXIDO DE ENXOFRE EM *Eugenia uniflora* E *Clusia hilariana*, VISANDO BIOMONITORAMENTO ATIVO.

**RESUMO** – Com o objetivo de avaliar os efeitos da deposição de ferro particulado e do dióxido de enxofre sobre o crescimento e os parâmetros fisiológicos, visando ao biomonitoramento ativo, mudas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e *Clusia hilariana* Schlecht. (Clusiaceae) foram expostas à ação de emissões gasosas e particuladas provenientes de uma usina de pelletização, no município de Anchieta, ES, durante um período de sete meses. As espécies vegetais foram selecionadas pela representatividade e frequência na restinga original do Parque Estadual Paulo César Vinha, considerando a facilidade de cultivo e as características fenológicas, morfológicas e fisiológicas. As espécies foram colocadas em estações padronizadas e distribuídas ao longo de um transecto de acordo com a direção do vento predominante na região, em diferentes distâncias: 200 m, 500 m, 800 m, 1400 m e 1700 m em relação à fonte emissora. Aos 71, 118 e 181 dias de exposição, foram realizadas avaliações quanto à altura, ao número de folhas, ao número e percentagem de folhas cloróticas e necróticas, ao índice de fitotoxicidade foliar de cloroses e ao teor de clorofila total (índice SPAD). Na última data de coleta dos dados, foram avaliadas: a deposição de ferro nas folhas, o teor de ferro e enxofre das folhas, a permeabilidade das membranas em discos foliares, as trocas gasosas e a massa seca total do material vegetal. *E. uniflora* recebeu uma maior deposição de ferro particulado, por unidade de área foliar, do que *C. hilariana*, embora não tenha ocorrido variação quanto às distâncias da fonte emissora nas duas espécies. Os maiores teores foliares de ferro total foram verificados a 200 m da fonte emissora, nas duas espécies vegetais, enquanto que o maior teor de enxofre total foliar foi observado em *C. hilariana*, a 200 m e em *E. uniflora* a 800 m da fonte emissora. Não se observou variação em altura nas duas espécies vegetais. O número de folhas foi menor apenas a 800 m e 1700 m de distância em *C. hilariana*. O número e a percentagem de folhas cloróticas e necróticas e o índice de fitotoxicidade de cloroses nas duas espécies aumentaram com o prolongamento do tempo de exposição às emissões da usina. Em *E. uniflora*, a percentagem de folhas cloróticas e necróticas não modificou com a distância da fonte emissora, enquanto que em *C. hilariana* as maiores médias foram observadas a partir de 500 m. Nas duas espécies, o teor de clorofila diminuiu com o tempo de exposição mas apenas em plantas de *E. uniflora* localizadas a 800 m da fonte emissora foi observado aumento no teor de clorofila. As plantas de *C. hilariana* localizadas a 200 m e 500 m da fonte emissora apresentaram maior permeabilidade de suas membranas celulares, que se correlacionou com o teor foliar de enxofre. As plantas de *C. hilariana* apresentaram trocas gasosas mais elevadas nas estações próximas à usina emissora, embora isto não tenha contribuído para o aumento da massa seca total. O maior teor foliar de enxofre foi acompanhado de aumento na condutância estomática, na transpiração e na assimilação líquida de CO<sub>2</sub> até um certo limite, a partir do qual, ocorreu diminuição nas trocas gasosas, especialmente em *C. hilariana*. Esta mesma espécie acumulou maior quantidade de enxofre que *E. uniflora*, que praticamente, não absorveu o enxofre emitido pela usina de pelletização. Ambas espécies são bioindicadoras de reação, podendo se usadas na bioindicação ativa.

**Palavras chave:** bioindicação ativa, deposição particulada, SO<sub>2</sub>, plantas nativas.

**SUMMARY- Particulate deposition and sulfur dioxide effects on *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*, as an active biomonitoring tool** – In order to evaluate the effects of iron particulate matter and sulfur dioxide on the growth and physiology of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) and *Clusia hilariana* Schlecht. (Clusiaceae), saplings of both species were exposed, for seven month, to the pollutants emitted by an iron ore factory at Anchieta county, ES. The aim of the experiment was to stabilish a pattern to be use as an active biomonitoring tool. The two species were choose due to their representativeness and frequency on the original restinga at the Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV), also considering their easiness to cultivate and their physiological, phenological, and morphological traits. The saplings placed on standardized stands were distributed along a transect, oriented according to the wind direction prevailing in the area, at 200 m, 500 m, 800 m, 1400 m and 1700 m from the emissions source. At 71, 118 and 181 days of exposure, measurements were carried out to verified the height, number of leaves, chlorosis and necrosis percentages, phytotoxicity index of the chlorotic leaves, and total chlorophyll (SPAD index). It was evaluated, on the last measurement date, the iron deposition on the leaves, the iron and sulfur content in the leaves, the membrane permeability of foliar discs, gas exchange parameters and total dry weight of the plants. *E. uniflora* received a greater particulate iron deposition, per foliar area unity, than *C. hilariana*. Total iron foliar content was higher, in both species, at 200 m from the source, while the total sulfur foliar content was higher at 200 m for *C. hilariana* and at 800 m for *E. uniflora*. There was no variation on plant height for both species. Only for *C. hilariana* the amount of leaves diminished, at 800 m and 1700 m from the emissions source. The number and the percentage of chlorotic and necrotic leaves, as well as the chlorotic phitotoxicity, on both species, increased with the time exposure to factory emissions. To *E. uniflora*, the percentage of chlorotic and necrotic leaves did not change with the distance from the emission source, however the percentage increased on those *C. hilariana* saplings placed beyond 500 m from the source. The chlorophyll content decreased, for both species, with the time exposure but for plants of *E. uniflora*, at 800 m from the source, there was an increment. Plants of *C. hilariana* at 200 m and 500 m from the source displayed a grater membrane permeability, which was related to the sulfur foliar content. The gas exchange was higher on plants of *C. hilariana* keep on those station near the source, even though it did not alter the total dry weight. The highest sulfur foliar content was follow by increments on stomatal conductance, transpiration and CO<sub>2</sub> net assimilation, to a certain point and from where the gas exchange started to decrease, specially on those *C. hilariana* saplings. Both species proved to be reactive bioindicators, and could be used on active biomonitoring.

**Key-word:** Active bioindication, particulate deposition, SO<sub>2</sub>, native plants.

## 1- Introdução

A deposição particulada é formada por uma mistura de poluentes contendo partículas de vários tamanhos, origens e composições químicas. Em relação ao tamanho das partículas que a compõem pode ser classificada, em deposição fina (com 0-2,5 $\mu$ m de diâmetro) e deposição grossa (com 2,5 a 10 $\mu$ m de diâmetro) (Grantz et al., 2003).

As usinas de pelotização de minério de ferro são responsáveis por aumentar os níveis atmosféricos de muitos poluentes, especialmente o dióxido de enxofre e o ferro particulado, em praticamente todas as etapas da produção, como a queima de combustíveis fósseis, o manuseio do minério de ferro, o armazenamento, o transporte e a recuperação de produtos. Desta forma, a quantidade de poluentes liberados está diretamente relacionada com a produção das usinas e a qualidade do combustível empregado (Ottaway, 1982).

A dinâmica da dispersão de elementos traço, como o ferro, pode variar com os diferentes fatores, dentre os quais pode-se destacar a temperatura do ar, a altura da chaminé, a frequência e a intensidade do vento, a precipitação e a presença de água em suspensão (aerosol marinho). O aerosol marinho, que pode aderir às partículas em suspensão e o tamanho das partículas irão determinar se a deposição particulada será precipitada nas imediações da usina ou se haverá dispersão por quilômetros para o interior (Grantz et al., 2003).

O aerosol marinho, devido à grande concentração de sódio e cloreto que apresenta, é extremamente tóxico para as plantas, e quando aderido ao ferro particulado, pode produzir necroses foliares, contribuindo também para a eliminação das espécies locais intolerantes ao spray salino (Grantz et al., 2003).

A deposição particulada pode afetar a vegetação diretamente, pela deposição na superfície foliar, ou indiretamente pela deposição no solo, alterando suas propriedades químicas ou diminuindo a radiação que chega à superfície da terra (Grantz et al., 2003). Nas folhas, a deposição particulada de ferro produz alterações na transpiração, na fotossíntese e no balanço térmico das mesmas, por obstruir os estômatos. A clorofila pode ter sua síntese reduzida, devido à redução na luz que chega à folha, ou pode, ainda, ser degradada, devido aos estresses oxidativos produzidos pelo excesso de íons de ferro livre (Gallego et al. 1996; Vansuyt et al. 1997; Fourcroy, 1999). No ecossistema, a deposição particulada pode alterar a ciclagem de nutrientes, inibindo a sua absorção, reduzindo o crescimento, a floração, a frutificação e alterando a diversidade

específica, pela eliminação local das espécies mais sensíveis, entre outros (Grantz et al., 2003).

O dióxido de enxofre gasoso é absorvido pelas plantas principalmente pelo fluxo difusivo através dos estômatos, promovendo respostas variadas dependendo das espécies e das condições ambientais. Desta forma, pode ocorrer fechamento, abertura ou nenhuma reação dos estômatos (Rennenberg e Herschbach, 1996). Entretanto, as plantas também absorvem o enxofre pelas raízes por um processo ativo controlado pelo metabolismo vegetal. Assim, evitar o influxo de dióxido de enxofre, pelo fechamento estomático, implica também em redução na fotossíntese e, conseqüentemente, no crescimento (Rennenberg et al. 1996).

A resolução nº 3 de 28 de junho de 1990 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) prevê níveis para os padrões primários e secundários de qualidade do ar. Para partículas totais em suspensão, o nível de padrão primário é de  $80 \mu\text{g.m}^{-3}$  de ar, de média geométrica anual, e  $240 \mu\text{g.m}^{-3}$  de ar em 24 horas, que não deve ser ultrapassado mais de uma vez por ano. O padrão secundário é de  $60 \mu\text{g.m}^{-3}$  de ar, como média mensal, e concentração média de 24 horas de  $150 \mu\text{g.m}^{-3}$  de ar. Para o dióxido de enxofre, é admitido como padrão primário  $80 \mu\text{g.m}^{-3}$  de ar de média geométrica mensal e  $365 \mu\text{g.m}^{-3}$  de ar em 24 horas que não deve ultrapassar mais de uma vez por ano. O padrão secundário é de  $40 \mu\text{g.m}^{-3}$  de ar de média geométrica mensal e  $100 \mu\text{g.m}^{-3}$  de ar em 24 horas que não deve ser excedida mais de uma vez por ano.

Na usina de pelotização em estudo, os registros de emissão de partículas nos meses de janeiro e fevereiro de 1999 mostraram que os níveis detectados estiveram abaixo do padrão secundário de qualidade do ar ( $25,1 \mu\text{g.m}^{-3}$  e  $107,5 \mu\text{g.m}^{-3}$  contra  $60 \mu\text{g.m}^{-3}$  e  $150 \mu\text{g.m}^{-3}$  de padrão secundário) (Lopes et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos do ferro particulado e do dióxido de enxofre, ao longo de um transecto, sobre o crescimento e os parâmetros fisiológicos de *E. uniflora* e *C. hilariana*, visando o biomonitoramento ativo.

## **2- Material e Métodos**

Para os estudos de biomonitoramento ativo foram escolhidas as espécies *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e *Clusia hilariana* Schlecht. (Clusiaceae) pela representatividade e freqüência na restinga do Parque Estadual Paulo César

Vinha (PEPCV), pela facilidade de cultivo e pelas diferentes características fenológicas, morfológicas e fisiológicas que apresentam.

*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) é um arbusto de aproximadamente três metros de altura, com metabolismo C<sub>3</sub>, presente nas formações Pós Praia e Mata de Myrtaceae na restinga de Setiba. Além de ocorrer na restinga, esta espécie apresenta-se distribuída em várias outras formações vegetacionais. Possui filotaxia oposta e folhas simples, brilhosas e glabras. É vulgarmente conhecida como “pitangueira” e o seu fruto são amplamente explorados comercialmente, devido ao caráter doce e acidulado que apresenta (Neves e Donato, 1989).

*Clusia hilariana* Schlecht. (Clusiaceae) é uma árvore de metabolismo CAM (FRANCO, 1989), amplamente distribuída na restinga de Setiba, especialmente na Formação Aberta de Clusia, onde seus exemplares predominam, formando moitas. Possui filotaxia oposta e as folhas são muito espessas e cerosas. É conhecida na região como “cebola do mato”, “cebola da praia” e “cebola brava”. É explorada comercialmente como ornamental, pela extração da madeira e da resina, esta última com fins medicinais (Schneider, 1986).

As mudas das duas espécies, com cerca de quatro meses de idade, fornecidas pelo viveiro do PEPCV, foram selecionadas pela padronização na altura, no número de folhas e no estado fitossanitário. Após transferência para vasos plásticos de dois quilos preenchidos com uma mistura de areia, terra e húmus, na proporção de 3:1:1, as plantas foram colocadas sob um sistema de irrigação automático, no qual o vaso era conectado por um pavio a um depósito de água que garantia a manutenção do potencial hídrico do solo.

As plantas foram, então, submetidas à ação das emissões gasosas e particuladas da usina de pelletização durante 7 meses, sob condições de campo, de 14 de agosto de 2001 até 12 de março de 2002.

A área em estudo pertence ao complexo industrial de uma usina de pelletização, localizada no município de Anchieta, no litoral do Espírito Santo sob as coordenadas geográficas 20°46'21,0" S e 40°34'52,3" W (Figura 1).

As plantas foram colocadas em estações padronizadas de acordo com os padrões internacionais de controle da qualidade do ar para bioindicadores (Arndt e Schluter, 1985). As estações foram distribuídas ao longo de um transecto, que foi determinado de acordo com a direção predominante do vento na região (NE) e dispostas às distâncias de 200, 500, 800, 1400 e 1700 m em relação à fonte



**Figura 1-** Mapa indicando a região da usina de pelotização e as estações de biomonitoramento ativo.

emissora (Tabela 1). Esta distribuição foi estabelecida, previamente mediante um estudo estatístico acoplado a uma modelagem de dispersão do dióxido de enxofre (Queiroz, 1998), realizada com um simulador Industrial Source Complex Short Term – ISCST3 da Environmental Protect Agence (EPA). A localização de cada estação foi determinada por sistema GPS (Global Positioning System).

Tabela 1- Localização geográfica da fonte emissora (usina de pelotização) e das estações de amostragem.

Estações	Distância da fonte emissora (m)	Coordenadas geográficas
Usina de Pelotização (fonte emissora)	-	20°46'21,0" S 40°34'52,3" W
1	200	20°46'25,0" S 40°34'58,9" W
2	500	20°46'28,0" S 40°35'10,1" W
3	800	20°46'35,8"S 40°35'14,9" W
4	1400	20°46'51,2" S 40°35'29,8" W
5	1700	20°46'42,2" S 40°35'47,3" W

Ao longo do experimento, foram realizadas quatro avaliações quanto à altura, ao número de folhas, ao teor de clorofila total (índice SPAD), ao número e percentagem de folhas cloróticas e, ou necróticas e ao índice de fitotoxicidade foliar de cloroses e, ou necroses, no início do experimento (14 de agosto), após 71 (24 de outubro), 118 (10 de dezembro) e 181 (12 de março) dias de exposição. Simultaneamente à última avaliação, foram realizadas medições das trocas gasosas, permeabilidade de membranas, deposição de ferro nas folhas, quantificação de ferro e sulfato no material vegetal e massa seca total do material vegetal.

O teor de clorofila total foi determinado pelo uso de um colorímetro SPAD, modelo 501 da Minolta, em 4 folhas adultas de cada repetição.

A porcentagem de folhas com clorose e, ou necrose foi calculada em relação ao número total de folhas da planta.

A fitotoxicidade foliar foi determinada atribuindo-se notas à porcentagem da área foliar clorótica, obedecendo a seguinte escala: 0- sem clorose; 1- com clorose em até 25% da área foliar; 2- com clorose de 26 a 50% da área foliar; 3- de 51 a 75% da área foliar com clorose; e 4- com clorose de 76 a 100% da área foliar. Foi feita uma amostragem geral das folhas adultas mais representativas por vaso.

A condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ) e a assimilação líquida de  $CO_2$  ( $A$ ) foram avaliadas em folhas adultas a partir do terceiro nó com o auxílio de um analisador de gases no infravermelho (IRGA, modelo LCA-2, da Analytical Development Co. Ltda), com câmaras PLC-B (ADC BioScientific Limited, Herts England), entre 7:00 e 10:00 horas da manhã em *E. uniflora* e entre 21:00 e 23:00 horas em *C. hilariana*, por esta apresentar metabolismo ácido das Crassuláceas.

A permeabilidade das membranas foi determinada em 15 discos foliares de *E. uniflora* e em 10 discos de *C. hilariana* (com 5 mm de diâmetro cada), devido a maior espessura da lâmina foliar de *C. hilariana*. Os discos foliares, previamente pesados e lavados, foram colocados em água desionizada durante 4 horas e então, foi medida a condutividade elétrica inicial da solução (i). Em seguida, as soluções foram transferidas para estufa a 90°C, por duas horas, para rompimento das membranas celulares e, após resfriamento, foi medida a condutividade elétrica final da solução (f). A permeabilidade da membrana foi calculada pela fórmula  $i/(i+f) \times 100$ , conforme proposto por Tarhanen et al., 1999.

Para determinação da deposição particulada sobre as folhas, três folhas de *E. uniflora* e duas folhas de *C. hilariana* foram limpas em papel de filtro, previamente pesado e umedecido com água destilada. Após secagem, em temperatura ambiente até peso constante, foi calculada a quantidade de ferro depositado sobre a folha pela diferença no peso do papel de filtro (Steubing e Frangmeier, 1992). Em seguida, foram medidas as áreas foliares, utilizando-se um medidor fixo de área foliar  $\Delta T$  Area Meter MK2.

Para determinação dos teores de ferro e enxofre no material vegetal, 15 folhas de *E. uniflora* e 5 folhas de *C. hilariana* foram lavadas em água corrente, depois em água desionizada e secas com papel de filtro. Após secagem em

estufa à temperatura de 75°C+/-5°C, as amostras foram moídas através de peneira com malha de 1 mm. O teor de ferro foi determinado mediante espectrofotometria de absorção atômica e os teores de sulfato, mediante ICP (Inductively Coupled Plasma). As leituras foram realizadas em amostras compostas.

O peso da matéria seca total foi obtido pela secagem de raízes e parte aérea, em estufas de ventilação forçada até peso constante.

As condições climáticas foram monitoradas em Estação Meteorológica instalada na mesma linha do transecto de exposição, onde foram avaliadas a direção e a velocidade do vento, a pluviometria e a temperatura ambiente.

As concentrações do SO<sub>2</sub> e do material particulado emitidos foram obtidas na estação localizada a 1700 m, no mesmo transecto da área de estudo, por meio dos aparelhos de campo Hi-vol e Tri-gás e determinadas as concentrações de dióxido de enxofre pelo método do peróxido de hidrogênio.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, compondo uma fatorial 2x5x4 (2 espécies, 5 estações, 4 épocas de coleta), com três repetições para *E. uniflora* e quatro para *C. hilariana*. Os dados foram transformados, quando não apresentaram homogeneidade de variância e distribuição normal, e foram submetidos à análise de variância. As médias foram submetidas ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparação.

### **3- Resultados**

#### ***Caracterização da Área de Estudo***

O clima da região em estudo é do tipo Aw, tropical quente e úmido com um a dois meses de seca (Köppen, 1918). No período em que foram instalados os experimentos verificou-se que o vento nordeste predominou em todos os meses, com velocidade máxima média de 1,9 m/s. A temperatura do ar variou de 20,71°C a 25,62°C, com média para o período de 23,4°C. A precipitação pluviométrica variou de 53,9 a 201,4 mm, sendo que a maior precipitação ocorreu no mês de novembro. A média para o período foi de 88,7mm (Figura 2).

As emissões de partículas totais em suspensão, incluindo o ferro metálico, e o dióxido de enxofre são apresentadas na Figura 3. Notou-se que apenas no mês de fevereiro a deposição de partículas totais em suspensão superou o padrão secundário (66,8 µg.m<sup>-3</sup>, para um padrão de 60 µg.m<sup>-3</sup>). Para o dióxido de

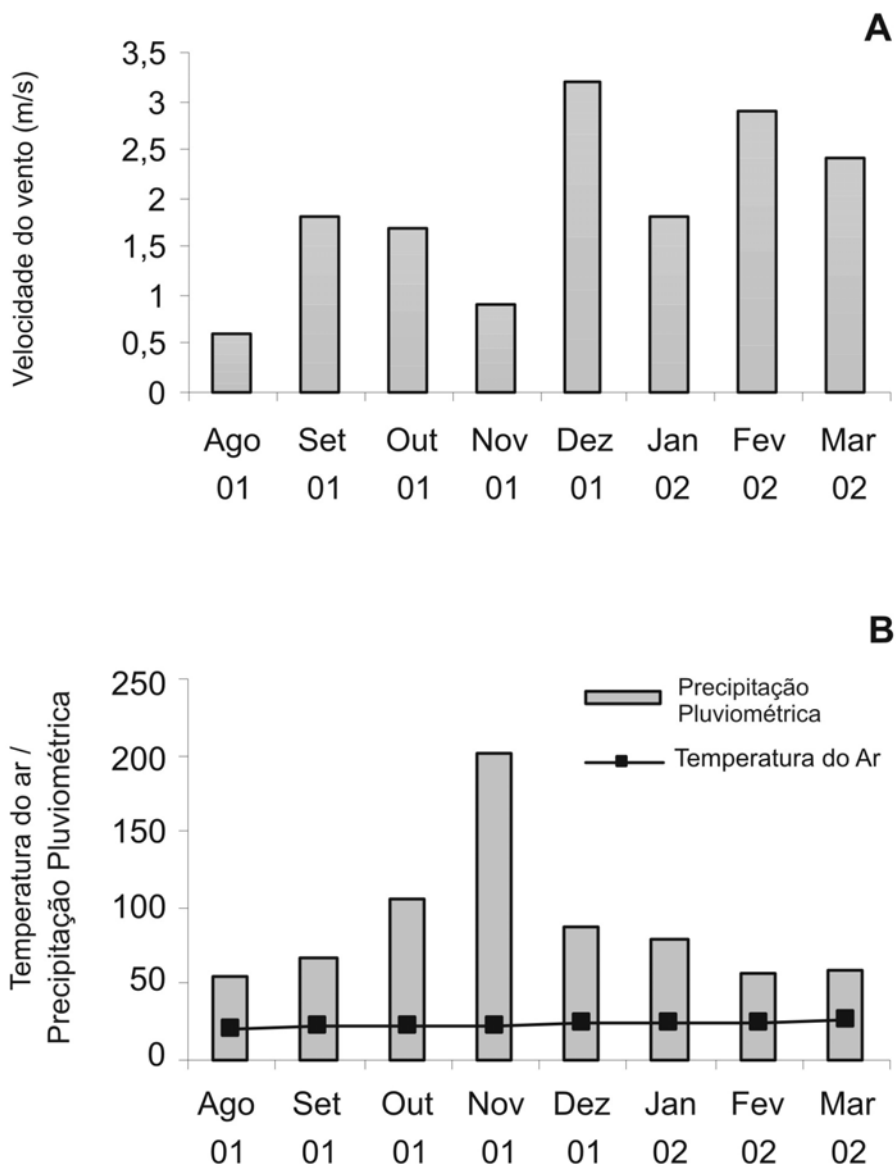


Figura 2- Dados climatológicos da área em estudo no período da exposição ativa, de Agosto de 2001 a Março de 2002. **A**- Velocidade do vento; **B**- Temperatura média do ar e precipitação pluviométrica.

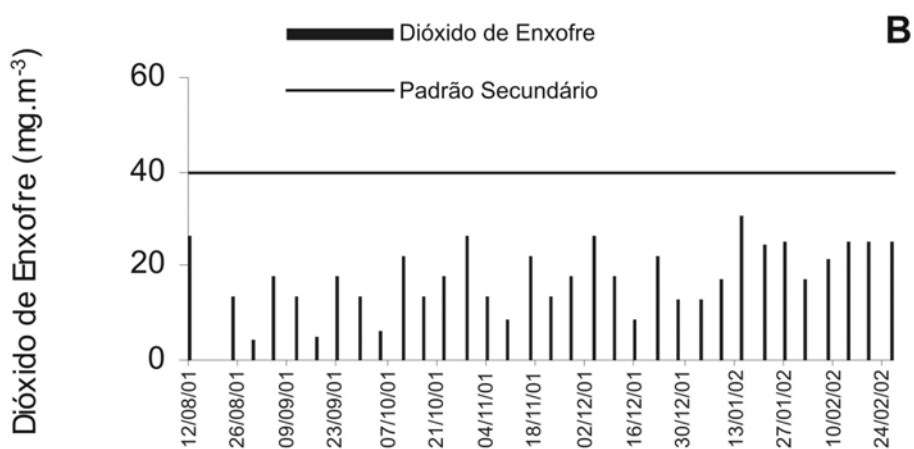
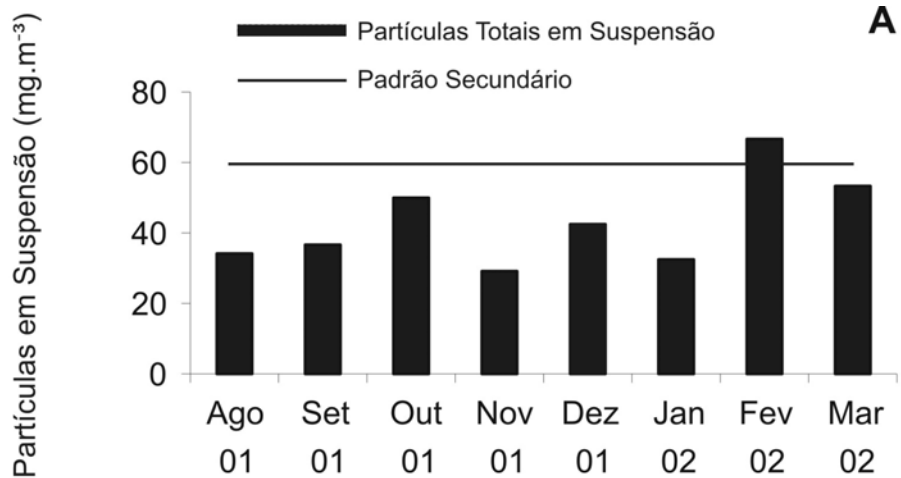


Figura 3- Emissões da usina de mineração durante o período de Agosto de 2001 a Março de 2002. **A**- Partículas totais em suspensão; **B**- Dióxido de enxofre. Padrão secundário segundo resolução do CONAMA (03/1990).

enxofre, verificou-se que os valores de emissão ficaram abaixo do padrão secundário durante todo o período de exposição.

### **Ação combinada da deposição de ferro metálico e SO<sub>2</sub>**

Os resultados mostraram que *E. uniflora* recebeu deposição superficial de maior quantidade de ferro particulado por área foliar do que *C. hilariana* (Figura 4-A).

As plantas da estação 1, localizadas a 200 m da fonte emissora apresentam os maiores teores de ferro, nas duas espécies. Em *C. hilariana*, esses teores foram diminuindo na medida em que as plantas estavam mais afastadas da fonte emissora, mas em *E. uniflora* não se observou tal tendência (Figura 4-B).

O teor de enxofre foliar em *C. hilariana*, também, foi maior nas plantas localizadas a 200 m da fonte emissora, seguida das estações 4, 3, 5 e 2. Em *E. uniflora*, houve um aumento progressivo nos teores de enxofre nas plantas, à medida em que se afastavam da fonte emissora até um máximo, verificado à 800 m da fonte, a partir da qual observou-se houve redução também progressiva deste elemento na planta (Figura 4-C).

As espécies *C. hilariana* e *E. uniflora* não apresentaram variação em altura, nas diferentes datas analisadas e distâncias da fonte emissora. Da mesma forma, a taxa de crescimento em altura não variou estatisticamente em relação às distâncias da fonte emissora nas duas espécies.

Em *E. uniflora*, o número de folhas por vaso aumentou com a data de coleta, independente da estação analisada, sendo que os valores médios maiores ocorreram em 10/12/01 e 12/03/02 (Figura 5-A). Em *C. hilariana*, entretanto, não se observou diferenças entre os vários períodos amostrados, mas houve diferença quanto às distâncias da fonte emissora, sendo as maiores médias observadas a 200, 500 e 800 m de distância. As plantas das estações localizadas a 1400 e 1700 m da fonte emissora tiveram menor produção de folhas ao longo do período de exposição (Figura 5-B).

Os principais sintomas visíveis observados nas plantas expostas ao dióxido de enxofre e ferro particulado foram o aparecimento de folhas cloróticas e necróticas. Nas duas espécies, as cloroses foram significativas na última coleta de dados (Figura 6-A).

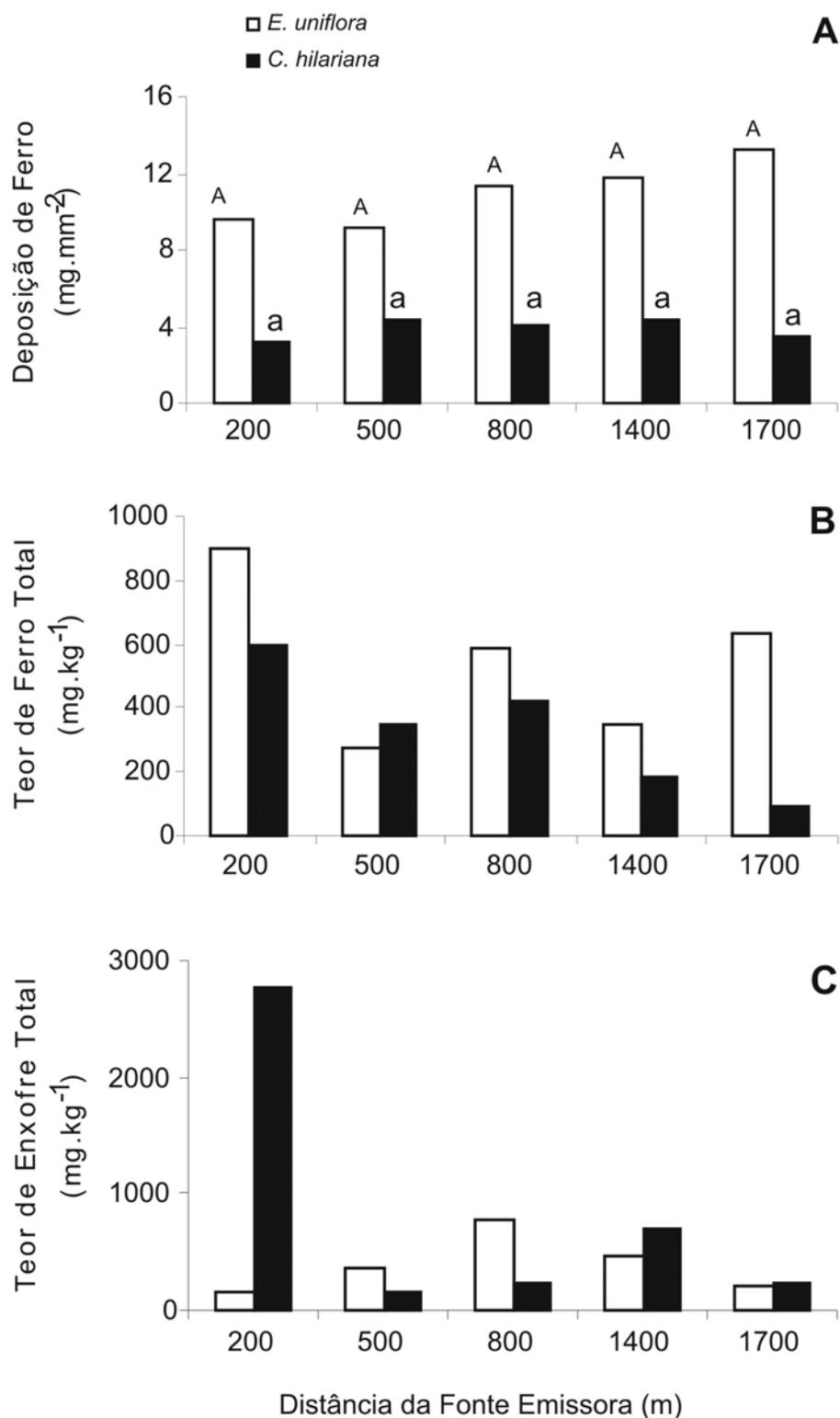


Figura 4- **A**- Deposição de ferro; **B**- Teor de ferro total; **C**- Teor de enxofre total, em folhas de *E. uniflora* e *C. hilariana*, medidos após sete meses de exposição às emissões da usina, a diferentes distâncias da fonte emissora. Letras maiúsculas comparam *E. uniflora* e minúsculas comparam *C. hilariana*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

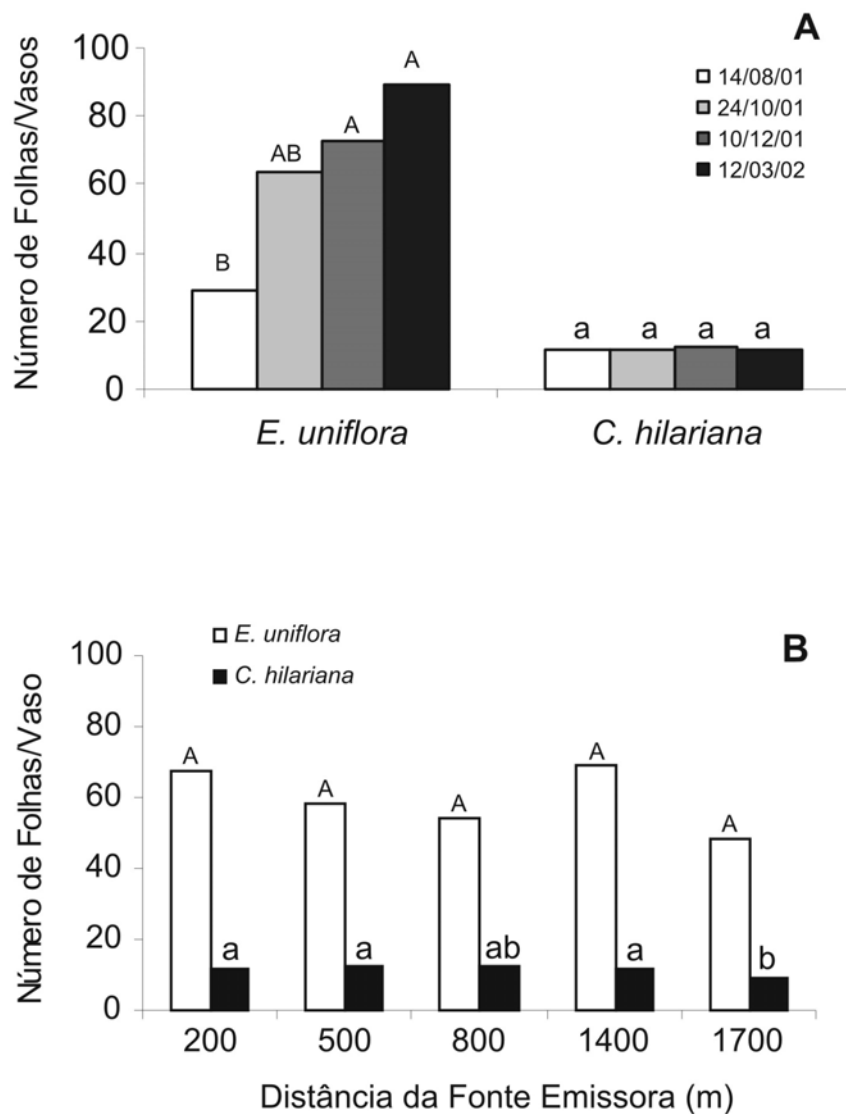


Figura 5- Número de folhas de plantas de *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas às deposições da usina durante sete meses, de Agosto de 2001 a Março de 2002, em função de: **A**- Épocas de coleta dos dados e **B**- Distâncias da fonte emissora. Letras maiúsculas comparam médias de *E. uniflora* e letras minúsculas comparam médias de *C. hilariana*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

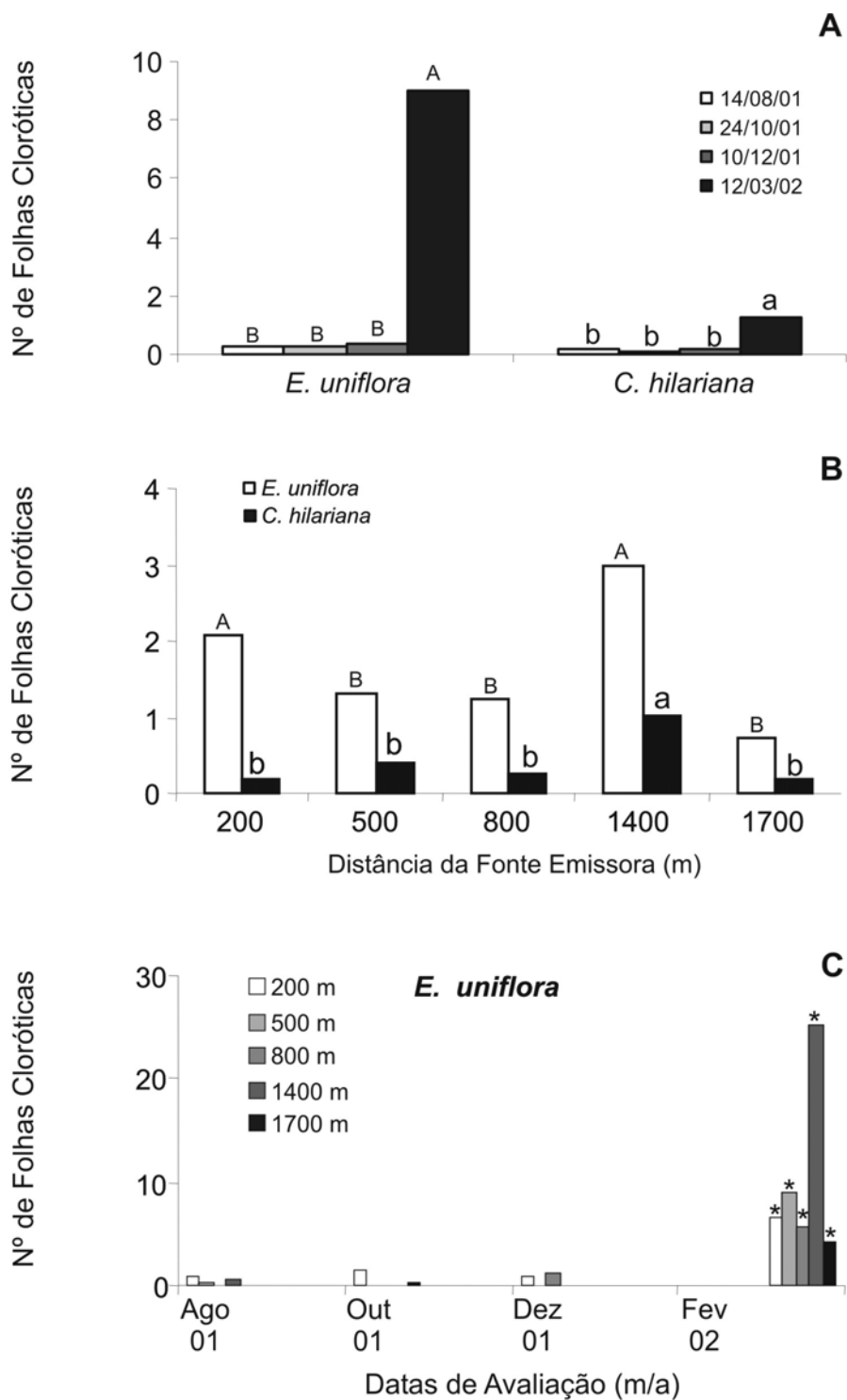


Figura 6 - Número de folhas cloróticas em *E. uniflora* e *C. hilariana*, expostas às emissões da usina por sete meses, de Agosto de 2001 a Março de 2002, em função de: **A**- Épocas de coleta dos dados; **B**- Distâncias da fonte emissora; **C**- Interação entre as épocas e distâncias, em *E. uniflora*. Letras maiúsculas comparam médias de *E. uniflora* e letras minúsculas comparam médias de *C. hilariana*. O \* indica a significância das interações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Com relação às distâncias da fonte emissora, *E. uniflora* não mostrou uma tendência clara, apenas os maiores efeitos se fizeram visíveis a 200 m e 1400 m da fonte emissora, enquanto que em *C. hilariana*, o maior número de folhas cloróticas ocorreu a 1400 m da fonte emissora (Figura 6-B). Em *E. uniflora*, na última coleta ocorreram as maiores médias de folhas cloróticas observadas em todas as distâncias da fonte emissora (Figura 6-C).

A maior porcentagem de folhas cloróticas, na última coleta de dados de *E. uniflora* e *C. hilariana* (Figura 7-A), confirmou a tendência observada na Figura 6. Em relação às distâncias, *E. uniflora* não mostrou variação e *C. hilariana* apresentou maior porcentagem de clorose a 500 m e 1400 m da fonte emissora (Figura 7-B). Em *E. uniflora* ocorreu interação entre as datas de coleta e as distâncias analisadas. As diferenças ocorreram na quarta data, nas plantas expostas a 500 m e 1400 m da fonte emissora (Figura 7-C).

As avaliações de cloroses em folhas individuais (índice de fitotoxicidade), mostraram efeito mais acentuado de deposição em *E. uniflora*, sendo progressivo em relação às datas de avaliação para as duas espécies estudadas (Figura 8-A). A interação entre as datas de coleta e as distâncias, em *E. uniflora*, foram significativas na última coleta, para as maiores distâncias da fonte emissora (Figura 8-B).

Outro sintoma visual observado nas plantas expostas ao ferro metálico e dióxido de enxofre foi a necrose foliar. Nas duas espécies, o número de folhas necrosadas foi maior na última coleta de dados (Figura 9-A). O número de folhas necrosadas não se modificou em relação as distâncias da fonte emissora, exceto a 500 m em *E. uniflora* e a 200 m em *C. hilariana*, onde houve uma redução. Em *E. uniflora* houve interação entre as datas de avaliação e as estações analisadas, sendo que as plantas localizadas a 1400 m da fonte emissora apresentaram necroses significativas a partir de outubro, enquanto que as plantas localizadas a 800 m e 1700 m da fonte mostraram necroses somente em dezembro. As plantas localizadas mais próximas à fonte emissora ficaram necrosadas apenas na última data de avaliação (Figura 9-C).

A maior porcentagem de folhas necróticas na última coleta de dados, em *E. uniflora*, e a partir da penúltima coleta dos dados em *C. hilariana* (Figura 10-A) confirmaram a tendência observada em número absoluto de folhas necrosadas (Figura 9). A distâncias da fonte emissora não afetou a porcentagem de folhas necrosadas em *E. uniflora*, enquanto que em *C. hilariana* a menor média foi

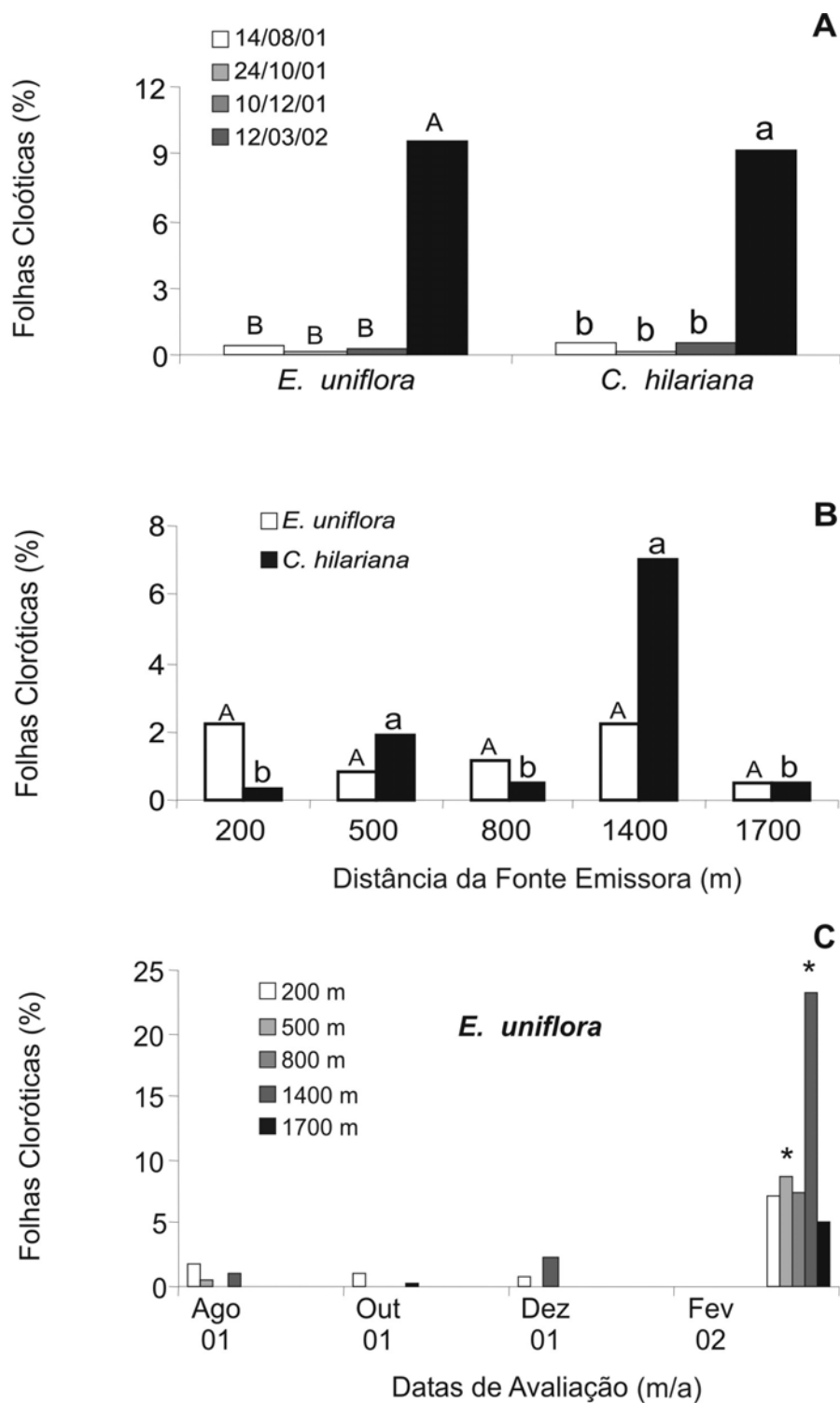


Figura 7 - Folhas cloróticas em *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas às emissões da usina por sete meses, de Agosto de 2001 a Março de 2002, em função de: **A**- Épocas de coleta dos dados; **B**- Distâncias da fonte emissora; **C**- Interações entre as épocas e distâncias, em *E. uniflora*. O \* indica a significância das interações. Letras maiúsculas comparam médias de *E. uniflora* e letras minúsculas comparam médias de *C. hilariana*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

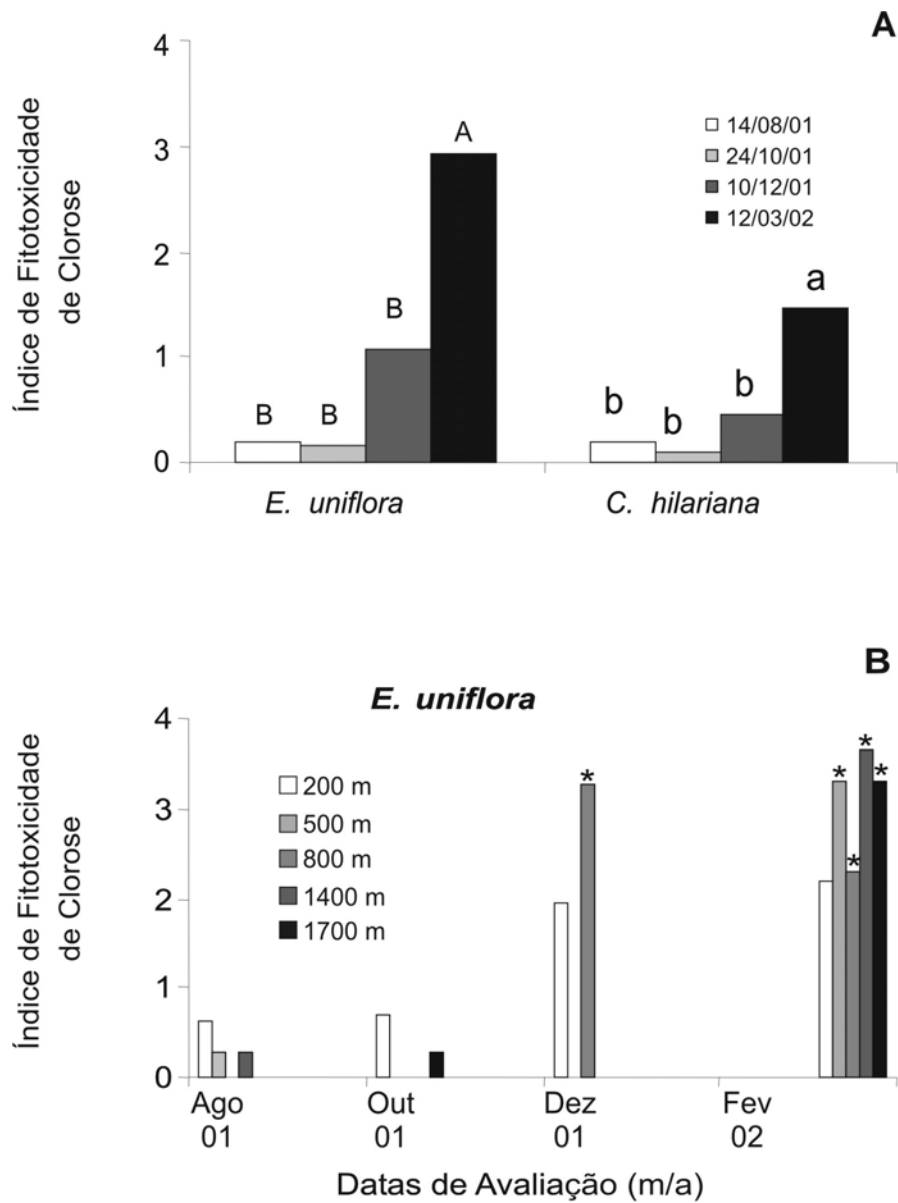


Figura 8 - Índice de fitotoxicidade de clorose em *E. uniflora* e *C. hilariana*, expostas às emissões da usina por sete meses, de Agosto de 2001 a Março de 2002, em função de: A- Épocas de coleta dos dados; B- Interação entre as épocas e distâncias, em *E. uniflora*. O \* indica a significância das interações. Letras maiúsculas comparam médias de *E. uniflora* e letras minúsculas comparam médias de *C. hilariana*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

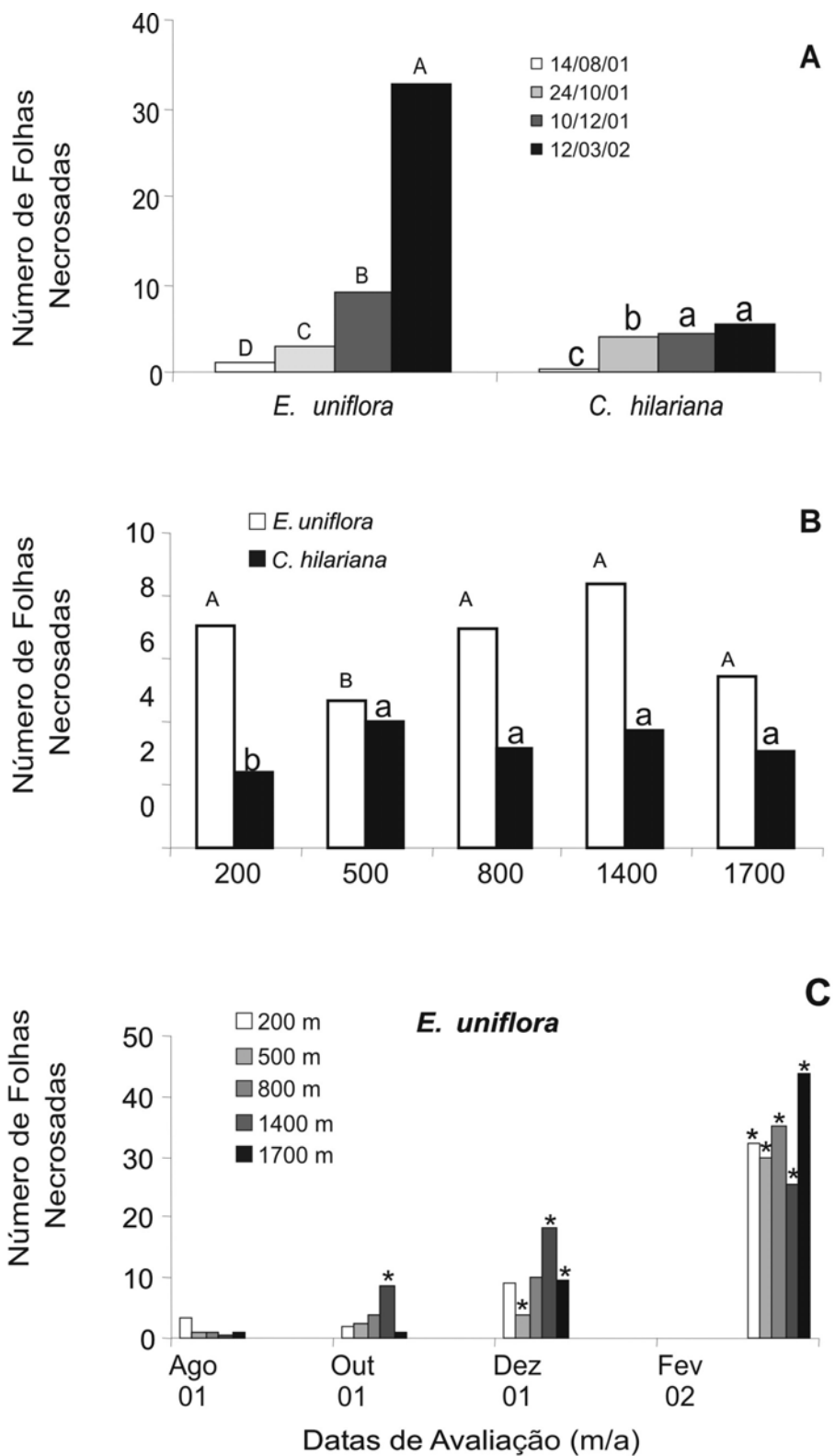


Figura 9- Número de folhas necrosadas em *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas às emissões da usina por sete meses, de Agosto de 2001 a Março de 2002, em função de: **A**- Épocas de coleta dos dados; **B**- Distâncias da fonte emissora; **C**- Interações entre as épocas e distâncias, em *E. uniflora*. O \* indica a significância das interações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

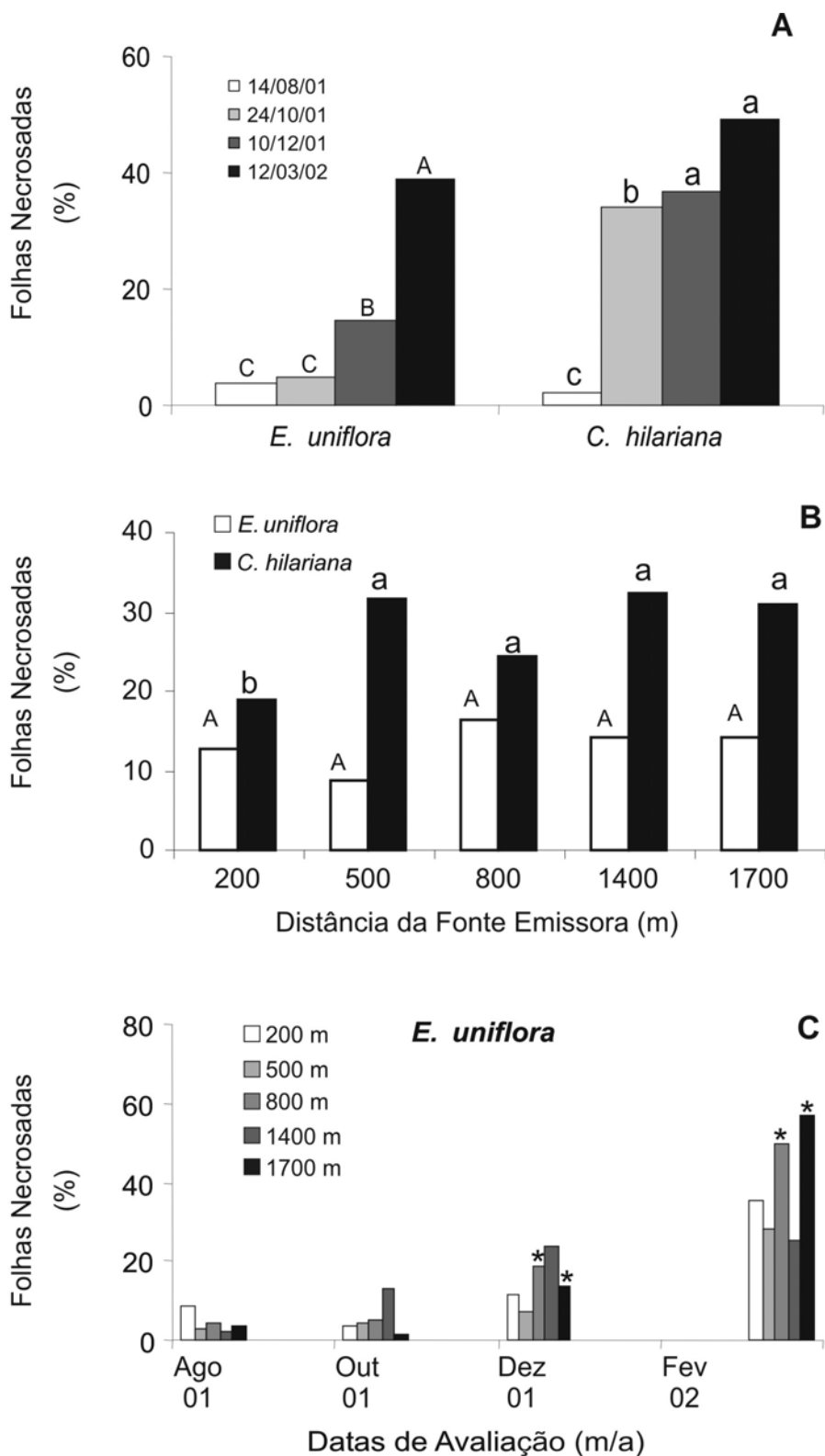


Figura 10- Folhas necrosadas em *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas às emissões da usina por sete meses, de Agosto de 2001 a Março de 2002, em função de: **A-** Épocas de coleta dos dados; **B-** Distâncias da fonte emissora; **C-** Interações entre as épocas e distâncias, em *E. uniflora*. O \* indica a significância das interações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

observada para a menor distância da fonte emissora (Figura 10-B). Em *E. uniflora*, a interação entre datas de coletas e as distâncias foi significativa tendo ocorrido as maiores percentagens de folhas necróticas a 800 m e 1700 m a partir da terceira coleta de dados, no mês de dezembro (Figura 10-C).

A concentração de clorofila diminuiu gradativamente com o decorrer das datas de avaliação para as duas espécies (Figura 11-A). O maior índice SPAD foi observado nas plantas localizadas a 800 m da fonte emissora em *E. uniflora*, enquanto que em *C. hilariana* não foram observadas diferenças significativas entre as distâncias testadas (Figura 11-B).

A permeabilidade iônica total das membranas celulares não se modificou em relação as distâncias da fonte emissora em *E. uniflora*. Em *C. hilariana*, entretanto, a maior permeabilidade iônica foi observada a 500 m da fonte emissora (Figura 12-A). A regressão entre a permeabilidade iônica total e o teor foliar de ferro não mostrou tendência clara em *C. hilariana* e *E. uniflora*. A regressão entre a permeabilidade iônica e o teor foliar de enxofre gerou curva polinomial quadrática em *C. hilariana*, na qual se verificou aumento da permeabilidade iônica à medida que aumentou o teor de enxofre foliar até certo limite, a partir do qual verificou-se efeito contrário (Figura 12-B).

A condutância estomática em *E. uniflora* não se modificou com as distâncias da fonte emissora, enquanto que em *C. hilariana*, houve decréscimo a partir de 800 m (Figura 13-A).

Nas duas espécies estudadas verificou-se tendência de decréscimo na transpiração em relação a distância da fonte emissora. As maiores médias foram registradas a 500 m da fonte emissora em *E. uniflora* e a 200 m e 500 m em *C. hilariana* (Figura 13-B).

A assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, em *E. uniflora*, não modificou em relação a distância da fonte emissora, enquanto em *C. hilariana*, observou-se a maior média a 500 m da fonte emissora, seguida das estações a 200 m e 1700 m de distância (Figura 13-C).

A produção de matéria seca total das duas espécies não alterou significativamente em função da distância da fonte emissora. *E. uniflora* apresentou maior produção de matéria seca (Figura 13-D).

Comparando-se as trocas gasosas das plantas com maior e menor teor de ferro foliar, verificou-se que em *E. uniflora* apenas a fotossíntese foi reduzida,

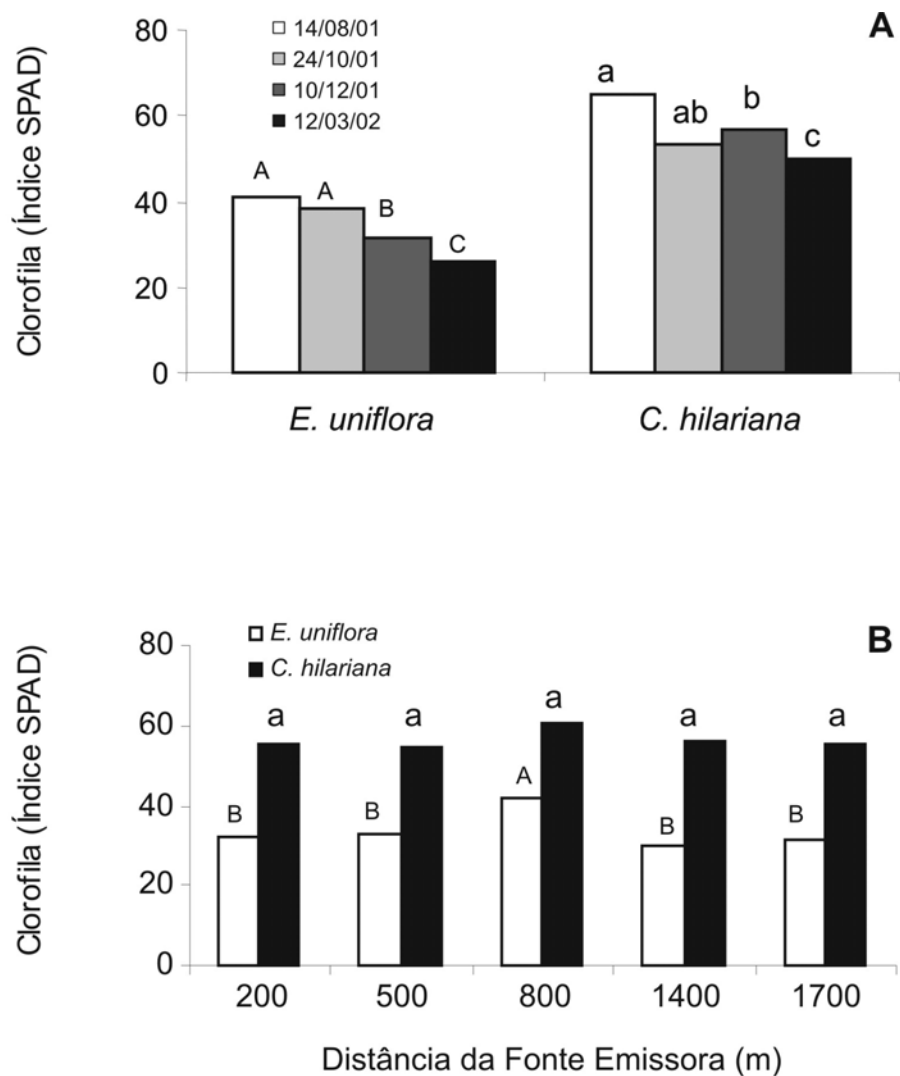


Figura 11- Teor de Clorofila (índice SPAD) em *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas às emissões da usina por sete meses, de Agosto de 2001 a Março de 2002, em função de: **A**- Épocas de coleta dos dados; **B**- Distâncias da fonte emissora. Letras maiúsculas comparam médias de *E. uniflora* e letras minúsculas comparam médias de *C. hilariana*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

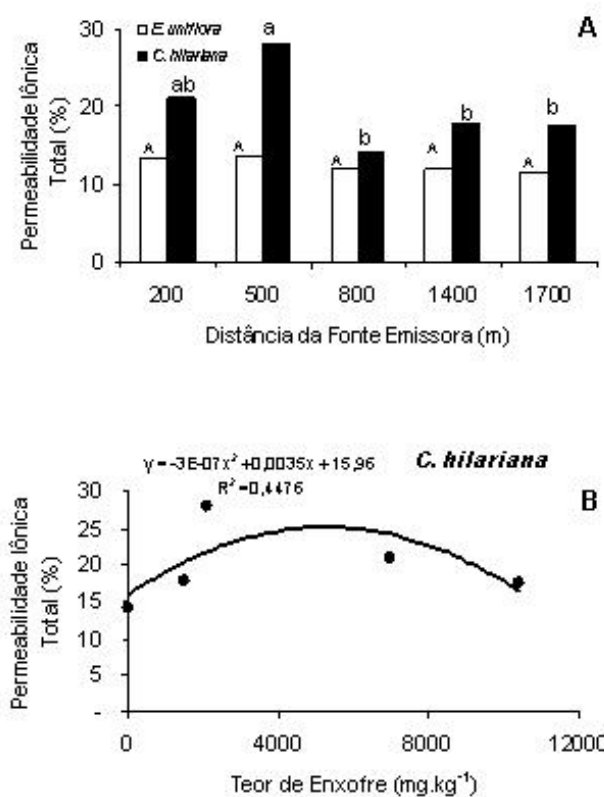


Figura 12- Permeabilidade iônica total em *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas às emissões da usina por sete meses, em função de: **A**- Distâncias da fonte emissora **B**- Conteúdo foliar de enxofre em *C. hilariana*. Letras maiúsculas comparam médias de *E. uniflora* e letras minúsculas comparam médias de *C. hilariana*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

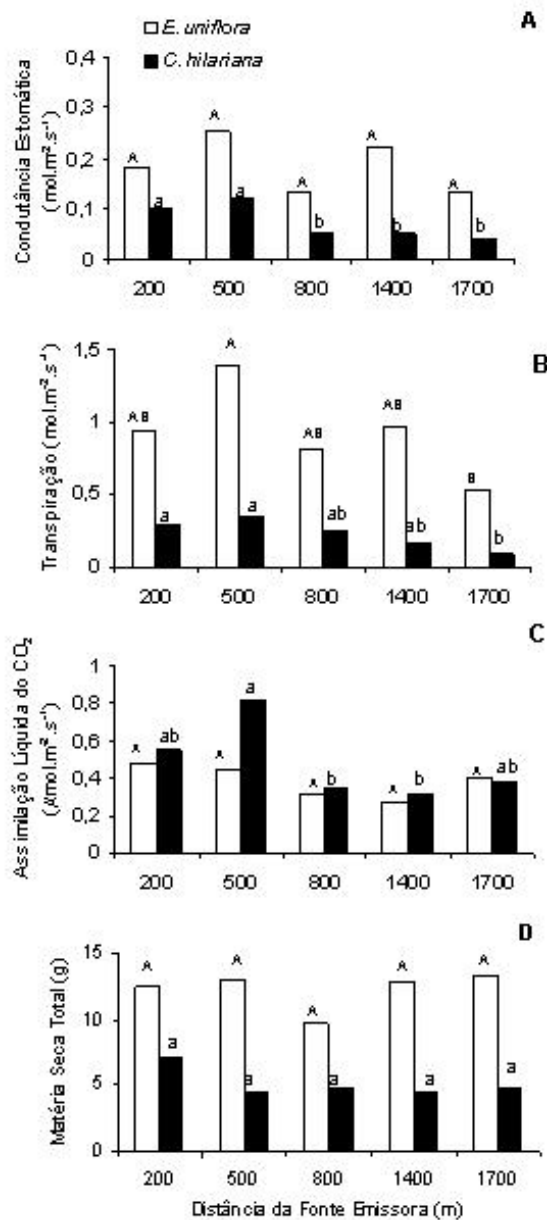


Figura 13- Relações entre trocas gasosas com distâncias da fonte emissora, em *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas à deposição particulada de ferro metálico por sete meses. **A**- condutância estomática ( $g_s$ ); **B**- transpiração ( $E$ ); **C**- assimilação líquida de  $CO_2$  ( $A$ ) e **D**- matéria seca total. Letras maiúsculas comparam médias de *E. uniflora* e letras minúsculas comparam médias de *C. hilariana*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

enquanto que em *C. hilariana*, a condutância estomática e a transpiração aumentaram, proporcionalmente, com o aumento no teor de ferro (Tabela 2).

Os coeficientes de correlação não-linear entre os parâmetros  $g_s$ ,  $E$  e  $A$  e os teores foliares de enxofre foram estimados em: 63% e 98%; 61% e 48%; e 33% e 88% para *E. uniflora* e *C. hilariana*, respectivamente (Figura 14).

#### 4- Discussão e Conclusões

Os dados das emissões de partículas totais em suspensão e de dióxido de enxofre nos sete meses em que o presente experimento foi conduzido comprovaram que a usina de pelletização foi responsável pelo aumento no nível destes poluentes na atmosfera, o qual ultrapassou o padrão secundário de deposição de partículas em suspensão no mês de fevereiro. Com relação ao dióxido de enxofre, os valores emitidos foram aceitáveis de acordo com a resolução nº 3 do Conselho Nacional de Meio Ambiente de 1990. As emissões da usina puderam ser confirmadas pela deposição foliar de ferro e pelas quantificações dos teores de ferro e de enxofre nas plantas de *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas em diferentes distâncias da fonte emissora.

Características do tecido de revestimento das folhas, como cerosidade, em conjunto com características climáticas, como a precipitação pluviométrica e a intensidade do vento estão diretamente envolvidos na deposição e posterior absorção ou lavagem do ferro depositado sobre as folhas. Assim, comparando-se as folhas das espécies estudadas neste trabalho, pôde-se verificar maior retenção foliar de ferro em *E. uniflora* do que em *C. hilariana*. Nestas, provavelmente, por apresentar folhas extremamente cerosas, a precipitação pluviométrica ou o vento foram capazes de reduzir a deposição foliar de ferro, conforme verificado para outros poluentes (MacLean et al., 1989). Como consequência, menor quantidade do ferro depositado foi absorvido em *C. hilariana*.

O teor de ferro total encontrado nas folhas de *E. uniflora* e *C. hilariana*, após sete meses de exposição à deposição particulada, foi superior às suas necessidades de acordo com Larcher, 2000; Dobermann e Fairhurst, 2000. Em *C. hilariana*, localizadas a 1400 m da fonte emissora, o teor de ferro se manteve dentro dos limites de normalidade, embora as plantas tenham apresentado necroses consideráveis. Os teores de ferro nas plantas localizadas a 200 m da fonte emissora chegaram a  $895 \text{ mg.kg}^{-1}$  e  $596 \text{ mg.kg}^{-1}$  em *E. uniflora* e *C.*

Tabela 2 – Comparação nas linhas entre a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração (E) e a fotossíntese (A) em plantas de *E. uniflora* e *C. hilariana* com menor e maior acúmulo de ferro nos tecidos vegetais.

Teor de Ferro	360 mg.k <sup>-1</sup>			3989 mg.kg <sup>-1</sup>		
Parâmetros	$g_s$	E	A	$g_s$	E	A
<b><i>E. uniflora</i></b>	0,19±0,05 A	0,68±0,13 A	0,60*±0,10 A	0,26±0,05 A	0,65±0,08 A	0,30*±0,05 B
Teor de Ferro	93 mg.k <sup>-1</sup>			3092 mg.k <sup>-1</sup>		
Parâmetros	$g_s$	E	A	$g_s$	E	A
<b><i>C. hilariana</i></b>	0,04*±0,00 b	0,09**±0,01 b	0,38±0,09 a	0,07*±0,01 a	0,17**±0,02 a	0,42±0,07 a

\* = significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ); \*\* = significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $P \leq 0,01$ ). Letras maiúsculas comparam médias de *E. uniflora* e letras minúsculas comparam médias de *C. hilariana*.

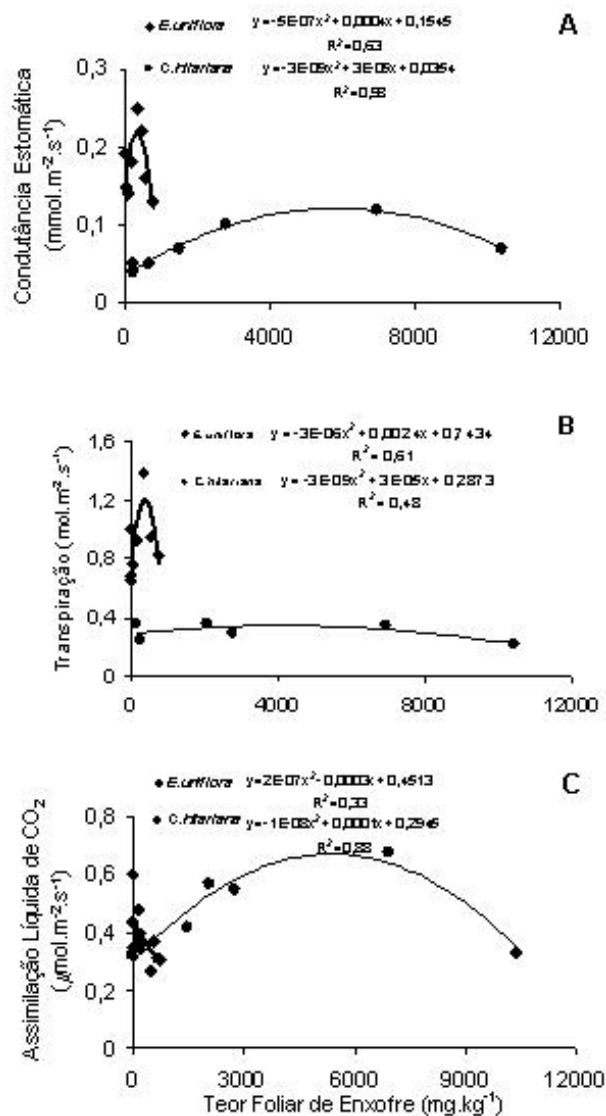


Figura 14- Trocas gasosas em função do teor de enxofre foliar, em *E. uniflora* e *C. hilariana* expostas à deposição particulada de ferro metálico por sete meses. **A**- condutância estomática ( $g_s$ ); **B**- transpiração ( $E$ ); **C**- assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ).

*hilariana*, respectivamente, resultados superiores aos níveis tóxicos admitidos para as plantas cultivadas (Marschner, 1995; Dobermann e Fairhurst, 2000).

*E. uniflora* manifestou uma grande plasticidade produzindo maior número de folhas novas na medida em que aumentaram os dias de exposição. *C. hilariana*, ao contrário, não produziu mais folhas. O ferro e o enxofre, elementos essenciais para as plantas, podem ter agido como fertilizantes foliares em *E. uniflora*, estimulando a produção de biomassa foliar, conforme relatado para *Pinus ponderosa* por Momem et al. (2002).

A altura das chaminés da usina e as condições climáticas parecem ter produzido efeito protetor sobre as plantas de *C. hilariana* localizadas mais próximas a elas, tendo em vista que o número e a percentagem de folhas necrosadas foram menores na estação localizada a 200 m da fonte emissora. Em *E. uniflora*, entretanto, apesar do número de folhas necrosadas ter sido menor nas plantas localizadas a 500 m da fonte emissora, a percentagem de folhas necrosadas nas diferentes estações analisadas permaneceu constante. Estes dados estão de acordo com os apresentados por Lopes et al. (2000) no qual as mudas de uma espécie da família Myrtaceae e de *Sophora tomentosa*, expostas a deposições semelhantes às do presente trabalho, apresentaram as maiores necroses nas plantas localizadas a 800 m e 1400 m da fonte emissora. Segundo Grantz et al. (2003), dependendo das condições climáticas e da topografia, as nano partículas podem permanecer no ar por dias e meses e podem ser transportadas de 1000 a 10.000 km de distância da fonte emissora.

A redução no índice SPAD, nas duas espécies estudadas, indica que dois processos podem estar sendo afetados: a síntese e, ou a degradação da clorofila. A síntese pode estar sendo reduzida, provavelmente em função do ferro depositado, que provoca sombreamento da folha, limitando a radiação incidente, conforme sugere Grantz et al. (2003). A degradação da clorofila, por sua vez, pode ser consequência de estresses oxidativos produzidos pelo excesso de íons ferro livres após a absorção foliar (Sinha et al., 1997; Becana et al. 1998).

Os teores mais elevados de ferro e enxofre foliares encontrados nas plantas de *C. hilariana*, localizadas a 200 m da fonte emissora, foram responsáveis pelos danos nas membranas foliares detectados pela maior permeabilidade iônica total observada nesta estação. Como já citado em outros trabalhos, a poluição altera a integridade das membranas de plantas expostas, permitindo a perda de vários íons das folhas (Sinha et al., 1997; Becana et al.

1998; Tarhanen et al., 1999; Carreras e Pignata, 2001; Garty et al. 2002; Garty et al. 2002).

Os coeficientes de correlação entre a permeabilidade iônica total e o teor foliar de enxofre, em *C. hilariana*, sugerem um efeito do SO<sub>2</sub> sobre as membranas celulares, conforme proposto por alguns autores que estudaram o efeito de outros poluentes em espécies vegetais (Divan Junior, 2002). Segundo Rennenberg et al. (1996) plantas que apresentam o metabolismo ácido das crassuláceas e mantém os estômatos abertos durante a noite ficam expostas a maior quantidade de poluentes aéreos gasosos. Durante o dia, as altas temperaturas permitem maior dissipação das emissões gasosas, ao contrário do que acontece à noite em que as temperaturas mais baixas dificultam a difusão dos gases para o ambiente, ficando as folhas expostas por mais tempo às exposições gasosas. Talvez esta tenha sido a razão para os maiores danos em *C. hilariana* causados pela exposição ao SO<sub>2</sub> do que aqueles observados em *E. uniflora*.

As reduções em  $g_s$ , **E**, e **A** ocorreram nas maiores distâncias da fonte emissora, especialmente em *C. hilariana*, sugerindo um efeito protetor da pluma da chaminé nas plantas localizadas mais próximas à fonte emissora. A altura da chaminé, a velocidade do vento ou ainda, a presença de aerossol marinho podem favorecer a deposição do ferro particulado em maiores distâncias da fonte emissora (Grantz et al., 2003). As plantas que acumularam maiores quantidades de ferro foliar parecem ter sofrido danos nos seus estômatos. Em *E. uniflora* este fato pôde ser constatado pela diminuição na fotossíntese (**A**), apesar de não terem sido observadas variações em  $g_s$  e **E**. Em *C. hilariana*, os aumentos de  $g_s$  e **E** nas plantas com maior teor de ferro não refletiram em aumento em produtividade (**A**). Neste caso, a capacidade dos movimentos de fechamento e abertura dos estômatos parecem ter sido afetados. Robinson et al. (1998) relataram várias alterações estomáticas provocadas por poluentes aéreos, reforçando a dificuldade em generalizar sobre a natureza das alterações fisiológicas devido às variações nas respostas entre as plantas.

Com base nas regressões entre o enxofre foliar e  $g_s$ , **E**, e **A** chegou-se à conclusão que *E. uniflora* não absorveu enxofre, enquanto que *C. hilariana* acumulou cerca de 10 g.kg<sup>-1</sup> de enxofre no material vegetal, dado muito superior ao encontrado por Klumpp et al. (2000) quando expuseram plantas de *Psidium guajava* e *P. cattleyanum* a vários sítios do complexo industrial de Cubatão.

Pode-se concluir que ambas as espécies são bioindicadoras de reação pois apresentaram, em proporções diferenciadas, danos relativos à poluição, podendo ser usadas como bioindicadoras ativas de poluição por deposição particulada e dióxido de enxofre.

## 5- Bibliografia

- ARNDT, U.; SCHLUTLER, C. Wirkungsberzogene erfassung der immisionsbelastung bestimmter waldschadensgebiete in baden-wuerttemberg durch den einsatz von bioindikatoren (aktives monitoring von indikatorpflanzen). Statuskoll. z. Arbeit des PEF, Karlsruhe 5.bis 7.3, p. 17-41, 1985.
- BECANA, M.; MORAN, J.F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, v. 201, n. 1, p. 137-147, 1998.
- CARRERAS. H.A., PIGNATA, M.L. Compararison among air pollutants, meteorological conditions and some chemical parameters in the transplanted lichen *Usnea amblyoclada*. **Environmental Pollution**, v. 111, n. 1, p.45-52, 2001.
- DIVAN JÚNIOR, A.M. **Impacto das emissões de fluoreto em Ouro Preto, MG, avaliados mediante bioindicadores vegetais ativos e passivos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 81p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. **Rice: nutrient disorders & nutrient management**. Potash and Phosphate Institute and International Rice Research Institute, p. 1-4, 2000.
- FOURCROY, P. Iron and oxidative stress in plants. In: SMALLWOOD, M.F., CALVERT, C.M., BOWLES, D.J. (Eds.). **Plant Responses to Environmental Stress**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, p. 51-57, 1999.
- FRANCO, A.C. The genus *Clusia* as na example of studies on plant responses to stress in tropical environments. In: SCARANO, F.R., Franco, A.C. (Eds.). **Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the neotropics**. Series Oecologia Brasiliensis. Rio de Janeiro, Brazil. PPGE-UFRJ, v. IV, p. 65-85, 1989.
- GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, v. 121, n. 1, p. 151-159, 1996.
- GARTY, J.; TAMIR, O.; COHEN, Y.; LEHR, H.; GORENS, A.I. Changes in the potential quantum yield of photosystem II and the integrity of cell membranes relative to the elemental content of the epilithic desert lichen *Ramalina maciformis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 848-858, 2002.

- GARTY, J.; LEVIN, T.; COHEN, Y.; LEHR, H. Biomonitoring air pollution with the desert lichen *Ramalina maciformis*. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 1, p. 267-275, 2002.
- GRANTZ, D.A., GARNER, J.H.B., JOHNSON, D.W. Ecological effects of particulate matter. **Environment International**, v. 29, n. 1, p.213-239, 2003.
- GUERINOT, M.L., YI, Y. Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. **Plant Physiology**, v. 104, n.1, p. 815-820, 1994.
- KLUMPP, A.; DOMINGOS, M.; MORAES, R.M.; LIMA, J.S. Use of subtropical and tropical plant species as bioindicators of air pollution in the vicinity of industrial complexes in Brazil. In: **1. Symposium der A. F. W. Schimper-Stiftung**, Breckle, S.W.; ARNDT, U. (eds.), Stuttgart: Verlag Günter Heimbach, p. 391-395., 2000.
- KÖPPEN, W. Klassifation der Klimate nach temperatur, niederschlag und jahresverlauf, 1918.
- LOPES, S.A.; OLIVA, M.A., MARTINEZ, C.A. Impacto das imissões de dióxido de enxofre e deposição de material particulado de ferro em espécies vegetais de restinga (Anchieta, ES): Avaliação ecofisiológica. In: **Ecotoxicologia – Perspectivas para o século XXI**, ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA NETO, A.L. (eds.), RiMa Artes e textos, São Carlos, p. 53-71, 2000.
- MACLEAN, D.C., SCHNEIDER, R.E., HANSEN, K.S., TROIANO, J.J. Effects of simulated acid rain on uptake, accumulation, and retention of fluoride in forage crops. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 43, n. 1, p. 191-198, 1989.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2 ed., California: Academic Press, California, 889 p., 1995.
- QUEIROZ, R.S. **Avaliação de rede de monitoramento ambiental de dióxido de enxofre e partículas em suspensão da Samarco Mineração**. Relatório, 22p., 1998.
- RENNENBERG, H., HERSCHBACH, C. Responses of plants to atmospheric sulphur. In: YUNUS, M., IQBAL, M. (Eds.). **Plant response to air pollution**. Chincester: John Wiley, p. 285-293, 1996.
- RENNENBERG, H., HERSCHBACH, C.; POLLE, A. Consequences of air pollution on shoot-root interactions. **Journal of Plant Physiology**, v. 148, n. 1, p. 269-301, 1996.
- RESOLUÇÕES CONAMA 1984 a 1991. **Resolução CONAMA nº 003/90**. 4.ed. Brasília, DF., p. 199-205, 1992.
- ROBINSON, M.F.; HEATH, J.; MANSFIELD, T.A. Disturbances in stomatal behaviour caused by air pollutants. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 1, p. 461-469, 1998.

- SINHA, S.; GRUPTA, M.; CHANDRA, P. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: response of antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, n. 1, p. 286-291, 1997.
- STEUBING, L.; FRANGMEIER, A. Pflanzen ökologisches praktikum – Gelände und laborpraktikum der terrestrische pflanzenökologie. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 205 p, 1992.
- TARHANEN, S.; METSÄSARINNE, S.; HOLOPAINEN, T.; OKSANEN, J. Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. **Environmental Pollution**, v. 104, n. 1, p. 121-129, 1999.
- VANSUYT, G.; LOPEZ, F.; INZÉ, D.; BRIAT, J.; FOURCROY, P. Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene in *Brassica napus*. **FEBS Letters**, v. 410, n. 1, p. 195-200, 1997.

## CAPÍTULO 2

### ACÇÃO DA CHUVA ÁCIDA SOBRE *Eugenia uniflora* E *Clusia hilariana*.

RESUMO – Com o objetivo de avaliar os efeitos bioquímicos, fisiológicos, anatômicos da chuva ácida sobre *Clusia hilariana* Schlecht. e *Eugenia uniflora* L., cultivados em solo removido de uma usina de pelotização, localizada no município de Anchieta, ES, mudas de 6 meses de idade, foram submetidas à chuva ácida simulada, com pH 3,0 e à chuva controle com pH 6,5. A chuva simulada foi aplicada entre 9:00 e 11:00, correspondendo a 14,03 mm por dia, durante 40 dias. No final das 40 simulações foram avaliadas: a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ), a assimilação líquida de  $CO_2$ , a relação  $CO_2$  interna/ $CO_2$  externa ( $C_i/C_A$ ), a fluorescência da clorofila, as taxas de crescimento, o índice de fitotoxicidade das plantas, a quantificação das clorofilas **a** e **b** e carotenóides, a permeabilidade das membranas em discos foliares, as atividades enzimáticas de peroxidase, catalase e dismutase do superóxido, além das observações em microscópios fotônico e eletrônico de varredura. Em nenhuma das espécies a altura das plantas foi modificada e apenas as mudas de *Eugenia uniflora* apresentaram maior índice de fitotoxicidade de necroses quando expostas à chuva ácida simulada. A  $g_s$ ,  $E$ ,  $A$  e  $C_i/C_A$  nas duas espécies não apresentaram diferenças em relação ao tratamento controle. Em *E. uniflora*, os teores de clorofila **a**, clorofila **b** e carotenóides apresentaram redução nas médias das plantas tratadas, enquanto que em *C. hilariana*, não foi verificada alteração nas médias. A relação  $F_v/F_m$ , por sua vez, aumentou apenas nas plantas de *E. uniflora* tratadas com pH 3,0. Em nenhuma das espécies ocorreu aumento da permeabilidade de membranas nas plantas expostas à chuva simulada. Em *E. uniflora*, apenas a atividade da peroxidase aumentou com o tratamento, enquanto que em *C. hilariana*, as atividades da dismutase do superóxido, da peroxidase e da catalase aumentaram após as 40 simulações. Necroses pontuais foram visualizadas em menor número em *C. hilariana* do que em *E. uniflora*. *E. uniflora* apresentou necroses atingindo, às vezes, apenas a epiderme adaxial e parte do parênquima paliádico e, outras vezes, se estendendo por toda a lâmina foliar, com diferenciação de tecido de cicatrização, hipertrofia e hiperplasia de algumas células. Ocorreu rompimento da cera epicuticular e alterações na epiderme das duas faces da folha, os estômatos apresentaram ostíolos deformados e houve ruptura da crista estomática. *C. hilariana* apresentou necroses na margem e na face abaxial da folha, evidenciando-se células com aspecto plasmolisado e inteiramente colapsadas, quando comparadas com o controle. Verificou-se tecido de cicatrização, escamação da cera epicuticular, perfurações pontuais e irregularidade no arranjo das células epidérmicas adaxiais, assim como células subsidiárias retorcidas. As diferenças estruturais entre essas duas espécies podem indicar a maior susceptibilidade de *E. uniflora* à chuva ácida, quando comparada com *C. hilariana*.

**Palavras chave:** Chuva ácida, plantas nativas, *Clusia hilariana* Schlecht., *Eugenia uniflora* L.

**SUMMARY- Acid rain effect upon *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*** – In order to evaluate the biochemical, physiological and anatomic effects of acid rain on restinga species, *Clusia hilariana* and *Eugenia uniflora* were submitted to simulated acid rain, pH 3.0 and pH 6.5 (control). The saplings of both species were cultivated on original soil from a nearby iron ore factory, located at Anchieta county, ES. The treatments were conducted in a close chamber and the acid rain applied for 40 days, between 9 and 11 A.M., making up to a 14.03 mm per day of daily rain. At the end 40<sup>th</sup> rain simulation, it was evaluated: the stomatal conductance ( $g_s$ ), the transpiration (**E**), the CO<sub>2</sub> net assimilation (**A**), the **CI/CA** ratio, chlorophyll content, growth rate, phytotoxicity index, chlorophylls and carotenoids quantification, membrane permeability on foliar discs, peroxidase, catalase and superoxide dismutase activity and anatomical recording on optical and electronic scanning microscopes. In none of the species the plant height was affected, however *E. uniflora* saplings had a greater necroses phytotoxicity index, when exposed to the simulated acid rain. The  $g_s$ , **E** and **A** values, of both species, did not show any significantly difference between the mean values on both treatments. The chlorophylls a, b and carotenoids mean contents of *E. uniflora* plants treated with acid rain pH 3.0, were significantly lower than saplings, while *C. hilariana* showed no alterations. The  $F_v/F_m$  ratio was only affected on *E. uniflora* plants submitted to pH 3.0 rain. In none of the species it was verified a difference on the membrane permeability of the plant submitted to pH 3.0 rain. To *E. uniflora*, only the actively of peroxidase increased during the treatment, while *C. hilariana* showed a higher enzyme activity, all three of them, only at the end of the 40<sup>th</sup> acid rain simulation. Necrotic spots were fewer in *C. hilariana* comparing to those observed in *E. uniflora*. In *E. uniflora*, the necroses were usually visualized on the adaxial epidermis and part of palisade parenchyma, but sometime it would expand to the entire leaf surface. The development of scanning tissues, hypertrophy and hyperplasy cells was also observed. The epicuticular wax and the epidermis on both sides of the leaf, were damaged; the stomata showed deformed stomatal pores and rupture of ledges. *C. hilariana*, under pH 3.0 rain, developed necroses on the edge and adaxial surface of the leaves, with appearance similar to plasmolysis and collapsed cells. It was also verified scaring tissues, epicuticular was peeling, punctually perforations and irregularity in the pattern of adaxial epidermal cells, as well as twisted subsidiary cells. The structural differences between the two species analyzed, could indicate that *E. uniflora* is more susceptible to the acid rain than *C. hilariana*.

**Key-Words:** Acid rain, native plants, *Clusia hilariana* Schlecht., *Eugenia uniflora* L.

## 1- Introdução

A chuva ácida é um fenômeno que já atingiu dimensões globais devido a uma série de eventos, dentre os quais se destacam o aumento do parque industrial e o transporte dos poluentes gasosos, podendo alcançar até cerca de mil quilômetros do local de emissão (Mudd e Kozlowski, 1975).

No Brasil, várias cidades convivem com este problema, como São Paulo, Cubatão, Volta Redonda e Rio de Janeiro (Alves et al., 1990; Alves e Oliva, 1993; Alves et al., 2001; Melo, 2001; Rocha et al., 2003). No Rio de Janeiro, o pH da precipitação variou de 3,5 a 6,85 em 1988 (Melo, 2001). A vegetação da Serra do Mar, em Cubatão, foi alterada devido à precipitação ácida (Klumpp et al., 1994; Alves et al., 1990; Alves e Oliva, 1993) e aos poluentes gasosos (Klumpp et al., 1994; Domingos et al., 1998; Domingos et al., 2000; Moraes et al., 2000).

Por definição, chuva ácida é aquela cujo valor de pH é inferior a 5,7, e se origina quando os óxidos de enxofre e de nitrogênio reagem com a água da atmosfera, formando os ácidos sulfúrico e nítrico. Os íons mais representativos na chuva ácida são:  $H^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $Cl^-$ ,  $PO_4^{3-}$  (Cowling e Linthurst, 1981; Evans, 1984; Singh e Agrawal, 1996).

Os efeitos da chuva ácida nas plantas são: redução ou estímulo no crescimento, inibição da germinação de sementes, inibição da nodulação e da fixação de nitrogênio em leguminosas, remoção da cera epicuticular e de constituintes da cutícula, alterações nas trocas gasosas e nas taxas respiratórias, redução dos teores de clorofilas a e b e da taxa fotossintética, aumento na lixiviação de nutrientes (K, Ca, Mg, Na e Mn) das folhas, clorose e necrose das folhas e intoxicação celular decorrentes de distúrbios enzimáticos (Dekock et al., 1960; Mudd e Kozlowski, 1975; Kozlowski, 1980; Evans, 1984; Percy, 1986; Singh e Agrawal, 1996; Fan e Wang, 2000).

As plantas em crescimento são particularmente susceptíveis à poluição, ocorrendo alterações no metabolismo, antes que sintomas visíveis sejam notados (Mudd e Kozlowski, 1975; Kozlowski, 1980), e por diferirem em sua sensibilidade aos poluentes atmosféricos podem ser usadas como bioindicadoras da qualidade do ar (Ellenberg, 1991; Pignata et al., 2002).

Dentre as alterações metabólicas mais marcantes verificadas nas plantas expostas à chuva ácida, destacam-se as observadas no sistema antioxidativo, no qual enzimas e, ou outros metabólitos aumentam sua atividade e, ou concentração para reduzir e, ou inativar as formas reativas de oxigênio (ROS)

produzidas. Algumas das enzimas envolvidas neste processo são a dismutase do superóxido, a peroxidase e a catalase (Fourcroy, 1999; Mittler, 2002).

Ao contrário do que ocorre com os poluentes aéreos gasosos, os componentes químicos da água da chuva penetram nas folhas principalmente através dos microporos da cutícula ou, menos freqüentemente, através dos estômatos. A precipitação ácida pode mudar as características superficiais da folha, alterando a estrutura das camadas de cera epicuticular importantes na capacidade de umedecimento da superfície das folhas ou na penetração da água da chuva nos tecidos foliares (Kerstiens, 1994; Percy et al., 1994). O tipo de cera epicuticular, a topografia da superfície cuticular, o tipo e a distribuição de tricomas e a forma das células epidérmicas são características estruturais das folhas que podem estar relacionadas às diferenças de sensibilidade das plantas aos poluentes atmosféricos (Evans et al., 1977; Nouchi, 1992). A caracterização da anatomia e da micromorfologia foliar das plantas é, portanto, componente imprescindível para se estabelecer uma possível correlação entre estas características do tecido epidérmico e a sensibilidade aos agentes poluentes.

O presente trabalho foi desenvolvido utilizando-se espécies vegetais que ocorrem na restinga do Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV), em cuja região está situada uma usina de pelotização de grande porte, responsável pela emissão de poluentes que podem provocar a formação de chuva ácida. A escassez de dados sobre os efeitos de poluentes em espécies florestais tropicais reforça a importância deste estudo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos bioquímicos, fisiológicos e anatômicos da chuva ácida sobre *Clusia hilariana* e *Eugenia uniflora*, cultivados em solo removido de uma usina de pelotização.

## **2- Material e Métodos**

As espécies vegetais *Clusia hilariana* Schlecht. (Clusiaceae) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), provenientes do viveiro do Parque Estadual Paulo César Vinha, localizado no município de Guarapari, no Espírito Santo, foram utilizadas nos experimentos conduzidos na Unidade de Crescimento de Plantas da Universidade Federal de Viçosa.

As mudas foram obtidas pela germinação de sementes em solo da restinga. Após padronização no tamanho, no estado fitossanitário e na idade,

mudas de 6 meses foram transferidas para vasos de 2,5 litros preenchido com solo coletado na região da usina de pelletização (Quadro 1).

Quadro 1- Características do solo coletado na fazenda da usina de pelletização.

PARÂMETRO	pH	P	K	Na	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H + Al	SB	(t)	(T)
UNIDADE	H <sub>2</sub> O	mg/dm <sup>3</sup>			cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>						
RESULTADO	<b>5,85</b>	-	<b>0,7</b>	<b>36</b>	-	<b>2,13</b>	<b>0,82</b>	<b>0,0</b>	<b>2,8</b>	<b>3,04</b>	<b>3,04</b>

PARÂMETRO	V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	u	B	S
UNIDADE	%			dag/kg	mg/L	mg/dm <sup>3</sup>					
RESULTADO	<b>5,84</b>	<b>2,1</b>	<b>0,0</b>	<b>2,67</b>	<b>40,3</b>	-	-	-	-	-	-

As mudas foram submetidas à chuva ácida simulada constituída de água acidulada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até pH 3,0 e à chuva com pH 6,5, no qual o pH da água desionizada foi ajustado com solução diluída de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Para simulação das chuvas foram utilizadas duas câmaras, adaptadas por Alves (1988), a partir do modelo proposto por Evans et al. (1977), uma para controle e uma para a chuva ácida.

As plantas foram submetidas à chuva simulada de 14,03 mm por dia no período de 9:00 e 11:00, durante 40 dias consecutivos. Antes e depois da exposição, as plantas ficaram expostas durante 15 minutos a uma irradiância de 14,7 μmol de fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Nas duas espécies foram determinados parâmetros fenológicos, fisiológicos, bioquímicos e anatômicos.

No início e ao final do experimento foram medidas as alturas das plantas e o aparecimento de cloroses, necroses e determinados o índice de fitotoxicidade de necroses das plantas. Para isto, três avaliadores atribuíram notas, obedecendo à seguinte escala: 0- sem necrose; 1- com necrose em até 25% da área foliar; 2- com necrose em 26 a 50% da área foliar; 3- necrose em 51 a 75% da área foliar e 4- de 76 a 100% da área foliar.

As medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila foram realizadas em folhas adultas, ao final das 40 simulações. A condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), fotossíntese ( $A$ ) e a relação  $CO_2$  interna/ $CO_2$  externa ( $CI/CA$ ) foram medidas com o auxílio de um analisador de gases no infravermelho (IRGA, modelo LCA-4, da Analytical Development Co.). A fluorescência da clorofila a foi medida por um fluorômetro (Plant Efficiency Analyser, da Hansatech Instruments Inc.). As medições das trocas gasosas foram feitas entre 7:00 e 10:00 horas da manhã em *E. uniflora* e entre 21:00 e 23:00 horas em *C. hilariana*, devido ao metabolismo ácido das crassuláceas apresentado por esta espécie. A fluorescência da clorofila foi medida às 10:00 horas nas duas espécies.

Para a quantificação das clorofilas **a**, **b** e dos carotenóides em folhas adultas, no final das 40 simulações, amostras do material vegetal congelado a  $-80^\circ C$ , por uma semana, foi homogeneizado em acetona 80% com a adição de bicarbonato de cálcio e areia lavada. Após centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos a  $10^\circ C$ , os teores de clorofilas e de carotenos foram determinados por espectrofotometria segundo método proposto por Lichtenthaler (1987).

A permeabilidade das membranas foi determinada em 15 discos foliares de folhas adultas de *E. uniflora* e 10 discos de *C. hilariana* (com 5 mm de diâmetro cada). Os discos foliares, previamente pesados e lavados, foram colocados em água desionizada durante 4 horas e, então, foi medida a condutividade elétrica inicial da solução (i). Em seguida, as soluções foram transferidas para estufa a  $90^\circ C$  por duas horas, para rompimento das membranas celulares e, após resfriamento, foi medida a condutividade elétrica final (f). A permeabilidade das membranas foi calculada pela fórmula  $i/(i+f) \times 100$ , conforme citado por Tarhanen et al., 1999.

No final da última chuva simulada, foram medidas as atividades enzimáticas de peroxidase, catalase e dismutase do superóxido.

Amostras de 0,3 g de tecido fresco de folhas adultas de *E. uniflora* e *C. hilariana* foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8, e EDTA 0,1 mM, em almofariz de porcelana, filtradas através de quatro camadas de gaze e centrifugadas a  $12.000 \times g$  durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados nos testes enzimáticos. Todo o processo foi realizado a  $4^\circ C$ .

A atividade da peroxidase (POD EC1.11.1.7) foi determinada pela adição de 100  $\mu l$  do extrato enzimático bruto a 4,9 ml do meio de reação constituído de

tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM, à 25°C (Kar e Mishra, 1976). O aumento na absorvância a 420 nm foi medido durante os dois primeiros minutos de reação e utilizado no cálculo da quantidade de purpurogalina formada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehley, 1955).

A atividade da catalase (CAT EC1.11.1.6) foi determinada pela adição de 500 µl do extrato enzimático bruto a 2,9 ml do meio de reação constituído de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 a 30°C (Havir e McHALE, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm, nos dois primeiros minutos foi medido e utilizado no cálculo da quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gasta, utilizando o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Anderson et al. 1995).

A atividade da dismutase do superóxido (SOD EC1.15.1.1) foi determinada pela adição de 50 µl do extrato enzimático bruto a 2,95 ml do meio de reação constituído de metionina 13 mM, azul de *p*-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 100 nM e riboflavina 2 µM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 (Del Longo et al., 1993). A reação foi desenvolvida numa câmara fechada e forrada com papel alumínio, a qual continha no seu interior uma lâmpada fluorescente de 15 W. O início da reação se deu acendendo-se a lâmpada e o final, após 15 minutos, com o desligamento da mesma. A produção de formazana azul resultante da fotorredução do NBT, foi medida pelo incremento na absorvância a 560 nm. Para o "branco" utilizou-se a mesma mistura de reação anterior, mas mantendo-se o sistema no escuro. A atividade enzimática foi expressa em unidade SOD, conforme sugerido por Beauchamp e Fridovich (1971).

Para microscopia fotônica, amostras da lâmina foliar foram fixadas segundo Karnovsky (1965), desidratadas em série etílica/butílica, e incluídas em parafina. Cortes transversais, com 10 µm de espessura, foram corados com fucsina e azul de Astra e montados em "permount". Após observação, foi feita documentação fotográfica, utilizando-se um fotomicroscópio (OLYMPUS AX70) equipado com sistema U-photo.

As amostras para microscopia eletrônica de varredura foram fixadas segundo Karnovsky (1965) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%). Após desidratação do material em série etílica, foi realizada a secagem em ponto crítico, o material vegetal foi fixado em "stub" utilizando-se fita adesiva dupla e, posteriormente, cobertura metálica com ouro. A documentação foi feita em microscópio "JEOL T200".

O desenho experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5%, para comparação.

### **3- Resultados**

#### **- Avaliações do crescimento e fitotoxicidez**

Como o coeficiente de variação foi elevado, apesar das médias de altura da planta em *E. uniflora* terem sido bastante diferentes, não se detectou diferença significativa. No caso de *C. hilariana*, as médias foram semelhantes e, também, não se detectou diferença significativa entre as mudas expostas e não expostas à chuva ácida (Figura 1-A).

As mudas de *Eugenia uniflora*, submetidas à chuva ácida, apresentaram várias necroses pontuais, diferindo estatisticamente do tratamento controle (Figura 1-B), ao contrário do observado em *Clusia hilariana*, na qual foram visualizadas raras necroses pontuais (Figuras 1-B).

#### **- Avaliações bioquímicas e fisiológicas**

Após as 40 simulações ácidas consecutivas observou-se que, tanto em *E. uniflora* quanto em *C. hilariana*, a  $g_s$ , a **E** e a **A** das plantas tratadas foram similares às das plantas controle (Tabela 1).

No 40° dias de exposição à chuva ácida foram observadas em *E. uniflora* reduções significativas das clorofilas **a**, **b** e carotenóides. Em *C. hilariana*, nenhuma das variáveis foi modificada, inclusive os teores de clorofilas e caroteno (Tabela 1).

A razão  $F_v/F_m$  aumentou cerca de 6% em *E. uniflora*, mas não foi afetada em *C. hilariana*, após 40 dias de exposição à chuva ácida (Tabela 1).

A permeabilidade iônica total das membranas celulares, também, não foi alterada com a chuva ácida nas duas espécies estudadas (Figura 2).

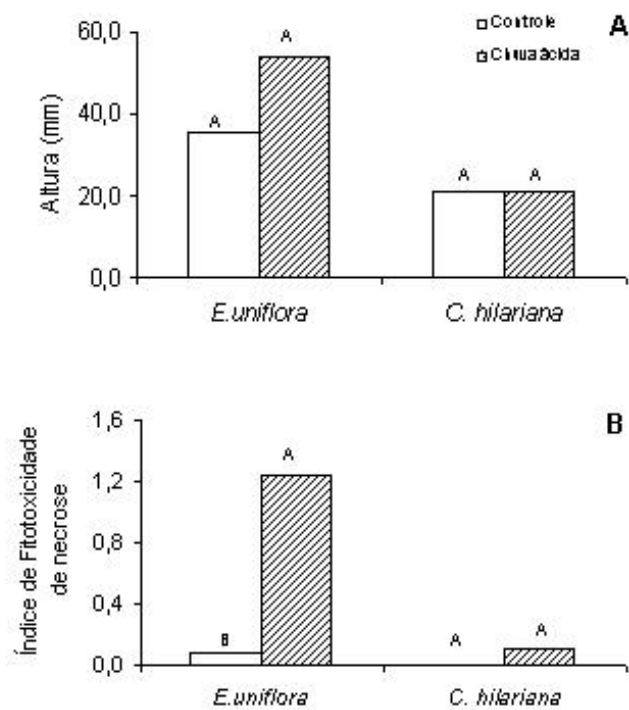


Figura 1 - Efeito da deposição ácida em *Eugenia uniflora* e *Clusia hilariana* sobre a altura das mudas (A) e o índice de fitotoxidade de necrose (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 1- Condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração (**E**), assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (**A**), relação CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> externo (**Ci/Ca**), clorofila **a**, clorofila **b**, caroteno e razão F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, medidos após 40 dias de chuva simulada em *E. uniflora* (A) e *C. hilariana* (B).

**A**

<i>E. uniflora</i>								
Chuva Simulada	$g_s$	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>Ci/Ca</b>	Clorofila <b>a</b>	Clorofila <b>b</b>	caroteno	F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>
	mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	mmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	-	mg.g <sup>-1</sup> MF	mg.g <sup>-1</sup> MF	mg.g <sup>-1</sup> MF	-
Controle pH 6,5	0,08±0,01 A	1,07±0,06 A	4,19±0,68 A	0,72±0,03 A	0,78**±0,06 A	0,36**±0,02 A	75,38**±5,06 A	0,69*±0,01 B
Chuva Ácida pH 3,0	0,12±0,02 A	1,48±0,12 A	5,89±0,73 A	0,72±0,01 A	0,13**±0,01 B	0,06**±0,01 B	13,65**±1,17 B	0,73*±0,02 A

**B**

<i>C. hilariana</i>								
Chuva Simulada	$g_s$	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>Ci/Ca</b>	Clorofila <b>a</b>	Clorofila <b>b</b>	caroteno	F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>
	mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	mmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	-	mg.g <sup>-1</sup> MF	mg.g <sup>-1</sup> MF	mg.g <sup>-1</sup> MF	-
Controle pH 6,5	0,02±0,01 a	0,35±0,07 a	2,81±0,67 a	0,72±0,03 a	0,04±0,01 a	0,02±0,01 a	4,22±0,80 a	0,80±0,00 a
Chuva Ácida pH 3,0	0,02±0,00 a	0,32±0,04 a	2,66±0,59 a	0,72±0,01 a	0,03±0,01 a	0,01±0,00 a	3,50±0,32 a	0,80±0,00 a

\* = significativo ao nível de 5% de probabilidade (p≤0,05); \*\* = altamente significativo (P≤0,01).

Letras maiúsculas comparam médias de *E. uniflora* e letras minúsculas, de *C. hilariana*.

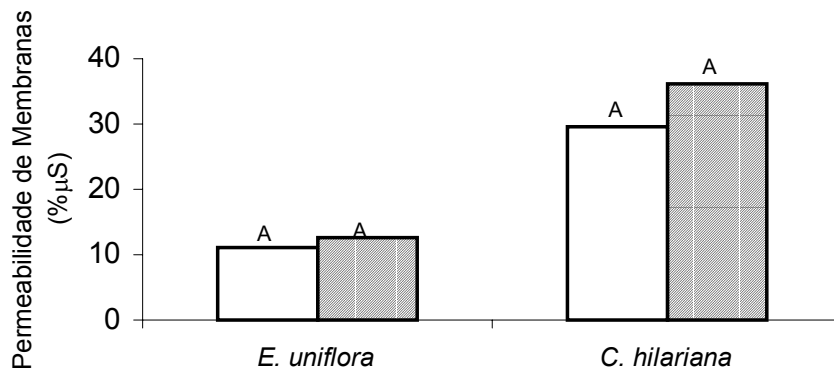


Figura 2- Efeito da chuva ácida sobre a permeabilidade de membranas de *E. uniflora* e *C. hilariana*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A atividade da SOD somente foi alterada pela chuva ácida em *C. hilariana*, na qual se observou um aumento de 30% em relação às plantas controle (Figura 3). A atividade da peroxidase, entretanto, aumentou nas duas espécies com aproximadamente mesma intensidade. A atividade da catalase, à semelhança do que aconteceu com a SOD, somente aumentou com a aplicação de chuva ácida em *C. hilariana* (Figura 3).

**- Alterações morfológicas e micromorfológicas apresentadas por *E. uniflora* expostas à chuva ácida:**

A lâmina foliar de *E. uniflora* é dorsiventral e hipoestomática, composta por uma camada de parênquima paliçádico, contendo cristais de oxalato de cálcio do tipo drusas ou cristais prismáticos, e 7 a 8 camadas de parênquima lacunoso. A nervura foliar é formada por feixes bicolaterais, envolvidos por uma bainha parenquimatosa, contendo fibras nas faces dorsal e ventral. Apresenta colênquima anelar como tecido de sustentação comunicando-se com as fibras em ambas as faces. O mesofilo encontra-se interrompido, em algumas regiões, por glândulas arredondadas, chamadas bolsas secretoras, contendo duas células de revestimento em sua parte superior, o que é característico da espécie (Figura 4), como relatado por Fontenelle et al. (1994).

As plantas de *E. uniflora*, submetidas à chuva ácida, apresentaram necroses por toda a lâmina foliar, principalmente nas nervuras mediana e no limbo foliar. Algumas vezes, verificaram-se necroses atingindo toda a lâmina

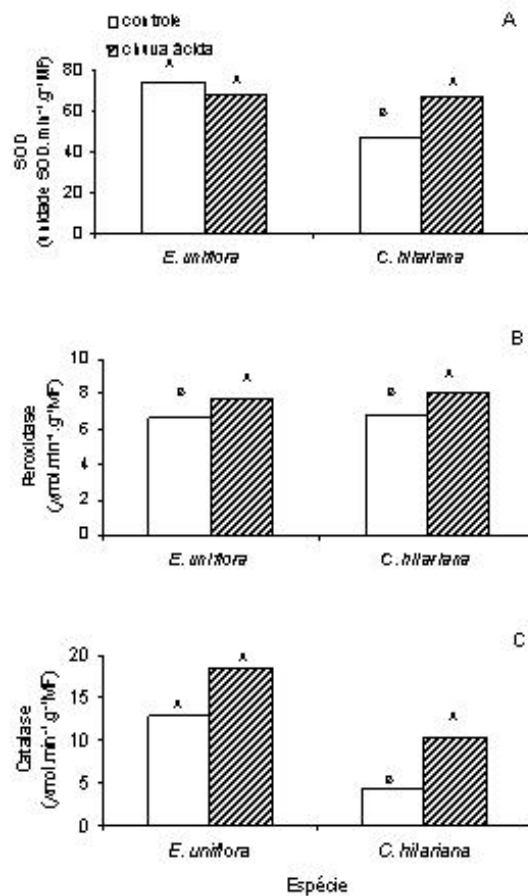
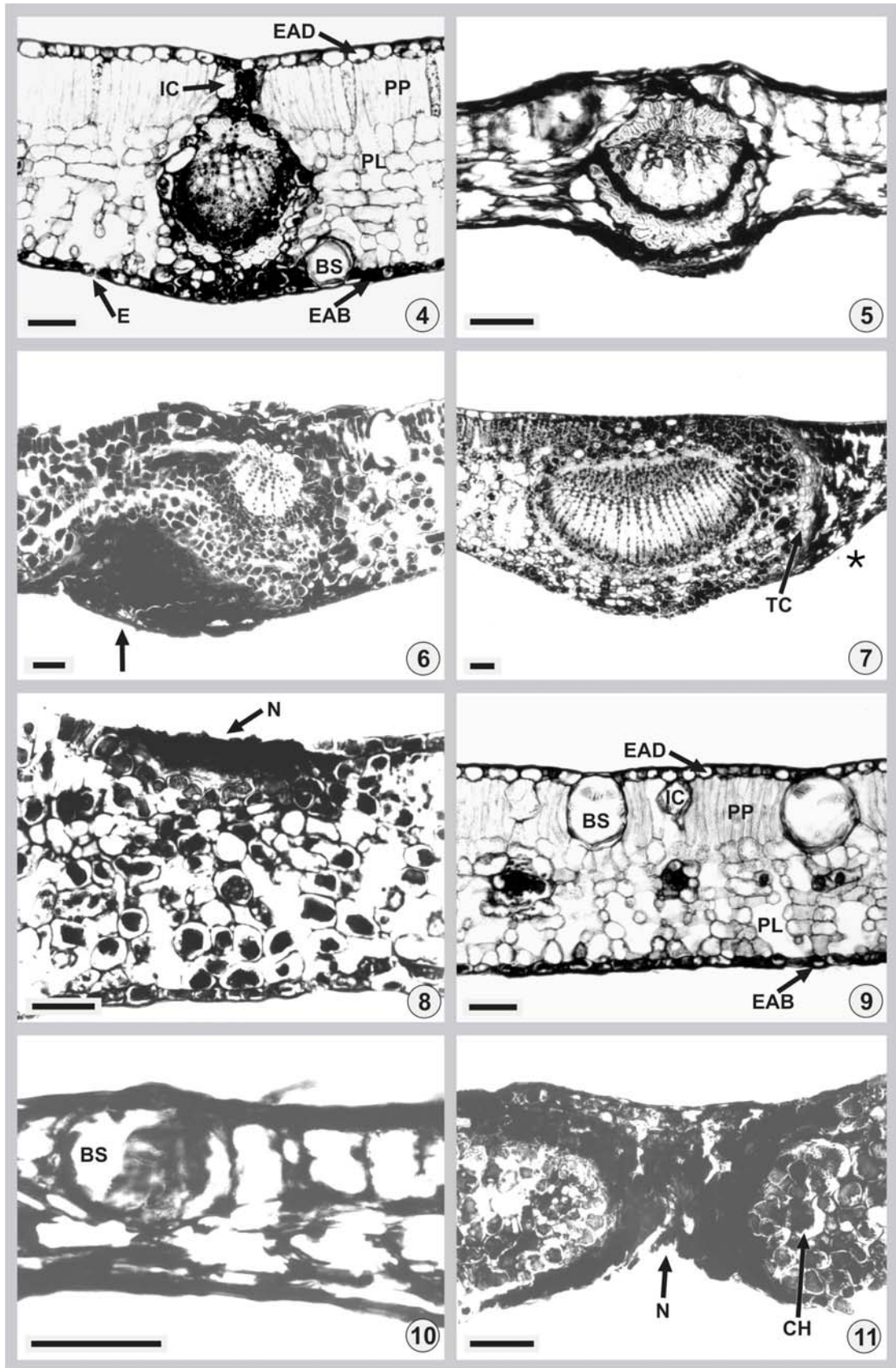


Figura 3 - Atividade da dismutase do superóxido (A), da peroxidase (B) e da catalase (C) em *E. uniflora* e *C. hilariana*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Figuras 4 a 11- Cortes transversais da lâmina foliar de *Eugenia uniflora* observados ao microscópio fotônico. **Figura 4-** Nervura mediana da planta controle. **Figuras 5 a 7-** Alterações nas nervuras medianas expostas à chuva ácida. **Figuras 8, 10 e 11-** Alterações no limbo foliar provocadas pela chuva ácida. **Figura 9-** Controle do limbo foliar. EAD - epiderme adaxial, EAB - epiderme abaxial, IC - idioblasto cristalífero, PP - parênquima paliçádico, PL - parênquima lacunoso, BS - bolsa secretora, E - estômato, Seta - hipertrofia, TC - tecido de cicatrização, \* - colapso do mesofilo, N - necrose, CH - célula com hiperplasia. Barras = 50 µm.



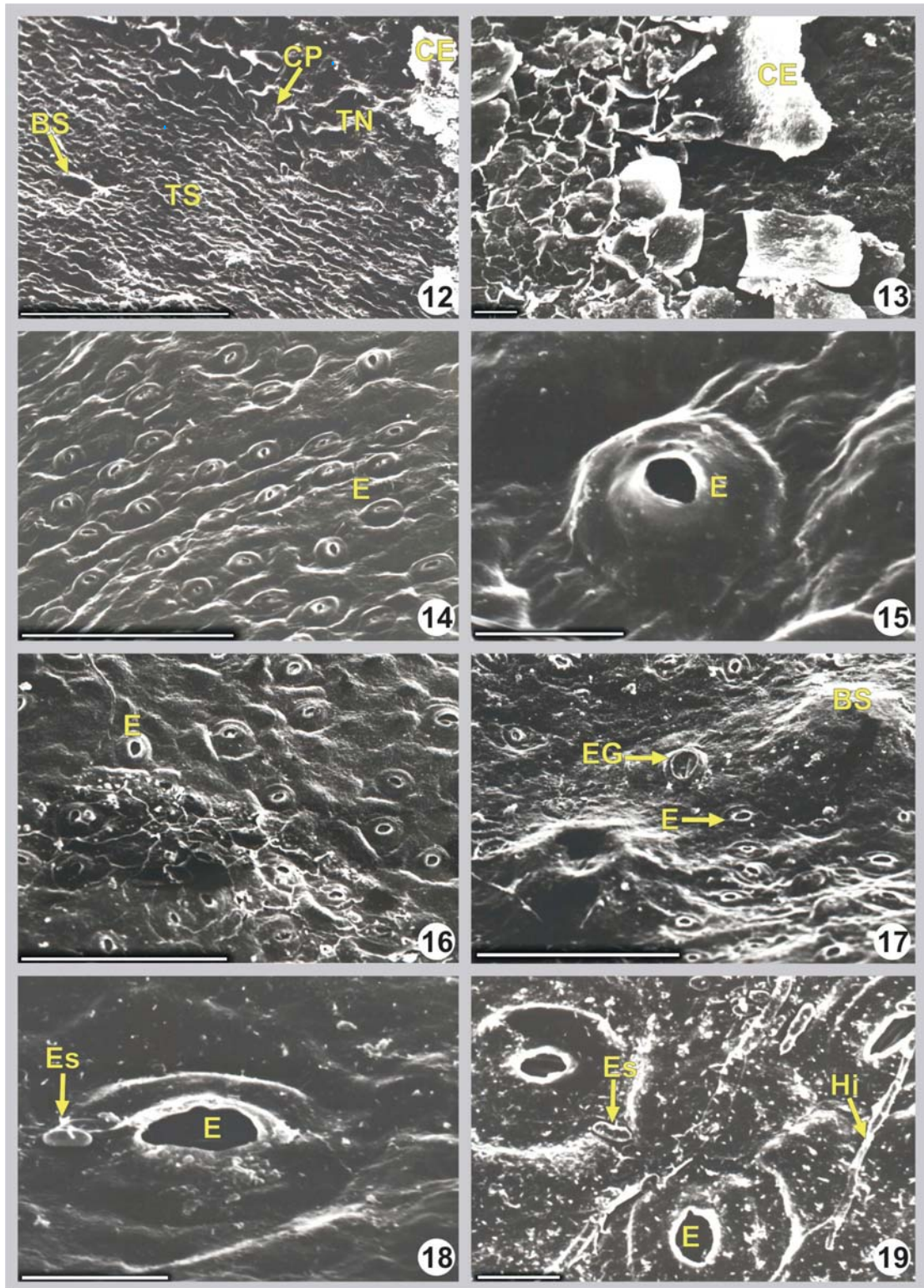
foliar, colapsando todos os tecidos foliares, inclusive a nervura principal. Nesta pôde-se reconhecer apenas o xilema e os cordões de fibras que envolvem o feixe vascular nas faces adaxial e abaxial, embora tenham apresentado aspecto deformado (Figura 5). Em algumas nervuras medianas necrosadas, observou-se hipertrofia, com proliferação das células parenquimáticas na face abaxial (Figura 6), com formato e conteúdo diferentes das células originais da nervura no tratamento controle (Figura 4). Em outro exemplo de necrose na nervura mediana pôde-se observar um tecido de cicatrização nítido na região de transição entre o tecido necrosado e o sadio (Figura 7). Adjacente ao tecido de cicatrização, devido ao colapso das células do mesofilo, este se apresentou reduzido, em comparação ao mesofilo do outro lado da nervura mediana (Figura 7).

Em uma das necroses observadas no limbo foliar verificou-se degradação e colapso das células da epiderme adaxial e parte do parênquima clorofiliano. As células parenquimáticas vizinhas à necrose apresentaram-se muito coradas, com formato isodiamétrico e sem diferenciação em parênquima paliçádico (Figura 8), o qual é característico da espécie (Figura 9). Algumas vezes, puderam-se observar regiões do mesofilo amplamente necrosadas. Nestas, ocorreu colapso total dos tecidos, sendo possível distinguir apenas as bolsas secretoras (Figura 10). Em outra necrose, observou-se colapso das células da epiderme adaxial, do parênquima clorofiliano e da epiderme abaxial, provocando redução local na espessura do mesofilo (Figura 11). Foram visualizadas células hipertrofiadas próximas à região necrosada (Figura 11).

Na epiderme adaxial das plantas de *E. uniflora* expostas à chuva ácida simulada observou-se intensa escamação da cera epicuticular em forma de placas (Figura 12 e 13). Na região de transição entre o tecido sadio e o tecido danificado puderam-se observar células com aspecto plasmolisado (Figura 12) e rompimento de cera epicuticular (Figura 13). Na epiderme das faces adaxial e abaxial foram observadas regiões convexas com células de tamanho e formato maiores que as demais células epidérmicas, tanto nas plantas expostas à chuva ácida quanto nas plantas controle, que correspondem ao local onde estão situadas as bolsas secretoras (Figuras 12 e 17).

Na epiderme abaxial das plantas do tratamento controle pôde-se verificar estômatos numerosos, com células guarda e crista estomática intactas (Figuras 14 e 15).

Figuras 12 a 19- Alterações na superfície foliar de *E. uniflora* em resposta à chuva ácida (eletromicrografia de varredura). **Figuras 12 e 13-** Epiderme adaxial exposta à chuva ácida simulada por 40 dias. **Figuras 14, 16 a 19-** Epiderme abaxial, após tratamento com chuva ácida. **Figura 15-** Epiderme abaxial das plantas controle. TN - tecido necrosado, TS - tecido sadio, BS - bolsas secretoras, CP - células plasmolisadas, CE - cera epicuticular, E - estômato, EG - estômato gigante, Es - esporos e Hi - hifas de fungos. Barras = 10  $\mu$ m.



Na face abaxial de folhas de *E. uniflora*, expostas à chuva ácida, também foi verificada escamação da cera epicuticular e várias perfurações formando canais de penetração do poluente para os tecidos internos da folha. Os estômatos apresentaram-se deformados, com ostíolos flácidos (Figuras 16, 17, 18 e 19) e mais abertos que os das plantas controle. Verificaram-se, eventualmente, estômatos de maiores proporções que os usuais (Figura 17), entretanto, tais estômatos não foram observados nas plantas do controle. Na figura 18, puderam-se verificar duas bolsas secretoras, sendo que em uma das estruturas, o conteúdo já foi eliminado. Próximos ao “estômato gigante” e as bolsas secretoras, verificaram-se muitos estômatos deformados (Figura 17). Muito freqüentemente, foram verificados hifas e esporos de fungos nas folhas de plantas expostas ao tratamento de chuva ácida, principalmente na face abaxial da folha (Figuras 18 e 19).

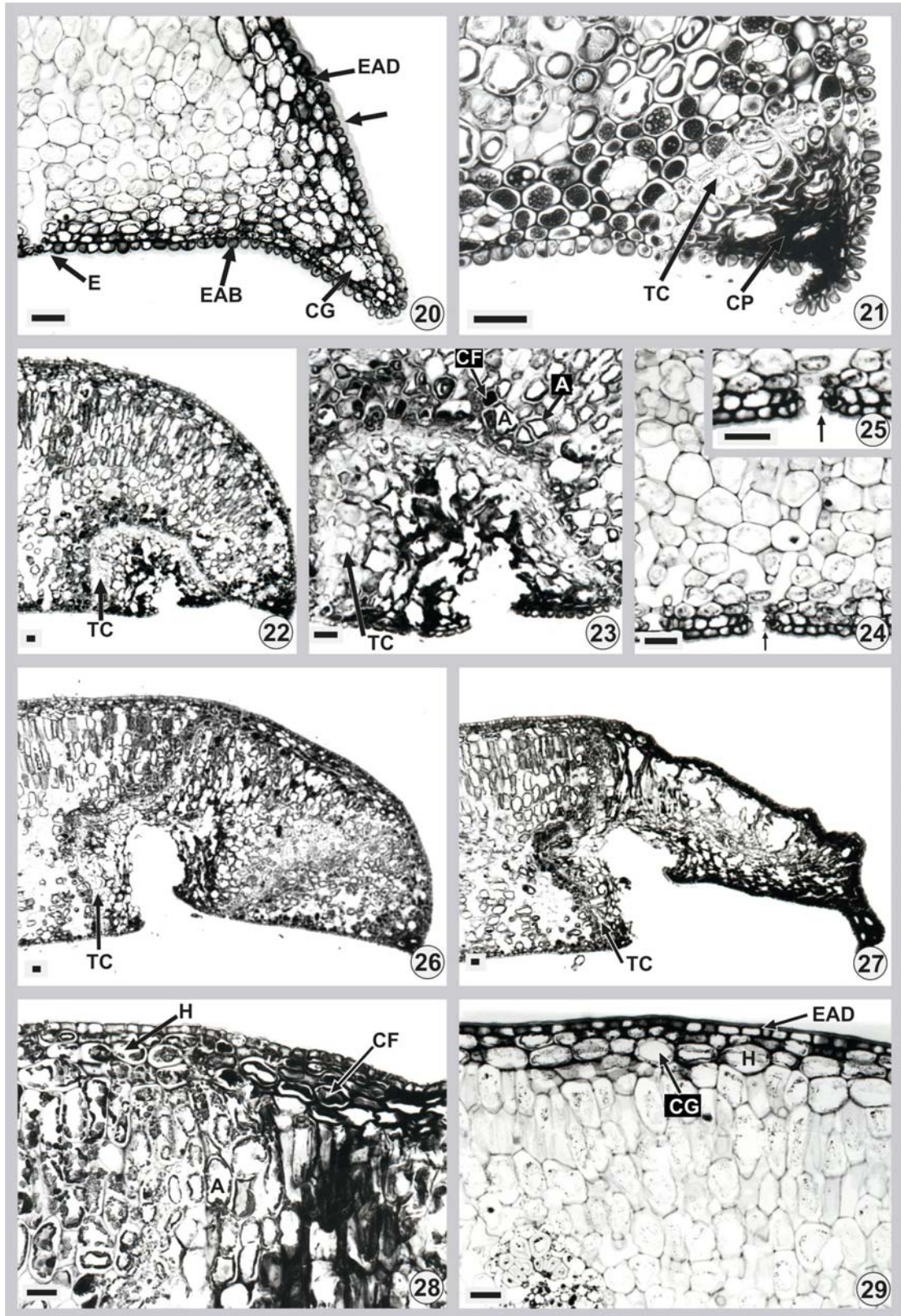
**- Alterações morfológicas e micromorfológicas apresentadas por *C. hilariana* expostas à chuva ácida:**

A estrutura da margem foliar de *C. hilariana*, das plantas controle revelou células epidérmicas altas com revestimento cuticular espesso, formando flanges cuticulares, na qual a impregnação de cutina atingiu a parede periclinal interna. Abaixo da epiderme foram encontradas células parenquimáticas, podendo conter compostos fenólicos e canais secretores esquizógenos gomorresiníferos de tamanhos variados em meio ao parênquima (Figura 20).

As plantas de *C. hilariana* expostas à chuva ácida apresentaram, ao final de 40 dias de simulação de chuvas, necroses nas margens, nas quais as células parenquimáticas apresentaram-se completamente colapsadas e os canais gomorresiníferos com diâmetro aumentado (Figura 21), quando comparado com as plantas do tratamento controle (Figura 20). Observou-se também, um cordão de células com planos de divisão anticlinal e características meristemáticas, isolando a região necrosada da região sadia, constituindo-se num tecido de cicatrização. Adjacente a este tecido de cicatrização, pôde-se verificar células parenquimáticas com conteúdo amiláceo (Figura 21).

Foram também observadas necroses na face abaxial das folhas de *C. hilariana* expostas à chuva ácida. Nestas, verificou-se colapso das células do parênquima lacunoso e presença de tecido de cicatrização nítido, isolando a região necrosada. As células parenquimáticas, próximas ao tecido de

Figuras 20 a 29- Cortes transversais de *Clusia hilariana* expostas à chuva ácida pH 3,0. **Figura 20-** Controle da margem foliar. **Figura 21-** Margem foliar necrosada. **Figura 22-** Necroses na face abaxial das folhas. **Figura 23-** Detalhe da necrose anterior. **Figura 24-** Limbo foliar das plantas controle. **Figura 25-** Detalhe da face abaxial das plantas controle. **Figura 26-** Necrose na margem. **Figura 27-** Necrose total das células da margem. **Figura 28-** Limbo foliar na região de transição entre tecido necrosado e tecido sadio. **Figura 29-** Limbo foliar das plantas controle. EAD - epiderme adaxial, EAB - epiderme abaxial, CG - canal gomoresinífero, E - estômato, Seta - cutícula, TC - tecido de cicatrização, CP - células plasmolisadas, CF - composto fenólico, A - grãos de amido, H - hipoderme. Barras = 50  $\mu$ m.



cicatrização, apresentaram-se mais volumosas contendo tanino e amido, e as células epidérmicas, embora tenham se apresentado mais coradas, não apresentaram aspecto semelhante a plasmólise (Figuras 22 e 23). Nas plantas do controle, verificou-se epiderme abaxial unisseriada, com cutícula espessa e sinuosa, conferindo a ornamentação característica da espécie (Figuras 24 e 25).

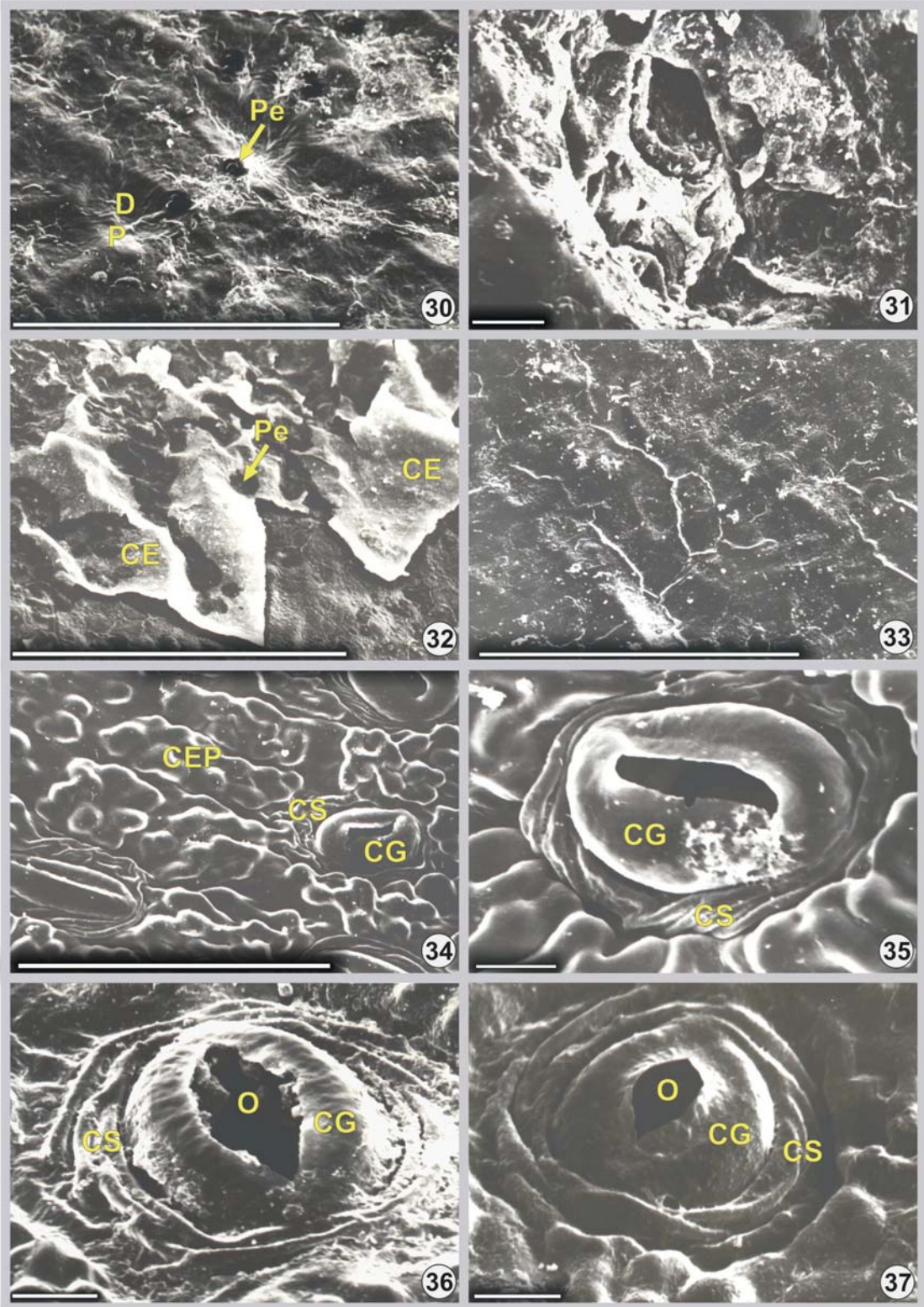
Com o avanço da necrose, observou-se nitidamente o tecido de cicatrização se estendendo da face adaxial até a abaxial da folha (Figura 26), e margem totalmente necrosada, com células pseudo-plasmolisadas e colapsadas, mas com epiderme visível e cutícula espessada (Figura 27).

Na interface do limbo foliar, entre a região necrosada e a região sadia, observou-se que algumas células do parênquima paliçádico apresentaram-se com conteúdos densos, provavelmente compostos fenólicos, e algumas células com acúmulo de amido. Notou-se aspecto semelhante à plasmólise e colapso das células da hipoderme e do parênquima clorofiliano, contribuindo para a redução na espessura do mesofilo (Figura 28), em comparação com as plantas do tratamento controle, que apresentaram três camadas de hipoderme distintas, na qual puderam-se visualizar canais gomorresiníferos e ausência de conteúdos como amido e compostos fenólicos nas células do parênquima paliçádico (Figura 29).

A epiderme adaxial das plantas de *C. hilariana* expostas à chuva ácida mostrou protuberâncias, depressões e perfurações pontuais em algumas células epidérmicas (Figuras 30 e 31). Estas perfurações, quando vistas em maior aumento revelaram rompimento da cutícula e das células epidérmicas, formando um canal de penetração da chuva ácida para os tecidos internos da planta (Figura 31). Verificou-se também escamação da cera epicuticular na forma de placas (Figura 32). Nas plantas do tratamento controle observou-se ausência das perfurações e do rompimento da cera epicuticular (Figura 33).

Na epiderme abaxial, observou-se melhor o relevo das células epidérmicas, devido à maior liberação da cera epicuticular nas plantas expostas à chuva ácida (Figura 34). As células subsidiárias se apresentaram retorcidas devido a pseudoplasmólise enquanto as células-guarda estavam totalmente alteradas, flácidas e com a parede danificada (Figuras 34 e 35). Algumas vezes, verificou-se ruptura da crista estomática e lesão da face ventral das células-guarda, podendo-se visualizar os fragmentos das células rompidas (Figura 36). Nas plantas controle,

Figuras 30 a 37- Alterações na superfície da folha de *C. hilariana* em resposta à chuva ácida (eletromicrografia de varredura). **Figuras 30 a 32-** Epiderme adaxial após exposição à chuva ácida simulada durante 40 dias consecutivos. **Figura 33-** Epiderme adaxial das plantas controle. **Figuras 34 a 36-** Epiderme abaxial exposta ao tratamento. **Figura 37-** Epiderme abaxial das plantas controle. P - protuberâncias, D - depressões, Pe - perfurações, CE - cera epicuticular em placas, CEP - células epidérmicas propriamente ditas, CS - células subsidiárias, CG - células guarda e O - ostíolo. Barras = 10  $\mu$ m.



ao contrário, observaram-se células guarda intactas e subsidiárias organizadas (Figura 37).

#### 4- Discussão e Conclusões

Apesar do solo usado neste experimento ter sido coletado a 1400 m da usina de pelotização, o teor de ferro encontrado na análise de solo não foi elevado, provavelmente porque o material foi coletado a 20 cm de profundidade. Aparentemente, a deposição de ferro particulado nesta área da siderurgia foi apenas superficial não chegando a comprometer a região em que se concentram as raízes das plantas. Estudos prévios realizados por Lopes et al. (2000), entretanto, confirmam que o ferro particulado emitido pela siderúrgica atingiu 1400 m de distância da fonte emissora.

A acidez do solo usado no presente experimento favorece, até certos limites, a disponibilização de alguns nutrientes para as plantas, promovendo o crescimento das mesmas (Marschner, 1995). Por outro lado, o aumento da acidez do solo, devido às simulações ácidas consecutivas, também, tem promovido maior disponibilização de alumínio ( $Al^{+3}$ ) e manganês ( $Mn^{+2}$ ), com conseqüente redução na taxa de decomposição da matéria orgânica, na lixiviação de nutrientes minerais, na mudança na distribuição dos microorganismos do solo e na redução da disponibilidade de molibdênio (Wood e Bormann, 1977; Olson, 1983; Mortvedt, 1983; Binns, 1985; Gorham, 1998). Apesar do presente experimento ter sido relativamente curto, alguns destes efeitos podem ter ocorrido, pois o solo não foi protegido durante as simulações. Por outro lado, parece não ter sido suficiente para promover alteração no crescimento das espécies estudadas, fato também verificado por outros autores (Koricheva et al., 1997).

O tipo de metabolismo apresentado pelas plantas, provavelmente, modifica a intensidade de alterações visuais provocadas pela chuva ácida. Em *C. hilariana*, por exemplo, que apresenta obrigatoriamente metabolismo ácido das crassuláceas (Franco, 1989), com abertura estomática ocorrendo à noite, o estresse pela chuva ácida pode ter sido menor, pois as simulações foram aplicadas pela manhã e pode ter evaporado grande parte da água até o período noturno. Soma-se ainda, a maior espessura de sua cutícula que dificultaria a penetração da água da chuva ácida. *E. uniflora*, por sua vez, sendo uma planta com metabolismo C3, apresentava estômatos abertos durante o período de

simulação da chuva ácida e tendo cutícula menos espessa que *C. hilariana*, pode permitir maior penetração da solução ácida (Kerstiens, 1994; Percy et al., 1994).

Os estresses causados por variados poluentes, geralmente, promovem diminuição da relação  $F_v/F_m$  (Garty et al., 2002). No presente experimento, entretanto, esta relação em *E. uniflora*, tanto nas plantas controle como nas tratadas com chuva ácida, foram menores do que os valores de referência propostos por Björkman e Demmig (1987). Aparentemente, o tratamento com chuva ácida estimulou o fotossistema 2, diminuindo as perdas da energia luminosa na forma de fluorescência, conforme sugerem Bolhàr-Nordenkampf e Öquist (1993). Em *C. hilariana*, entretanto, não foi verificada diferença na razão  $F_v/F_m$  das plantas expostas à chuva ácida. Alguns autores encontraram resultados semelhantes com outros poluentes e espécies vegetais (Lanaras et al., 1994; Divan Júnior, 2002).

A redução no teor de clorofilas **a** e **b** encontradas em *E. uniflora*, à semelhança do encontrado por Fan e Wang (2000) quando expuseram espécies lenhosas à chuva ácida pH 2,0, pode ser resultante de perdas de nutrientes foliares, causados pelas lavagens das chuvas ácidas, especialmente o magnésio, um dos principais constituintes das clorofilas. Pode ter ocorrido, também, aumento na degradação da clorofila com o acúmulo de espécies de oxigênio ativo induzido pela chuva ácida (Koricheva et al., 1997; Velikova et al., 2000). Em *C. hilariana*, entretanto, os teores de clorofilas não foram sensíveis ao tratamento com chuva ácida, fato verificado por outros autores em outras espécies vegetais (Lanaras et al., 1994; Divan Júnior, 2002).

Embora a chuva ácida possa alterar a integridade das membranas, no presente experimento, isto parece não ter acontecido pois não se observou aumento no vazamento de eletrólitos celulares dos discos foliares, nas duas espécies testadas. Características estruturais foliares das duas espécies podem ter contribuído para não ter ocorrido esta perda de íons.

As folhas de *C. hilariana* apresentaram aumento na atividade da dismutase do superóxido nas plantas expostas à chuva ácida, conforme verificado por outros autores em outras espécies vegetais (Koricheva et al., 1997, Gabara et al., 2003).

O aumento da atividade da peroxidase verificado em *E. uniflora* e *C. hilariana*, neste experimento, é similar ao observado com outros poluentes, sugerindo um papel protetor desta enzima contra o estresse oxidativo (Velikova et

al., 2000), evitando, por exemplo, danos às membranas das células, como verificado nas duas espécies avaliadas neste experimento.

A maioria dos trabalhos cita redução na atividade da catalase em plantas expostas a algum tipo de estresse, incluindo a chuva ácida (Velikova et al., 2000, Gabara et al., 2003), ao contrário do verificado neste trabalho, em *C. hilariana*. Nesta espécie, provavelmente, baixo nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> funciona como sinalizador, desencadeando as respostas antioxidativas, não necessitando de grande acúmulo desta molécula, o que justificaria a redução na atividade da catalase. O sistema antioxidativo desta espécie apresentou-se muito eficiente, pois todas as enzimas antioxidativas avaliadas neste trabalho apresentaram aumento em sua atividade.

O estudo anatômico evidenciou que algumas necroses encontradas em *E. uniflora* começaram a partir da epiderme adaxial corroborando que a rota de entrada de substâncias da chuva ácida se dá através da cutícula (Evans et al., 1977; Evans, 1984; Kerstiens, 1994). Danos ocasionados à cutícula resultam em liberação das soluções do apoplasto, aumentando a permeabilidade e, ou capacidade de troca dos íons da cutícula, aumento na “molhabilidade” da superfície da área de contato e/ou do tempo da precipitação sobre a cutícula e modificação do fluxo cuticular de íons, pela mudança na concentração da solução sobre a cutícula (Kerstiens, 1996).

*E. uniflora* apresentou algumas necroses, nas quais as células da epiderme, nas faces adaxial e abaxial e o parênquima clorofiliano apresentaram-se totalmente colapsados, promovendo a redução da espessura do mesofilo, como encontrado por outros autores para outros poluentes (Azevedo, 1995; Chaves, 1997; Silva, 1998).

Em *C. hilariana*, as características estruturais observadas na face abaxial das folhas necrosadas, como cutícula espessa e células epidérmicas sem colapso ou aspecto plasmolisado dão indício de que o efeito da chuva ácida iniciou-se a partir dos estômatos, e logo atingiu a câmara subestomática e o parênquima lacunoso. Com o avanço da necrose, esta atingiu o parênquima paliçádico e a hipoderme na face adaxial da folha, promovendo pseudoplasmólise nestas células, contribuindo para a redução na espessura do mesofilo.

O tecido de cicatrização verificado nas células parenquimáticas adjacentes às necroses na folhas de *C. hilariana* é muito semelhante ao súber de cicatrização encontrado por Schneider (1985), em folhas desta espécie atacadas por fungos.

Este tecido de cicatrização funciona como uma “barreira” impedindo o avanço da necrose para outras regiões da folha. Staswick (1992) propôs que as lesões ativam a proteína sistemina que funciona como sinalizador sistêmico, liberando o ácido linolênico da membrana, após se ligar a um receptor na membrana plasmática. O ácido jasmônico, sintetizado a partir do ácido linolênico livre, produz proteínas de estoque vegetativo que promovem a formação do tecido de cicatrização nas regiões atacadas por patógenos (Staswick, 1992; Taiz e Zeiger, 1998).

Durante o estresse, o acúmulo espécies reativas de oxigênio pode oxidar o grupamento SH da Rubisco, promovendo sua degradação proteolítica, e ainda danificar as proteínas de membrana, afetando os processos de transporte, resultando na inibição da exportação de glicose e acúmulo de carboidratos e amido nas células do mesofilo e próximo às nervuras foliares (Rennenberg et al., 1996), conforme se observou em *C. hilariana*. Soda et al. (2000), também observaram células do mesofilo de *Pinus halepensis* colapsadas e que acumulavam amido e lipídios após exposição ao dióxido de enxofre e ozônio.

Nas duas espécies estudadas neste experimento, foram verificados acúmulos de compostos fenólicos nas células parenquimáticas próximas à necrose. Os compostos fenólicos, presentes nos vacúolos das células parenquimáticas, se extravasam com o rompimento das membranas celulares, estabelecendo as necroses (Zobel e Nighswander, 1991; Zobel, 1996).

A análise ultraestrutural dos estômatos, nas duas espécies expostas ao tratamento com chuva ácida mostrou alterações capazes de comprometer a eficiência da fotossíntese, como criptas estomáticas rompidas e células-guarda flácidas em *E. uniflora* e células-guarda perfuradas e subsidiárias retorcidas em *C. hilariana*. Entretanto, A  $g_s$ , **E** e **A** observadas após os 40 dias de chuva ácida simulada sugerem que a duração do experimento não foi suficiente para promover alterações em grande escala nos estômatos. As amostras foliares coletadas para microscopia eletrônica de varredura são pontuais, refletindo as alterações em regiões específicas onde estão localizadas as necroses, podendo não ser significativas a ponto de serem registradas num IRGA ou fluorômetro.

Pode-se concluir que as plantas de *E. uniflora* expostas à chuva ácida mostraram-se mais vulneráveis às alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas do que as plantas de *C. hilariana*.

## 5- Bibliografia

- ALVES, P. L. C. A. **Efeitos nutricionais, fisiológicos e bioquímicos da chuva ácida simulada e do latossolo Vermelho-Amarelo de Cubatão-SP, em soja (*Glycine max* L.) Merril.** Viçosa, MG: UFV, 1988. 144 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- ALVES, P. L. C. A., OLIVA, M. A., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R. Efeitos da chuva ácida simulada e de um solo de Cubatão (SP) sobre parâmetros relacionados com a fotossíntese e a transpiração de plantas de soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.2, n.1, p.7-14, 1990.
- ALVES, P. L. C. A., OLIVA, M. A. C. Reações da soja a chuva ácida e solo contaminado. **Ambiente**, v.7, n.1, p.34-39, 1993.
- ALVES, E.S.; GIUSTI, P.M.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P.H.N.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.4, p.567-576, 2001.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, n.1, p.1247-1257, 1995.
- AZEVEDO, A. A. **Ação do flúor, em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de *Glycine max* (L.) Merril.** São Paulo, SP: USP, 1995. 95 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, 1995.
- BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and na assay applicable to acrylamide gels. **Anal of Biochemical**, v.44, n.1, p.276-287, 1971.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v.170, n.1, p.489-504, 1987.
- BINNS, W.O. Effects of acid depositions on forest and soils. **The Environmentalist**, v.5, n.4, p.279-288, 1985.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: **Photosynthesis and Production in a Changing Environment – a Field and Laboratory Manual**, HALL, D.O.; SCURLOCK, H.R.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C.; LONG, S.P. (eds). London: Chapman & Hall, p.193-206, 1993.
- CHANCE, B., MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods Enzimology**, v.2, n.1, p.764-775, 1955.
- CHAVES, A. L. F. **Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-Rhodes) – Poaceae.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 79 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

- COWLING, E.B., LINTHURST, R.A. The acidic precipitation phenomenon and its ecological consequences. **BioScience**, v.31, n.9, p.649-654, 1981.
- DEL LONGO, O.T., GONZÁLEZ, C.A., PASTORI, G.M., TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hypergenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, n.7, p.1023-1028, 1993.
- DEKOCK, P.C., COMMISSIONG, K., FARMER, V.C., INKSON, R.H.E. Interrelationships of catalase, peroxidase, hematin, and chlorophyll. **Plant Physiology**, v.35, n.1, p.599-604, 1960.
- DOMINGOS, M., KLUMPP, A., KLUMPP, G. Air pollution impact on the Atlantic forest in the Cubatão region, SP, Brazil. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.50, n.4, p.230-236, 1998.
- DOMINGOS, M., KLUMPP, A., KLUMPP, G. Effects of air pollution and soil contamination on the Atlantic Forest (Mata Atlântica) in the vicinity of the industrial complex of Cubatão (SE – Brasil). In: **1. Symposium der A. F. W. Schimper – Stiftung**. Pp 397-402, 2000.
- DIVAN JÚNIOR, A.M. **Impacto das emissões de fluoreto em Ouro Preto, MG, avaliados mediante bioindicadores vegetais ativos e passivos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 81p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- ELLENBERG, H., ARNDT, U., BRETTHAUER, R., RUTHSATZ, B., STEUBING, L. **Biological monitoring: signals from the environment**. Berlin: Vieweg, 318 p., 1991.
- EVANS, L. S., GMUR, N. F., COSTA, F. Leaf surface and histological perturbations of leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus* after exposure to simulated acid rain. **American Journal of Botany**, v.64, n.7, p.903-913, 1977.
- EVANS, L.S. Botanical aspects of acidic precipitation. **Botanical Review**, v.50, n.4, p.449-490, 1984.
- FAN, H.B.; YI, H.W. Effects of simulated acid rain on germination, foliar damage, chlorophyll contents and seedling growth of five hardwood species growing in China. **Forest Ecology and Management**, v.126, n.1, p.321-329, 2000.
- FONTENELLE, G.B., COSTA, C.G., MACHADO, R.D. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.115, n.1, p.111-133, 1994.
- FOURCROY, P. Iron and oxidative stress in plants. In: SMALLWOOD, M.F., CALVERT, C.M., BOWLES, D.J. (Eds.). **Plant Responses to Environmental Stress**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, p. 51-57, 1999.

- FRANCO, A.C. The genus *Clusia* as an example of studies on plant responses to stress in tropical environments. In: SCARANO, F.R., Franco, A.C. (Eds.). **Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the neotropics**. Series Oecologia Brasiliensis. Rio de Janeiro, Brazil. PPGE-UFRJ, v. IV, p. 65-85, 1989.
- GABARA, B., SKLODOWSKA, M., WYRWICKA, A., GLINSKA, S., GAPINSKA, M. Changes in the ultrastructure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. Leaves sprayed with acid rain. **Plant Science**, v.164, n.1, p.507-516, 2003.
- GARTY, J.; TAMIR, O.; COHEN, Y.; LEHR, H.; GORENS, A.I. Changes in the potential quantum yield of photosystem II and the integrity of cell membranes relative to the elemental content of the epilithic desert lichen *Ramalina maciformis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.21, n.4, p.848-858, 2002.
- GORHAM, E. Acid deposition and its ecological effects: a brief history of research. **Environmental Science & Policy**, v.1, n.1, p.153-166, 1998.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in Tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, n.1, p.450-455, 1987.
- HIPPELI, S.; ELSTNER, E.F. Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air Pollutants. **Journal of Plant Physiology**, v.148, n.1, p.249-257, 1996.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, n.2, p.315-319, 1976.
- KARNONSKY, M.J. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v.27, n.1, p.27-137 A, 1965.
- KERSTIENS, G. Air pollutants and Plant cuticles: Mechanisms of gas and water transport, and effects on water permeability. In: PERCY, K.; CAPE, J.N.; JAGELS, R.; SIMPSON, C.J. (eds). **Air Pollutants and the Leaf Cuticle**. Germany: Springer Verlag, p.39-65, 1994.
- KLUMPP, A., KLUMPP, G., DOMINGOS, M. Plants as bioindicators of air pollution at the serra do mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. **Environmental Pollution**, v.85, n.1, p.109-116, 1994.
- KORICHEVA, J., ROY, S., VRANJIC, J.A., HAUKIOJA, E., HUGHES, P.R., HÄNNINEN, O. Antioxidant responses to simulated acid rain and heavy metal deposition in birch seedlings. **Environmental Pollution**, v.95, n.2, p.249-258, 1997.
- KOZLOWSKI, T.T. Impacts of air pollution on forest ecosystems. **BioScience**, v.30, n.1, p.89-93, 1980.

- LANARAS, T.; SGARDELIS, S.P.; PANTIS, J.D. Chlorophyll fluorescence in the dandelion (*Taraxacum* spp.): a probe for screening urban pollution. **The Science of the Total Environment**, v.149, n.1, p.61-68, 1994.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v.148, n.1, p.350-382, 1987.
- LOPES, S.A.; OLIVA, M.A., MARTINEZ, C.A. Impacto das imissões de dióxido de enxofre e deposição de material particulado de ferro em espécies vegetais de restinga (Anchieta, ES): Avaliação ecofisiológica. In: **Ecotoxicologia – Perspectivas para o século XXI**, ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA NETO, A.L. (eds.), RiMa Artes e textos, São Carlos, p.53-71, 2000.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2 ed., California: Academic Press, California, 889 p., 1995.
- MELLO, W.Z. Precipitation chemistry in the coast of the Metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Pollution**, v.114, n.2, p.235-242, 2001.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, n.9, p.405-410, 2002.
- MORAES, R.M.; DELITTI, W.B.C.; MORAES, J.A.P.V. Respostas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulcra* Cogn. à poluição aérea de Cubatão, SP: fotossíntese líquida, crescimento e química foliar. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.4, p.441-447, 2000.
- MORTVEDT, J.J. Impacts of acid deposition on micronutrient cycling in agroecosystems. **Environmental and Experimental Botany**, v.23, n.3, p.243-249, 1983.
- MUDD, J.B., KOZLOWSKI, T.T. (Eds.). **Responses of plants to air pollution**. New York: Academic, 1975. 383 p.
- NOUCHI, J. Acid precipitation in Japan and its impact on plants. 1- Acid precipitation and foliar injury. **JARQ**, v.26, n.1, p.171-177, 1992.
- OLSON, R. A. The impacts of acid deposition on N and S cycling. **Environmental and Experimental Botany**, v.23, n.3, p.211-223, 1983.
- PERCY, K. The effects of simulated acid rain on germinative capacity, growth and morphology of forest tree seedlings. **The New Phytologist**, v.104, n.3, p.473-484, 1986.
- PERCY, K. E., BAKER, E. A. Effects of simulated acid rain on production, morphology and composition of epicuticular wax and on cuticular membrane development. **The New Phytologist**, v.107, n.3, p.577-589, 1987.
- PERCY, K. E., McQUATTIE, C.J.; REBBECK, J.A. Effects of air pollutants on epicuticular wax chemical composition. In: **Air Pollutants and Leaf Cuticle**,

- PERCY, K.E., CAPE, J.N., JAGELS, R.; SIMPSON, C.J. (eds), Germany: Springer-Verlag, p. 67-79, 1994.
- PIGNATA, M.L.; GUDIÑO, G.L.; WANNAZ, E.D.; PLÁ, R.R.; GONZÁLEZ, C.M.; CARRERAS, H.A.; ORELLANA, L. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. **Environmental Pollution**, v.120, n.1, p.59-68, 2002.
- RENNENBERG, H., HERSCHBACH, C.; POLLE, A. Consequences of air pollution on shoot-root interactions. **Journal of Plant Physiology**, v.148, n.1, p.269-301, 1996.
- ROCHA, F.R.; SILVA, J.A.F.; LAGO, C.L.; FORNARO, A.; GUTZ, G.R. Wet deposition and related atmospheric chemistry in the São Paulo metropolis, Brazil: Part 1. Major inorganic ions in rainwater as evaluated by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Atmospheric Environment**, v.37, n.1, p.105-115, 2003.
- SCHNEIDER, S.Z. **Anatomia foliar de *Clusia hilariana* Schlechtendal e *Clusia spiritu-sanctensis* G. Mariz et Weinberg (Guttiferae) ocorrentes no estado do Espírito Santo**. Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 1985. 162 p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1985.
- SINGH, A., AGRAWAL, M. Responses of two cultivars of *Triticum aestivum* L. to simulated acid rain. **Environmental Pollution**, v.91, n.2, p.161-167, 1996.
- SILVA, L.C., AZEVEDO, A.A., SILVA, E.A.M., OLIVA, M.A. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.4, p.383-391, 2000.
- SODA, C.; BUSSOTTI, F.; GROSSONI, P.; BARNES, J.; MORI, B.; TANI, C. Impact of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. **Environmental and Experimental Botany**, v.44, n.1, p.69-82, 2000.
- STASWICK, P.E. Jasmonate, genes, and fragrant signals. **Plant Physiology**, v.99, n.1, p.804-807, 1992.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 2 ed., Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 792 p., 1998.
- TARHANEN, S.; METSÄSARINNE, S.; HOLOPAINEN, T.; OKSANEN, J. Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. **Environmental Pollution**, v.104, n.1, p.121-129, 1999.
- VELIKOVA, V., YORDANOV, I., EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v.151, n.1, p.59-66, 2000.
- WOOD, T.; BORMANN, F.H. Short-term effects of a simulated acid rain upon the growth and nutrient relations of *Pinus strobus*, L. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.7, n.1, p.479-488, 1977.

ZOBEL, A., NIGHSWANDER, J. E. Accumulation of phenolic compounds in the necrotic areas of Austrian and red pine needles after spraying with sulphuric acid: a possible bioindicator of air pollution. **The New Phytologist**, v.117, n.1, p.565-574, 1991.

ZOBEL, A.M. Phenolic compounds in defence against air pollution. In: YUNUS, M., IQBAL, M. (Eds.). **Plant response to air pollution**. Chichester: John Wiley, 545 p., 1996.

### CAPÍTULO 3

## BIOMONITORAMENTO PASSIVO DAS EMISSÕES DE FERRO PARTICULADO E SO<sub>2</sub> COM ESPÉCIES VEGETAIS DE RESTINGA.

**RESUMO** – As espécies vegetais *Byrsonima sericea* DC. (Malpighiaceae), *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) e *Psidium guineense* SW. (Myrtaceae) foram estudadas numa mata remanescente e original de restinga, pertencente a uma usina de pelotização, no período de março de 2002 a fevereiro de 2003. O objetivo foi avaliar os efeitos das emissões da usina sobre o crescimento, a fenologia e parâmetros morfológicos e histoquímicos, visando o biomonitoramento passivo. Foram avaliados: o número de folhas, o lançamento de folhas novas, o número de folhas cloróticas e, ou necróticas, a fitotoxicidade de clorose e, ou necrose nas folhas, a temperatura foliar, o diferencial de temperatura entre a folha e o ar, a temperatura da planta, o número de flores ou de inflorescências, o número de frutos ou de eixo com frutos e o índice SPAD de clorofila. Foram ainda calculadas as percentagens de folhas cloróticas e, ou necróticas. Folhas adultas foram coletadas para quantificação do teor de ferro e enxofre e para detectar, através de teste histoquímico, a presença de ferro nos tecidos vegetais. Verificou-se grande diversidade nas respostas das espécies à poluição, demonstrando uma grande versatilidade das espécies na sobrevivência a ambientes impactados. As plantas de *B. sericea*, no local exposto, apresentaram maior teor de clorofila, menor temperatura foliar, maior número de folhas e não variaram quanto ao lançamento de folhas novas, ao número de flores e frutos, quando comparadas com o local não exposto. *B. sericea*, parece, portanto, ter sido a espécie menos afetada pelas deposições da usina. Por outro lado, *C. verbenacea* no local exposto apresentou maiores teores de clorofila, de temperatura foliar, de diferencial de temperatura da folha-ar, e menores número de folhas, flores e frutos. As plantas de *P. guineense* expostas às emissões da usina produziram menos clorofila, maior diferencial de temperatura folha-ar, maior lançamento de folhas, e menor número de folhas. Não apresentou flores e frutos neste local. As deposições da usina podem ter afetado a reprodução sexuada desta espécie, podendo promover, em longo prazo, sua eliminação local. *C. verbenacea* acumulou maior quantidade de ferro que as demais espécies ocorrendo maior deposição nas reentrâncias localizadas nas bases dos tricomas glandulares. As plantas de *B. sericea* podem ter apresentado menor acúmulo de ferro devido à presença de hipoderme e tricomas malpighianos, enquanto que em *P. guineense*, a proteção parece ter sido viabilizada pela hipoderme.

**Palavras Chave:** bioindicação passiva, deposição particulada, SO<sub>2</sub>, plantas nativas.

**SUMMARY- Passive Biomonitoring of Particulate Iron and SO<sub>2</sub> Emissions Using Restinga Plant Species** – The plant species *Byrsonima sericea* DC. (Malpighiaceae), *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) and *Psidium guineense* SW. (Myrtaceae) were studied in situ, in a remaining and original fragment of restinga, owed by a iron ore factory, from March 2002 to February 2003. The aim of the study was to evaluate the factory emissions effects on the growth and phenology of the species, besides the histochemical and morphological alterations, in order to set up a passive biomonitoring protocol. The parameters

used to screen the plants were the number of leaves, new shoots release, number of chlorotic and necrotic leaves, phytotoxicity of the leaves (by chloroses on necroses index), foliar temperature, difference between foliar and air temperatures, number of flowers or inflorescences, number of fruits end fruited axis and chlorophyll SPAD index. Full grown leaves were harvested to quantify the iron and sulfur foliar content, and to detect iron presence in the tissues by histochemical testing. The three species had a diversity of response to the pollutant emissions, showing their great capacity of surviving in a very disturbed environment. Plants of *B. sericea* from the exposed location showed higher chlorophyll content, lower foliar temperature, greater number of leaves, no difference on the amount of new shoots, flowers and fruits released when compared to the plants from the no exposed site. This indicates, thus, that *B. sericea* was less affected by the factory emissions and depositions. On the other hand, *C. verbenacea* from the exposed site, displayed the highest content of chlorophyll, foliar temperature, temperature differences and the lowest number of leaves, flowers and fruits. The *P. guineense* plants exposed to the factory emissions had lower chlorophyll content, greater temperature difference, greater release of new shoots, smaller number of leaves, and no flowers or fruits. The depositions, due to the factory emissions, could have disrupted the sexual reproduction pattern of *P. guineense* and eventually causing its local eradication, on a long time scale. Leaves of *C. verbenacea* had higher iron content than the other two species, and the major depositions took place at the base of glandular trichomes. The fewer accumulation of iron on *B. sericea* leaves could be related to the presence of a hypoderm plus malpighians trychomes, while in *P. guineense* the protection was mainly due to the presence of a hypoderm.

**Key-words:** Passive bioindication, particulate deposition, SO<sub>2</sub>, native species.

## 1- Introdução

O biomonitoramento é uma ferramenta importante e de baixo custo, pelo meio do qual plantas podem ser usadas como indicadores da qualidade do ar devido a suas respostas diferenciadas à poluição. Algumas espécies são susceptíveis à poluição (bioindicadores de reação), enquanto outras podem acumular os poluentes em altas concentrações sem que sintomas visíveis sejam observados (bioindicadores de acumulação) (Mudd & Kozlowski 1975, Kozlowski 1980, Arndt et al. 1995). Os bioindicadores podem ser passivos, quando estão presentes em seu ambiente natural, ou ativos, quando são introduzidos, de forma padronizada, na área de estudo (Ellenberg et al. 1991).

A usina de pelletização em estudo libera na atmosfera poluentes como o dióxido de enxofre e o ferro metálico particulado, que podem alterar o ecossistema de restinga, à sua volta. Os principais danos ao ecossistema estão relacionados à alteração da diversidade específica, devido à eliminação local das espécies mais sensíveis, a redução do crescimento, da floração, da frutificação e a alteração na ciclagem de nutrientes, pela inibição na sua absorção, dentre outros (Ottaway, 1982; Grantz et al., 2003).

A escassez de dados sobre a resistência ou sensibilidade das espécies tropicais em relação à poluição limita as possibilidades de se estabelecer programas de biomonitoramento, reforçando a necessidade de mais estudos com plantas nativas tropicais.

As espécies vegetais que serão estudadas são amplamente distribuídas na restinga de Setiba, Espírito Santo e são elas: *Byrsonima sericea*, uma Malpighiaceae, de porte arbustivo e conhecido na região como murici; *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), que apresenta porte arbustivo e é conhecida como guaimbé; *Psidium guineense* (Myrtaceae), que possui porte arbustivo e é conhecida na região como araçá.

O objetivo deste trabalho foi: avaliar os efeitos das emissões de uma usina de pelletização sobre o crescimento e a fenologia, mediante parâmetros morfológicos e histoquímicos, visando desenvolver o biomonitoramento passivo.

## 2- Material e Métodos

As espécies vegetais avaliadas foram: *Byrsonima sericea* DC. (Malpighiaceae), *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) e *Psidium guineense* SW. (Myrtaceae). Representantes de cada espécie vegetal (testemunhas) foram

herborizados segundo metodologias usuais e registrados no herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa, sob os números: 27.179, 27.181 e 27.188, respectivamente para *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense*. Estas espécies foram selecionadas por pertencerem à formação original da restinga e estarem presentes tanto na mata da usina de pelotização quanto no Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV), considerado como referência para este experimento. Além destes, o outro requisito foi a presença de sintomas visíveis de danos relacionados à poluição, como por exemplo, necroses nas folhas.

O experimento foi conduzido sob condições de campo, numa mata remanescente e original de restinga, pertencente a uma usina de pelotização, localizada a 200 m da usina, no município de Anchieta, Espírito Santo, sob as coordenadas 20°46'21,0" S e 40°34'52,3" W. O período de execução do experimento foi de março de 2002 a fevereiro de 2003.

Para o acompanhamento dos efeitos da poluição foram marcados, aleatoriamente, três indivíduos de cada espécie e três ramos de cada indivíduo em local exposto na mata da mineradora e em local não exposto (PEPCV). As avaliações foram feitas mensalmente, por um período de um ano.

Os parâmetros avaliados foram: número de folhas, lançamento de folhas novas, número de folhas cloróticas e, ou necróticas, fitotoxicidade de clorose e, ou necrose nas folhas, temperatura da massa foliar, diferença entre a temperatura do ar e da planta, número de flores em *P. guineense* ou de inflorescências em *B. sericea* e *C. verbenacea* e número de frutos em *P. guineense* ou de eixo com frutos em *B. sericea* e *C. verbenacea*, além de índice SPAD de clorofila. Folhas adultas foram coletadas para quantificação de ferro e enxofre e para detecção histoquímica de ferro nos tecidos vegetais.

A fitotoxicidade de necroses e cloroses foi expressa em índice calculado a partir de notas atribuídas, de acordo com a percentagem da área foliar clorótica ou necrótica, obedecendo a seguinte escala: 0- sem clorose ou necrose; 1- com clorose e, ou necrose em até 25% da área foliar; 2- com clorose e, ou necrose de 26 a 50% da área foliar; 3- de 51 a 75% da área foliar com clorose e, ou necrose; e 4- com clorose e, ou necrose de 76 a 100% da área foliar.

A temperatura da massa foliar e o diferencial entre a temperatura do ar e da planta foram avaliadas com o uso de um termômetro a infravermelho (AG-2 Infrared termometer) da TELATEMP.

O teor de clorofila foi determinado por meio do colorímetro SPAD, modelo 501 da Minolta, com base na leitura de 4 folhas adultas de cada repetição, contendo ou não cloroses ou necroses.

Para determinação do ferro e enxofre no material vegetal, dez folhas adultas, coletadas a partir do terceiro nó de cada espécie vegetal foram lavadas em água corrente, depois em água desionizada, e secas em papel absorvente. Após secagem em estufa à temperatura de  $75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , as amostras foram moídas através de peneiras de malha de 1mm. A quantificação de ferro foi realizada por absorção atômica e a de enxofre, por ICP (Inductively Coupled plasma). As leituras foram realizadas ao final do experimento.

Para detecção histoquímica do ferro, amostras foliares de folhas adultas das espécies localizadas no local exposto e no local não-exposto (PEPCV) às deposições gasosas e particuladas foram fixadas em glutaraldeído e paraformaldeído em tampão fosfato pH 7,0 (Karnonsky, 1965). Os cortes obtidos foram submetidos a uma solução constituída de ferrocianeto de potássio 4% e ácido clorídrico 4% (Bancroft et al., 1996). Após 24 horas de reação, os cortes foram lavados e montados em gelatina glicerizada e fotografados em fotomicroscópio (OLYMPUS AX70) equipado com sistema U-photo. A reação foi considerada positiva nas regiões dos cortes que apresentaram coloração azul, característica do azul de Prússia. Um controle negativo em que os cortes foram montados sem o reagente específico foi desenvolvido em paralelo.

As condições climáticas: direção e velocidade do vento, pluviometria e temperatura ambiente foram monitoradas pela Estação Meteorológica instalada a 1400 m da usina.

Foram coletadas amostras de solo das regiões expostas e não expostas às emissões da usina e submetidas à análise.

As concentrações do  $\text{SO}_2$  e do material particulado foram obtidas numa estação localizada a 1700 m da usina, por meio dos aparelhos de campo Hi-vol e Tri-gás, que determinam as concentrações de  $\text{SO}_2$  pelo método do peróxido de hidrogênio. As partículas totais em suspensão foram determinadas por diferença entre o peso final do filtro coletado durante 24 horas, a cada seis dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Os dados foram transformados, quando não apresentaram homogeneidade de variância e distribuição normal e foram

submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram submetidas ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparação.

### 3- Resultados

No período em que foram instalados os experimentos verificou-se que o vento predominante foi o nordeste, com velocidade máxima média de 1,6 m/s. As maiores velocidades ocorreram nos meses de dezembro e outubro e as menores em junho e julho (Figura 1). A temperatura do ar variou de 21,42°C a 25,62°C, com média para o período de 23,6°C. A precipitação pluviométrica variou de 38,7 a 148,1 mm, tendo a maior densidade de chuva ocorrida no mês de novembro. A média para o período foi de 74,1mm (Figura 1).

O solo da região exposta ao ferro particulado e ao dióxido de enxofre apresentou-se mais ácido e com menores teores dos elementos P, K, Na, Ca e Mg, além da presença de íons  $Al^{3+}$  do que o solo da região não-exposta (Tabela 1).

As emissões da usina de pelotização na forma de partículas totais em suspensão, incluindo o ferro metálico e dióxido de enxofre são apresentadas na Figura 2. Apenas nos meses de junho e janeiro a deposição de partículas totais em suspensão superou o padrão secundário (60,2 e 64,4  $\mu g.m^{-3}$ ). No caso do dióxido de enxofre verificou-se que a sua emissão ficou abaixo do padrão secundário (40  $\mu g.m^{-3}$ ) durante todo o período de exposição, chegando, apenas a um valor próximo a esse padrão no mês de fevereiro (38,8  $\mu g.m^{-3}$ ) (Figura 2).

A espécie *C. verbenacea* foi a maior acumuladora de ferro metálico, atingindo um valor médio de 8  $g.kg^{-1}$  no local exposto e 0,5  $g.kg^{-1}$  no local não-exposto (Figura 3). *P. guineense* acumulou 4,5  $g.kg^{-1}$  no local exposto e 0,4  $g.kg^{-1}$  no local não-exposto, enquanto que *B. sericea*, 3,8  $g.kg^{-1}$  no local exposto e 0,2  $g.kg^{-1}$  no local não-exposto (Figura 3).

*B. sericea* apresentou teor de enxofre significativamente maior no local exposto, enquanto que *P. guineense*, no local não-exposto. Em *C. verbenacea* não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 4).

A temperatura da massa foliar em *B. sericea* foi maior no local não exposto, enquanto que em *C. verbenacea* ocorreu no local exposto. A temperatura de *P. guineense* não variou em função do local de exposição (Figura 5).

*C. verbenacea* e *P. guineense* apresentaram maiores diferenças de temperatura entre o ar e as folhas nas plantas expostas, enquanto que em *B.*

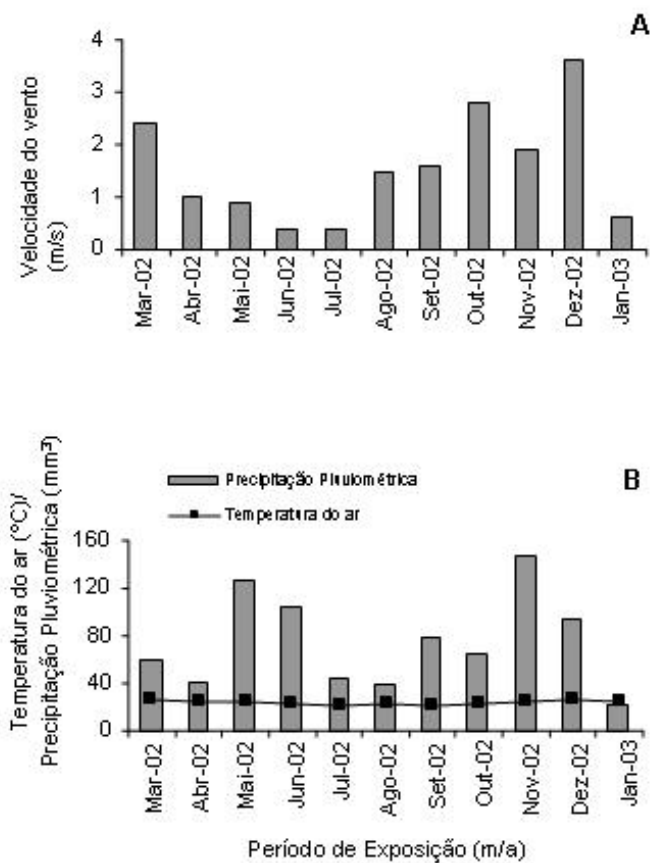


Figura 1- Dados climatológicos da área em estudo no período da exposição ativa, de Março de 2002 a Janeiro de 2003. **A**- Velocidade média do vento; **B**- Temperatura média do ar e precipitação pluviométrica.

Tabela 1- Característica química e física dos solos. **A** - Coletado no Parque Estadual Paulo César Vinha. **B** - Coletado na mata da usina de pelotização.

A - Solo do Parque Estadual Paulo César Vinha																						
PARÂMETRO	pH	P	K	Na	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H + Al	SB	(t)	(T)	V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
UNIDADE	H <sub>2</sub> O	mg/dm <sup>3</sup>			cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>							%		dag/kg	mg/L	mg/dm <sup>3</sup>						
RESULTADO	6,22	5,8	14	-	3,26	0,62	0,0	1,7	3,92	3,92	5,57	70,4	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B - Solo da Mata da Usina de Pelotização																						
PARÂMETRO	pH	P	K	Na	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H + Al	SB	(t)	(T)	V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
UNIDADE	H <sub>2</sub> O	mg/dm <sup>3</sup>			cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>							%		dag/kg	mg/L	mg/dm <sup>3</sup>						
RESULTADO	4,8	2,1	11	-	0,61	0,24	0,54	2,44	0,88	1,42	3,32	26,5	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-

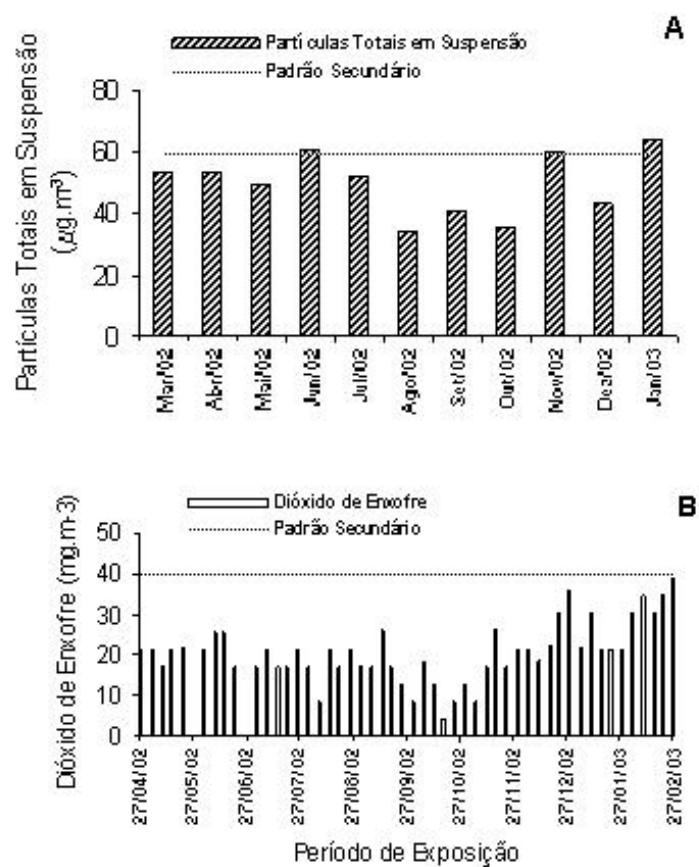


Figura 2- Emissões da usina de pelletização no período do experimento de bioindicação passiva. **A-** Partículas totais em suspensão; **B-** Dióxido de enxofre. Padrão secundário segundo resolução do CONAMA (03/1990).

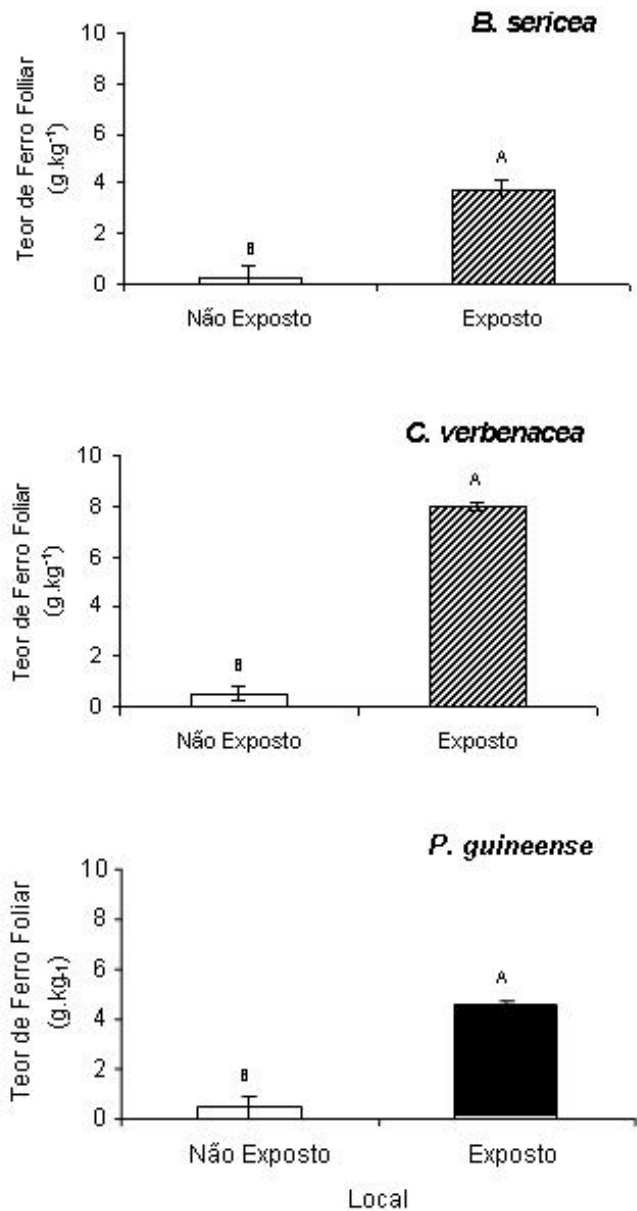


Figura 3- Teor de ferro foliar em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense*, nos locais expostos e não expostos às emissões da usina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

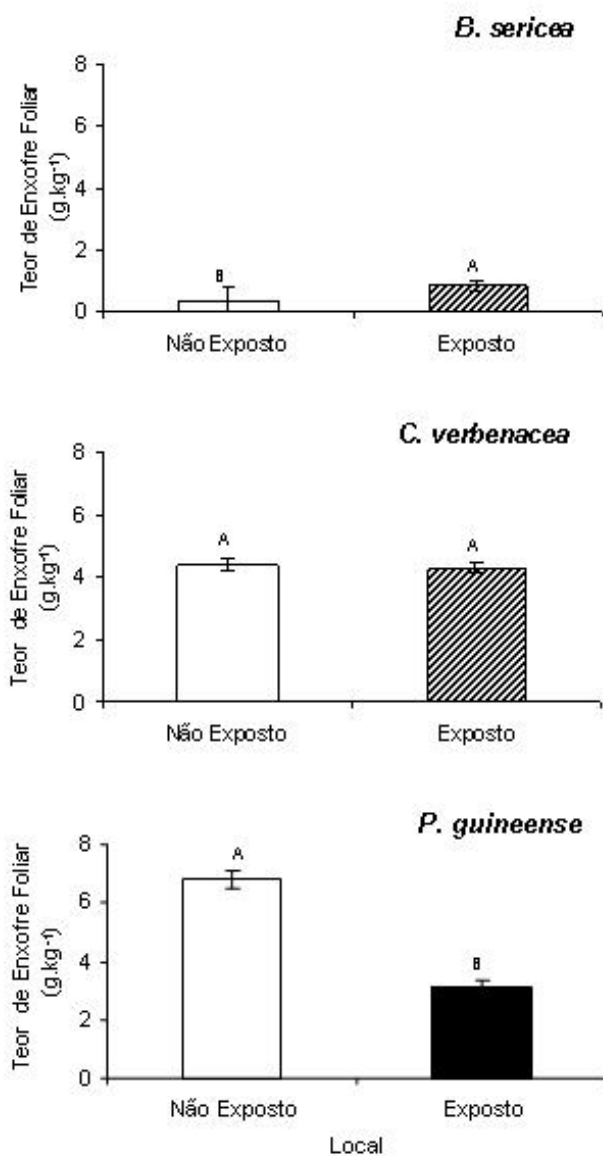


Figura 4- Teor de enxofre foliar em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense*, nos locais de coleta dos dados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

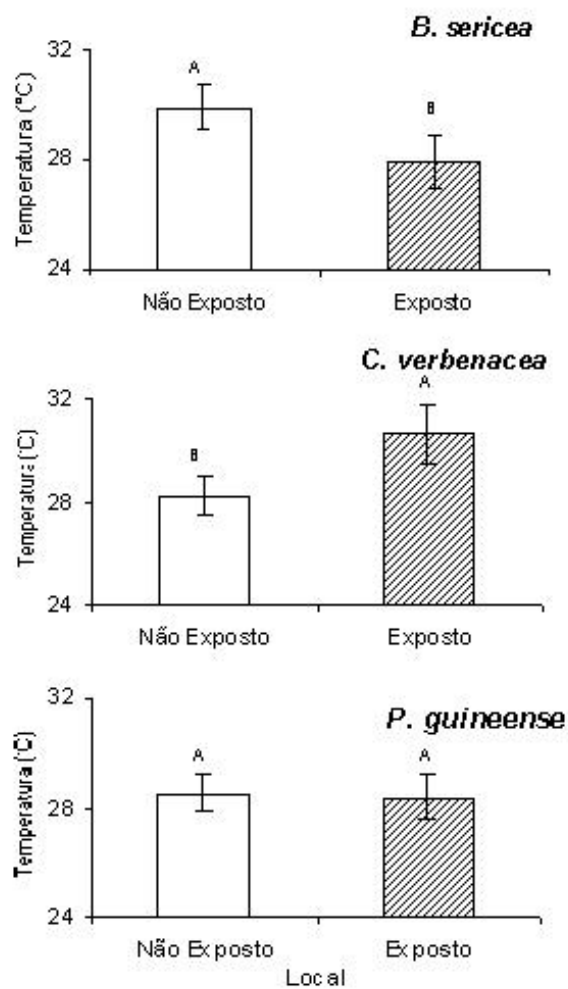


Figura 5- Temperatura da massa foliar de *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* expostas e não-expostas às emissões da usina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

*sericea* não foram observadas diferenças (Figura 6). A interação entre meses e locais de avaliação foi significativa ao nível de 1% para todas as espécies, quando se comparou as plantas não expostas e expostas. Em *B. sericea*, a interação significativa ocorreu em março, enquanto em *C. verbenacea*, em março, junho e outubro e em *P. guineense*, em março e outubro (Figura 7).

*B. sericea* apresentou maior número de folhas nas plantas expostas, enquanto que *C. verbenacea* e *P. guineense*, nas plantas não-expostas (Figura 8). A interação entre mês e local de coleta foi significativo para *P. guineense*, tendo a diferença entre o número de folhas das plantas expostas e não-expostas sido marcante no mês de agosto (Figura 8).

Em *B. sericea*, observou-se lançamento de folhas novas em quase todos os meses do ano, principalmente no local exposto às emissões da usina. Em *P. guineense*, o maior lançamento de folhas ocorreu de setembro a novembro (Figura 9). Com relação à interação entre os meses e os locais de coleta, as maiores diferenças ocorreram nos meses de março, junho e julho em *B. sericea* e em março em *P. guineense* (Figura 10).

Os sintomas visuais observados nas plantas expostas ao dióxido de enxofre e ferro particulado foram o aparecimento de folhas cloróticas e necróticas.

A percentagem de folhas cloróticas em *B. sericea* foi menor em março enquanto em *C. verbenacea*, em março e maio. Em *P. guineense* a percentagem de folhas cloróticas não foi diferente ao longo do ano (Figura 11). Nesta espécie e em *C. verbenacea*, a percentagem de folhas cloróticas foi maior no local exposto às emissões da usina (Figura 12).

O índice de fitotoxicidade de cloroses foi menor em março, junho e novembro em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense*, respectivamente (Figura 13). Tanto em *B. sericea* quanto em *P. guineense* os maiores índices de fitotoxicidade foram observados no local exposto às deposições particuladas e gasosas. Interação significativa entre época de coleta e local de exposição foi encontrada apenas para *P. guineense* no mês de agosto (Figura 14).

Em *B. sericea* apenas nos meses de novembro e janeiro foram observadas menores percentagens de folhas necrosadas, enquanto que em *C. verbenacea*, apenas em maio. Em *P. guineense* a percentagem de folhas necrosadas não se modificou ao longo do ano (Figura 15). Em todas as espécies, as maiores percentagens de folhas necrosadas ocorreram no local exposto (Figura 16). A interação entre época de avaliação e o local de coleta mostrou diferença

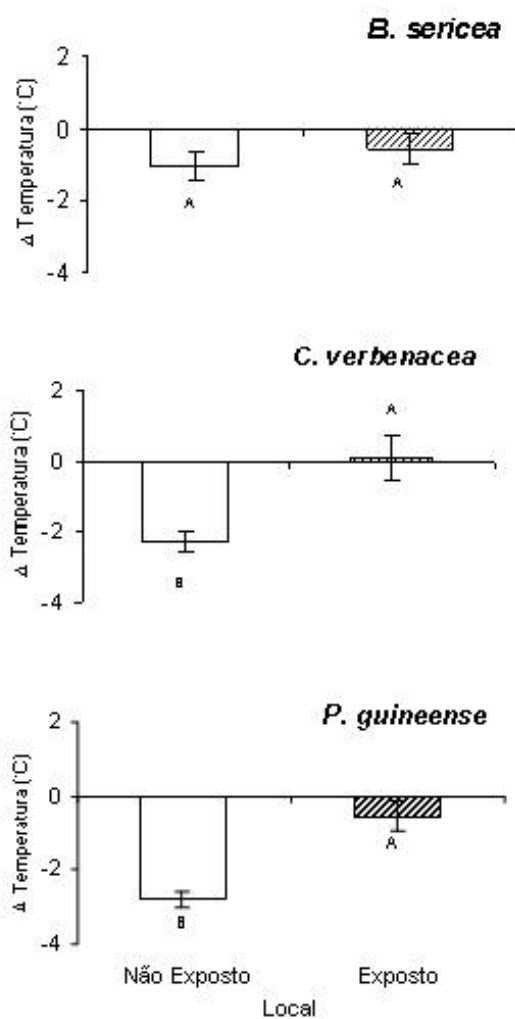


Figura 6- Diferença de temperatura entre o ar e a planta em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* nos locais não-expostos e expostos às emissões da usina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

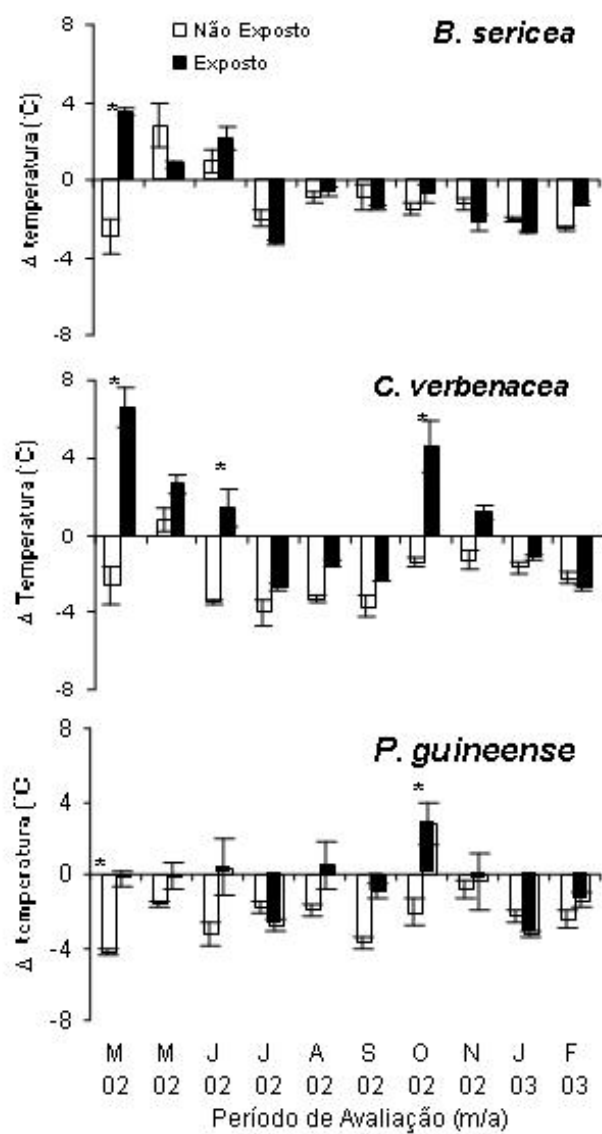


Figura 7- Diferença de temperatura entre o ar e a planta em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* nos diferentes meses e locais expostos e não-expostos às emissões da usina. O \* indica a diferença estatística pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

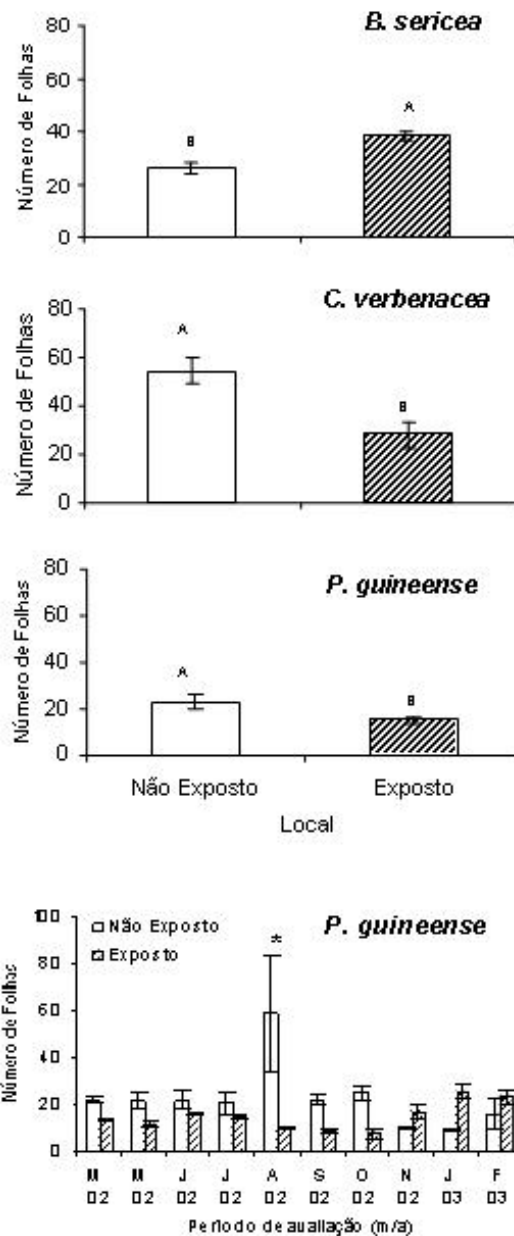


Figura 8- Número de folhas em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* nos locais de coleta e na interação entre meses e locais de coleta em *P. guineense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

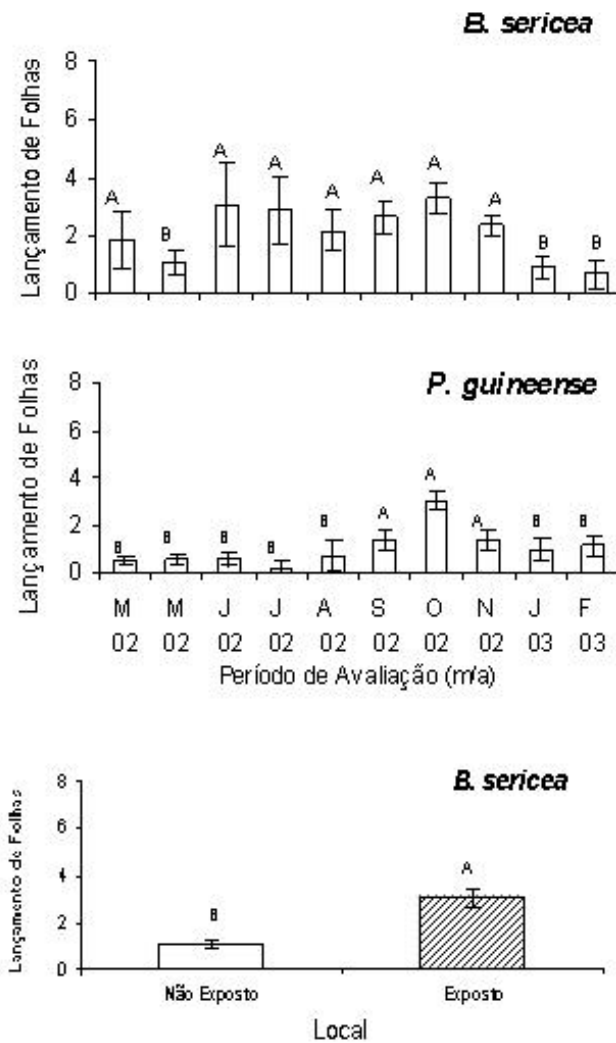


Figura 9- Lançamento de novas folhas em *B. sericea* e *P. guineense* nos meses de coleta; em *B. sericea*, nos locais não-expostos e expostos às emissões da usina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

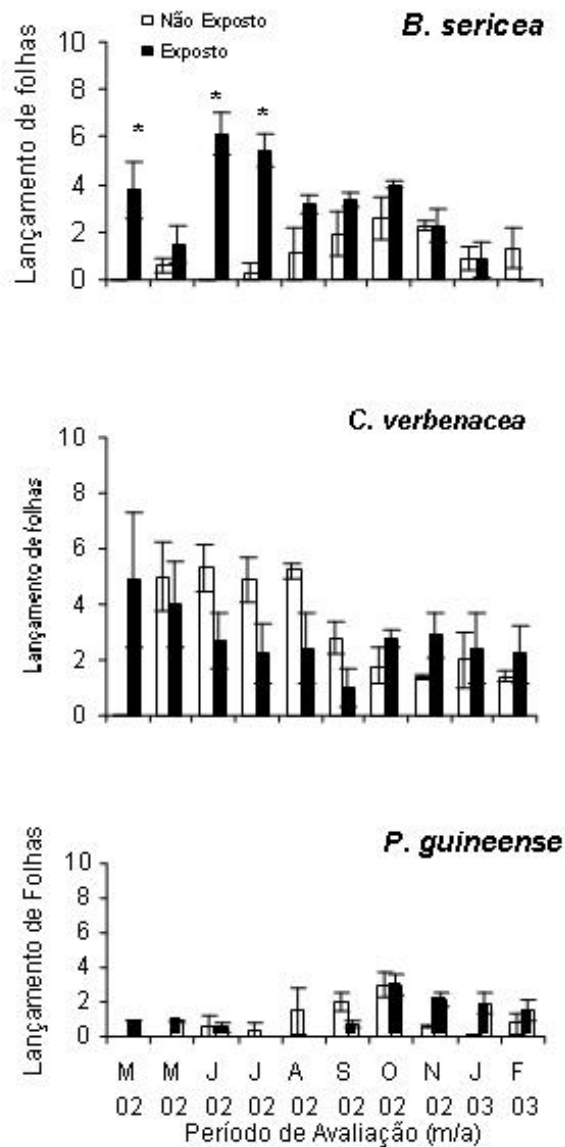


Figura 10- Lançamento de folhas novas em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* na interação entre mês e local de coleta. O \* indica o local de diferença estatística, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

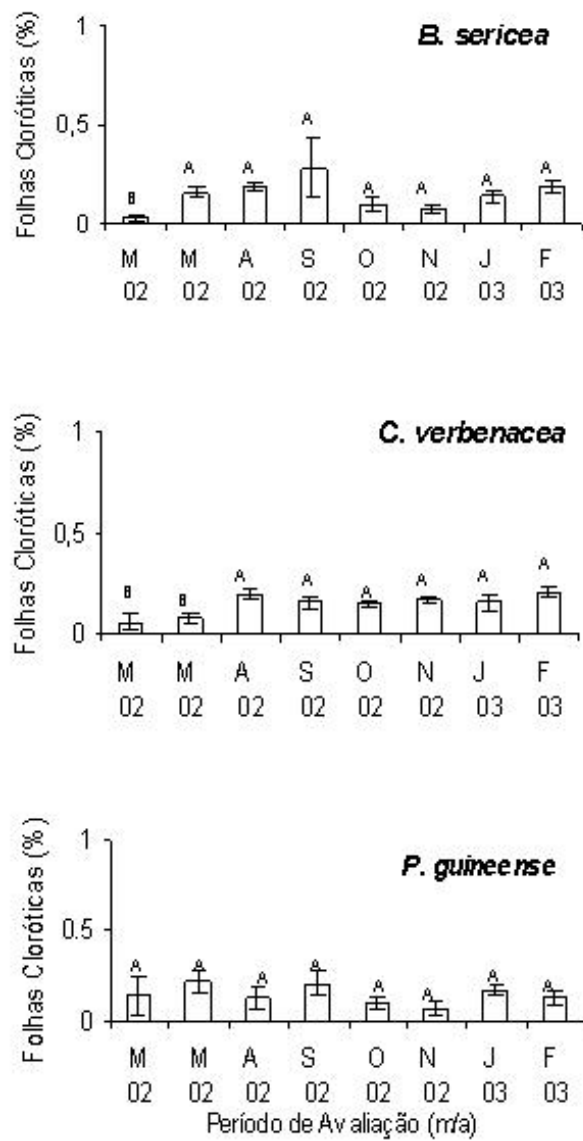


Figura 11- Folhas cloróticas em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* nos diferentes meses de coleta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

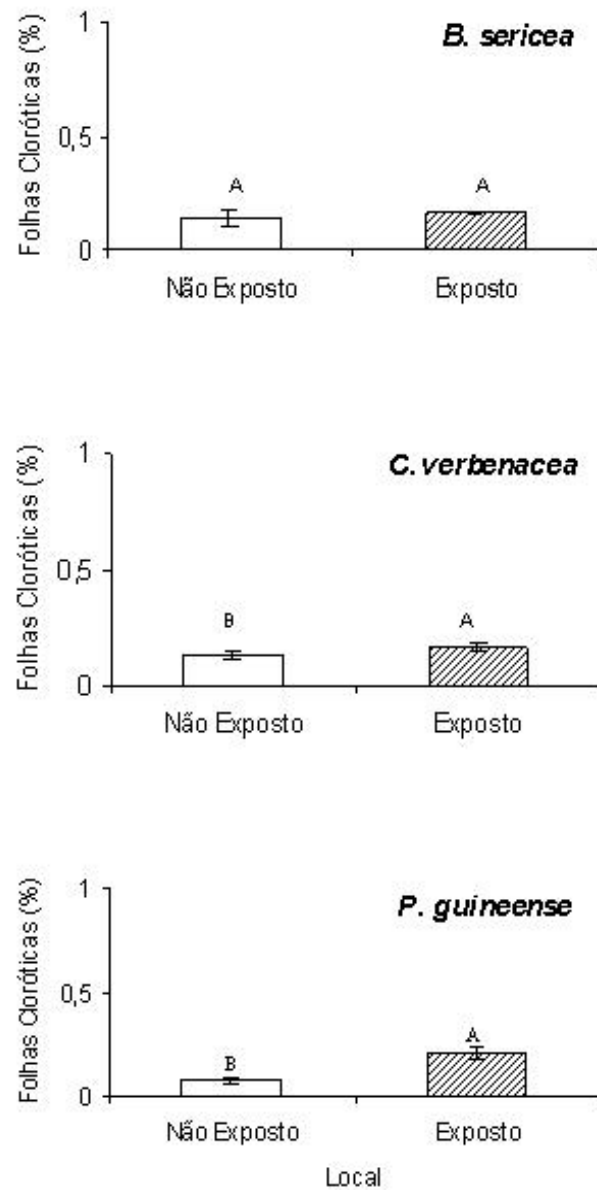


Figura 12- Folhas cloróticas em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* nos locais de coleta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

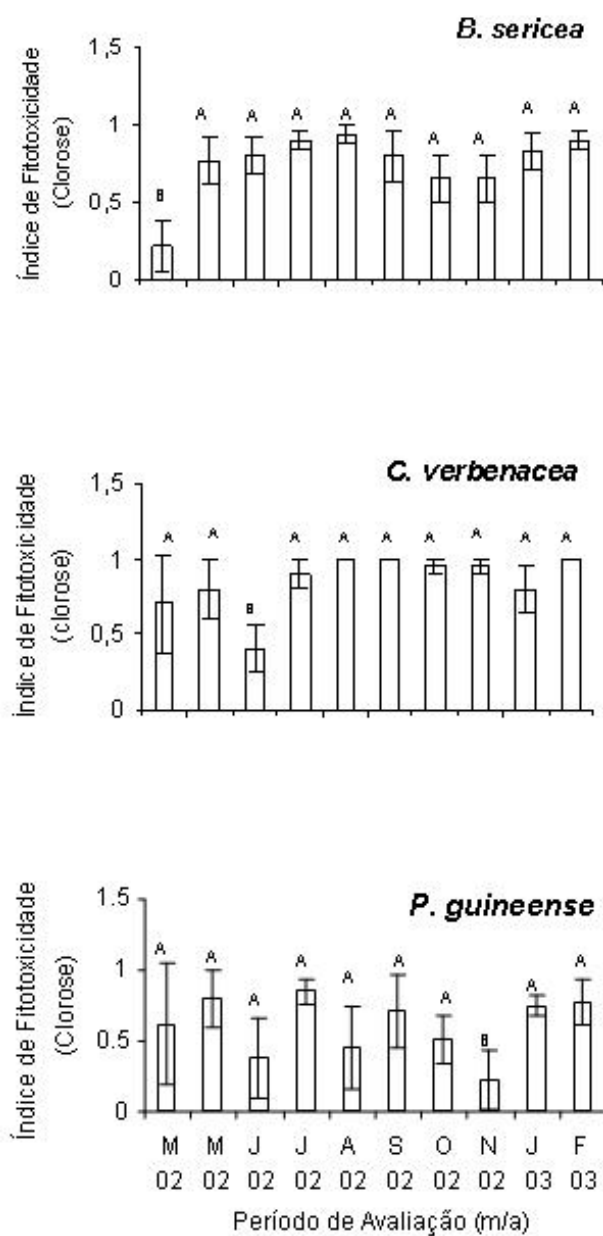


Figura 13- Índice de fitotoxidade de clorose em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* nos meses de coleta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

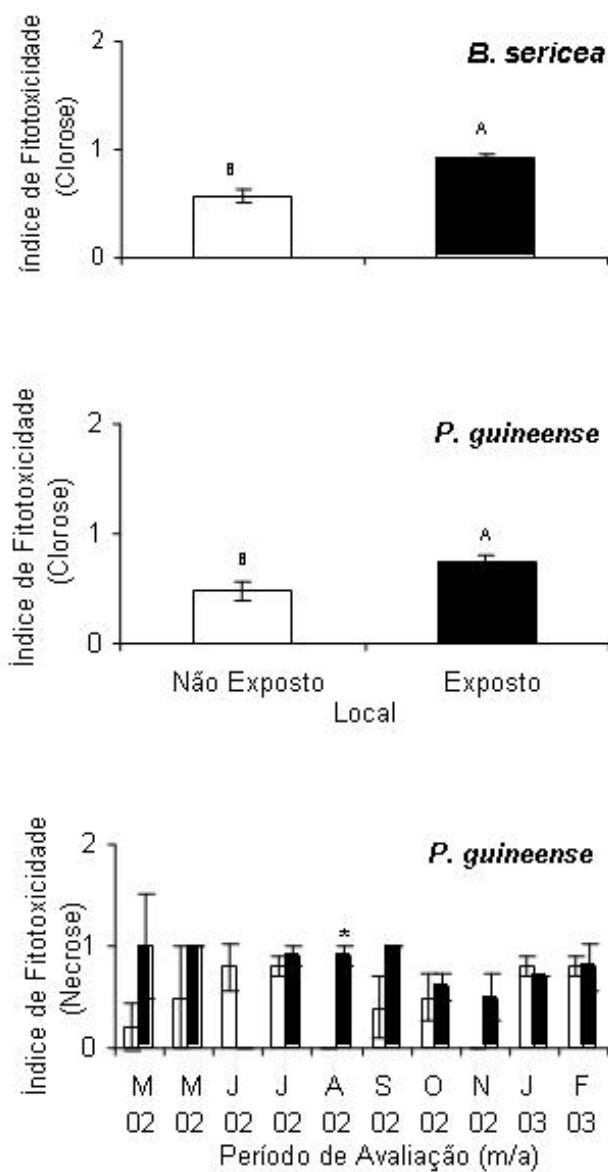


Figura 14- Índice de fitotoxidade de necrose em *B. sericea* e em *P. guineense* em relação aos locais de coleta e em *P. guineense* na interação entre os meses e os locais de coleta. O \* indica o local de diferença estatística. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

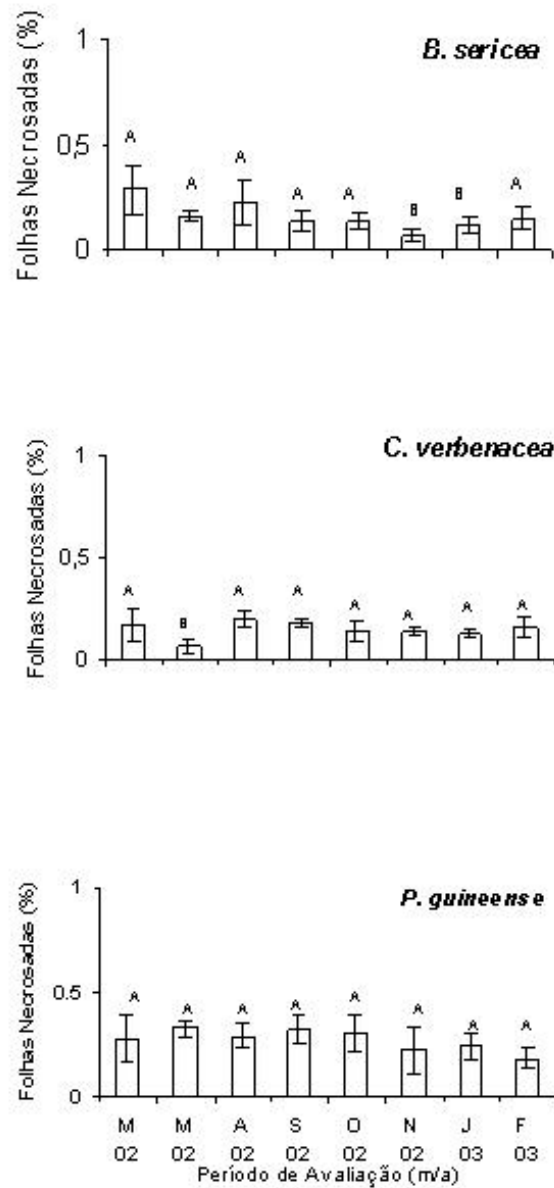


Figura 15- Folhas necrosadas em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* nos diferentes meses de coleta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

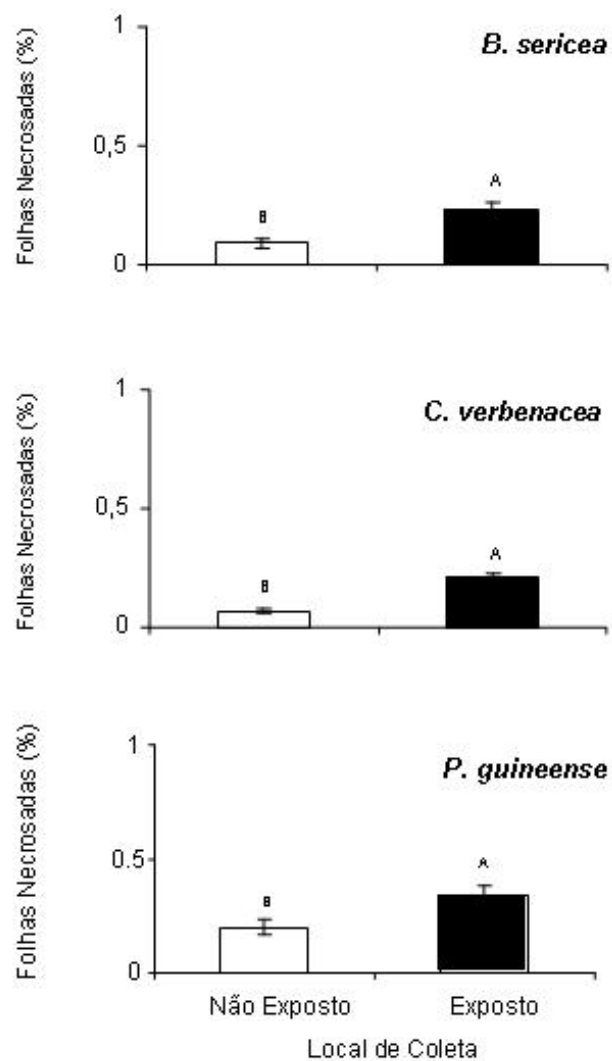


Figura 16- Folhas necrosadas em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* nos diferentes locais de coleta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

significativa em *B. sericea* no mês de março e em *C. verbenacea* nos meses de março, fevereiro e outubro (Figura 17).

Apenas em plantas de *C. verbenacea* foram observadas diferenças significativas nos índices de fitotoxicidade de necrose, tendo o menor índice sido observado em março (Figura 18). As plantas de *P. guineense*, por sua vez, foram as únicas que apresentaram interação significativa entre época e locais de coleta, sendo que a maior diferença entre os locais de exposição nesta espécie ocorreu em março (Figura 18). Nas três espécies avaliadas, as plantas expostas às emissões da usina apresentaram maiores índices de fitotoxicidade do que as plantas não expostas (Figura 19).

Em *B. sericea* e *C. verbenacea*, os maiores teores de clorofila foram observados nas plantas expostas às emissões, enquanto que em *P. guineense*, nas não expostas. Em *P. guineense*, no mês de outubro observou-se o menor teor de clorofila (Figura 20).

O número de inflorescências de *B. sericea* e de *C. verbenacea* variou ao longo dos meses em que durou o presente experimento. Em *B. sericea*, o maior número de inflorescências foi verificado nos meses de novembro, janeiro, março e maio, enquanto que em *C. verbenacea*, apenas nos meses de julho e agosto ocorreu menor floração (Figura 21). As plantas de *C. verbenacea* apresentaram menor número de inflorescências quando expostas às emissões. Interação significativa entre época e locais de exposição foi verificada em *C. verbenacea* no mês de outubro (Figura 21).

Com relação à frutificação, nos meses de janeiro a maio foram verificados os maiores números de eixos com frutos em *B. sericea* (Figura 22). As plantas de *C. verbenacea* e *P. guineense* apresentaram maior média de eixos ou de frutos no local não exposto. Interação significativa entre época e locais de exposição foi verificada em *B. sericea* nos meses de março e maio (Figura 22).

#### - **Detecção histoquímica do ferro Particulado**

Em todos os cortes de folhas procedentes do local exposto às emissões pôde-se verificar depósito superficial de ferro, do lado externo da folha, mesmo após sucessivas lavagens no material vegetal.

Em cortes das folhas de *B. sericea* coletados no local exposto observou-se reação positiva para o ferro nos pêlos do tipo malpighiano, localizados na face abaxial da nervura mediana e da lâmina foliar (Figuras 23 e 24), na cutícula da

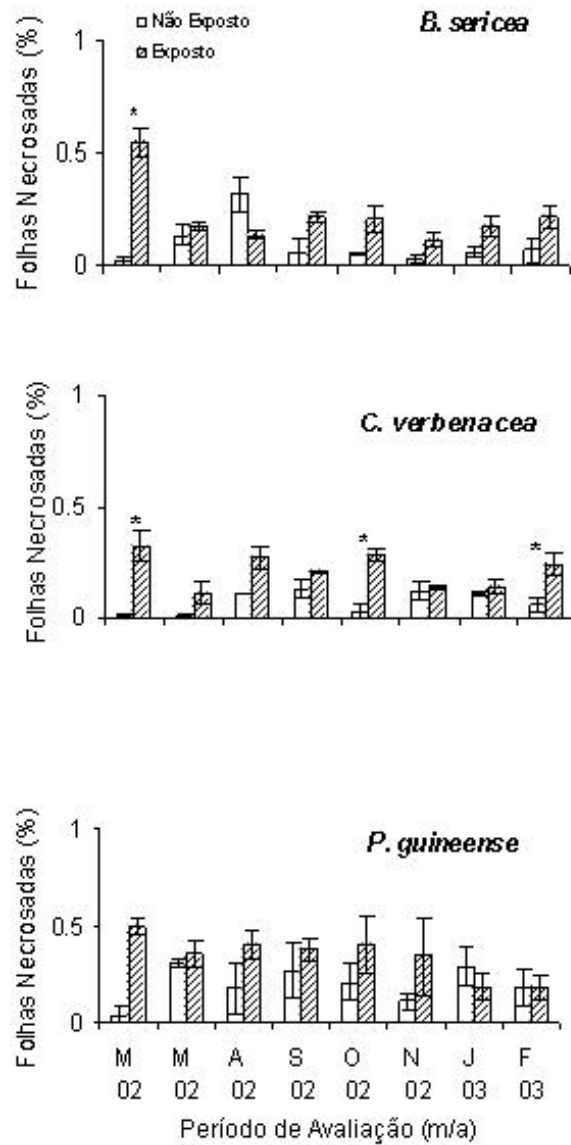


Figura 17- Folhas necrosadas em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense* nas interações entre os meses e locais de coleta. O \* indica a diferença estatística, a 5% de probabilidade.

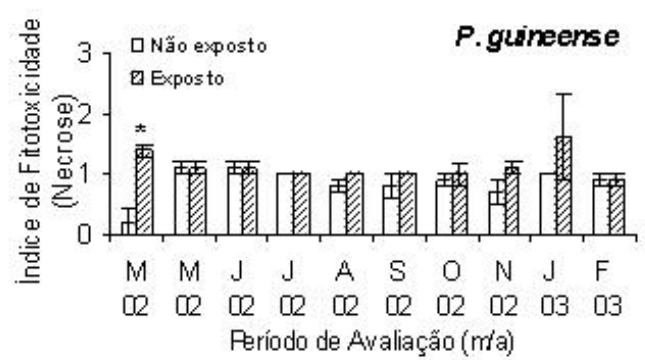
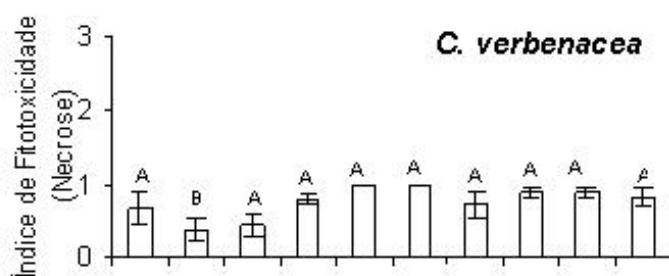


Figura 18- Índice de fitotoxicidade de necrose em *C. verbenacea*, nos meses de coleta e em *P. guineense*, em relação à interação entre os meses e locais de coleta. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

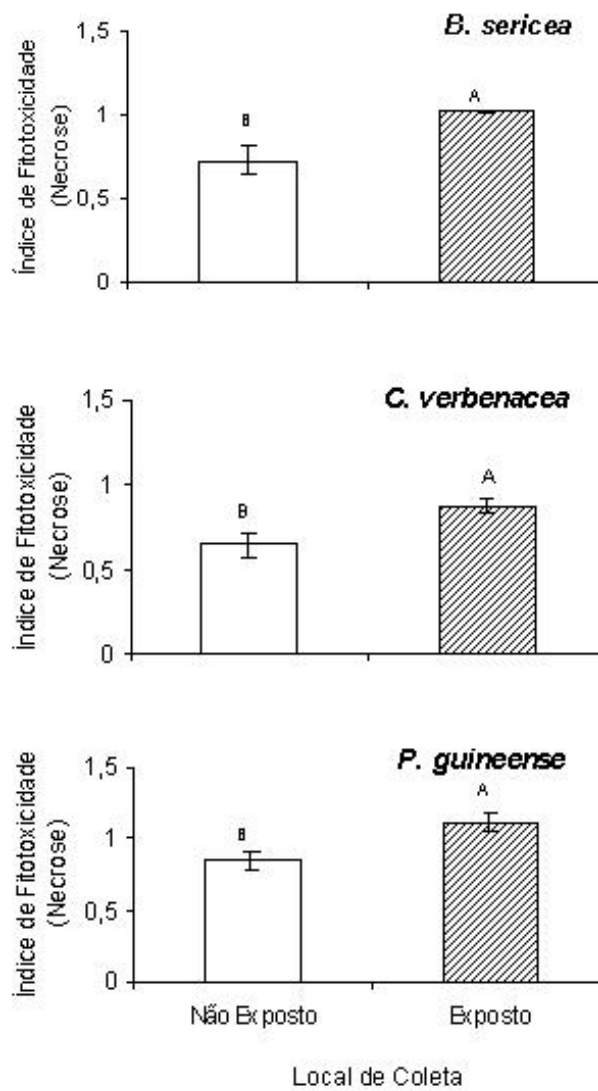


Figura 19- Índice de fitotoxicidade de necrose em *B. sericea*, *C. verbenacea* e em *P. guineense* nos locais de coleta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

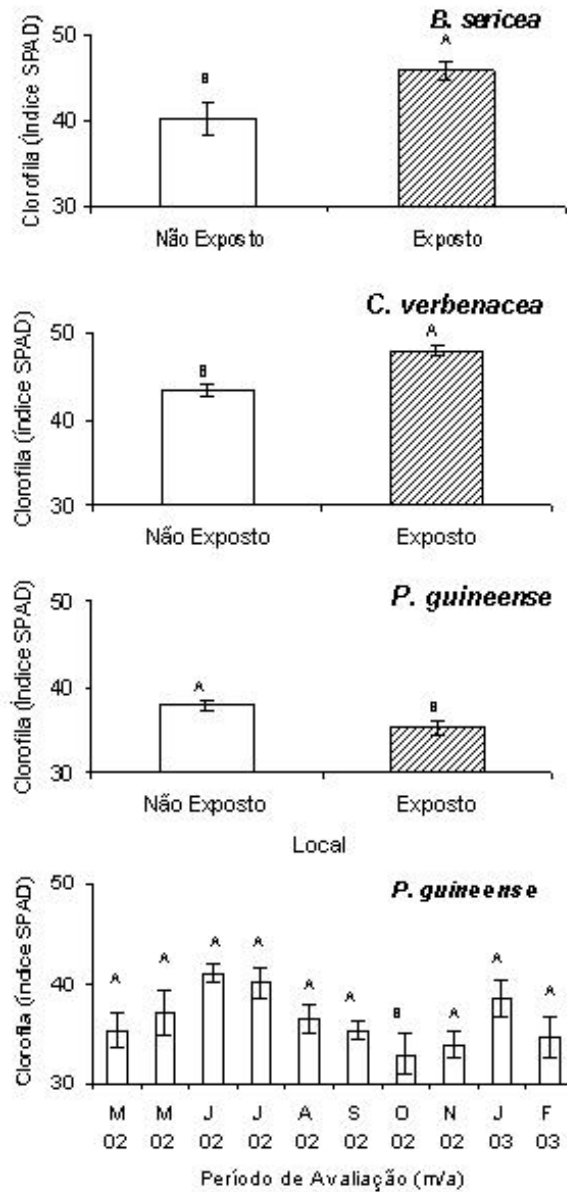


Figura 20- Teor de clorofila em plantas não-expostas e expostas, em *B. sericea*, *C. verbenacea* e *P. guineense*, e variação ao longo dos meses de avaliação em *P. guineense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

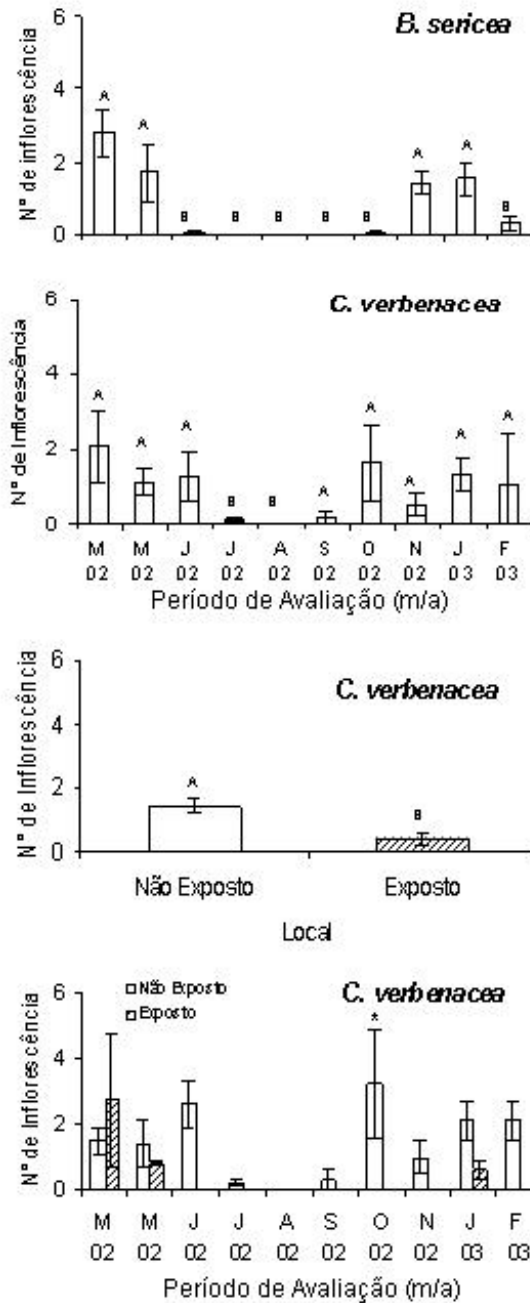


Figura 21- Número de inflorescências em *B. sericea* e em *C. verbenacea* nos meses de coleta; em *C. verbenacea*, variando com os locais de avaliação e com a interação entre os meses e locais de coleta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

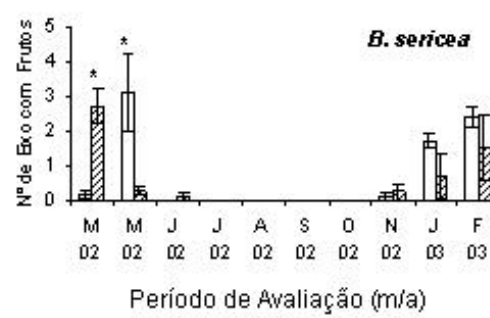
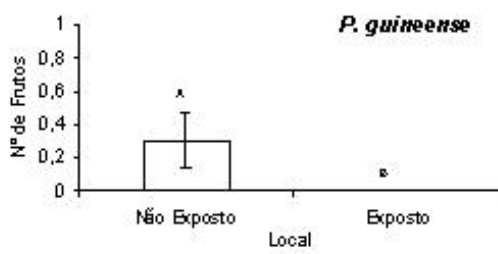
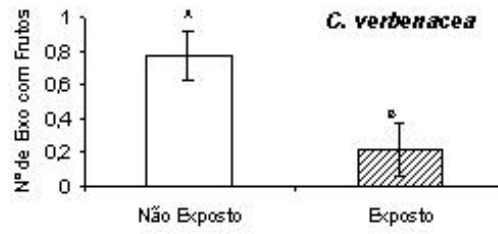
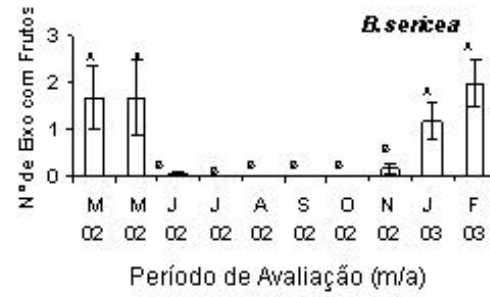
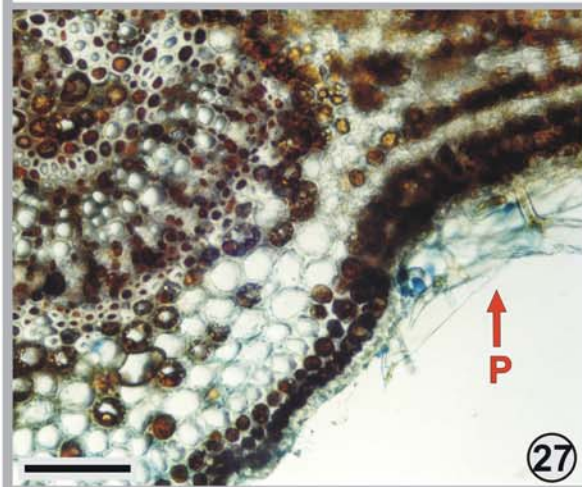
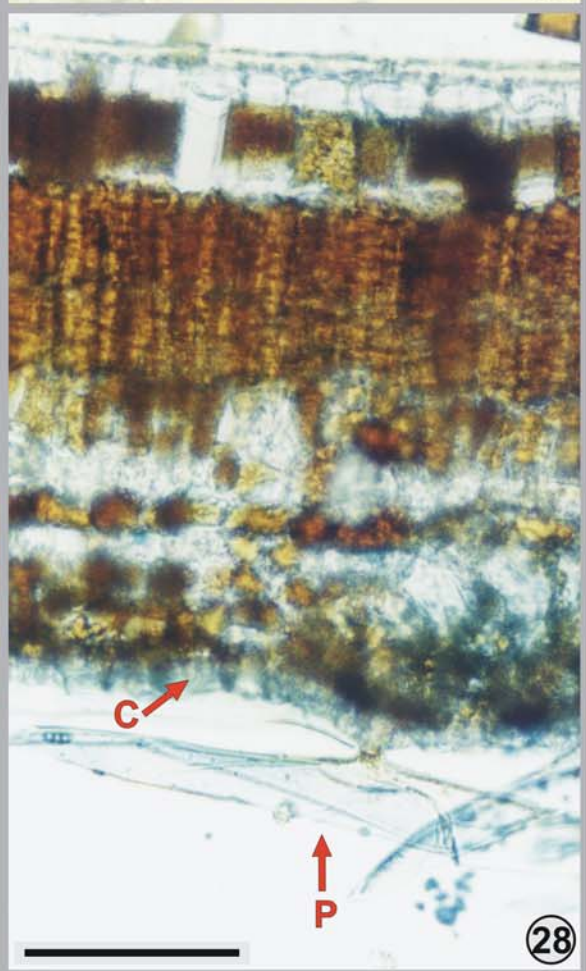
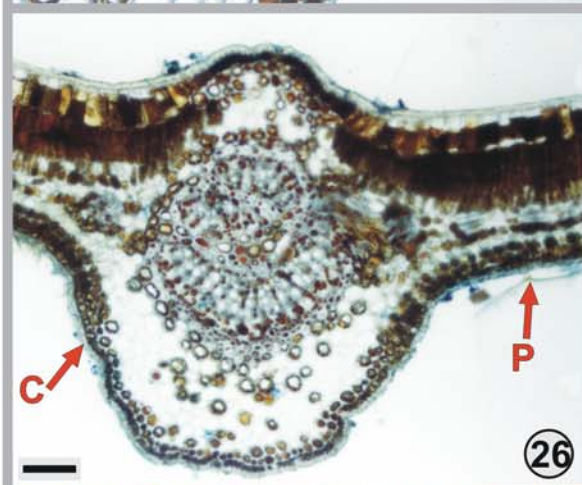
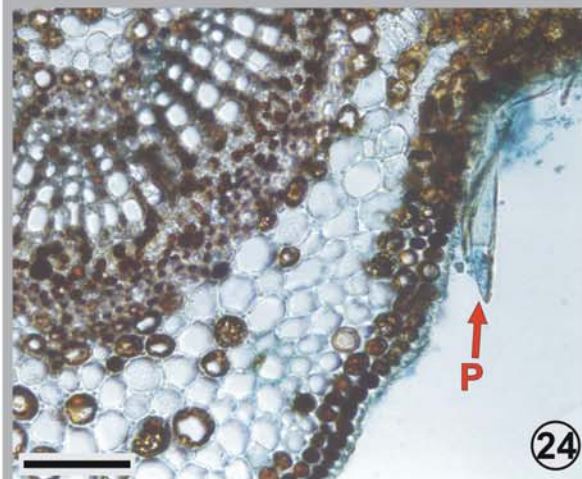
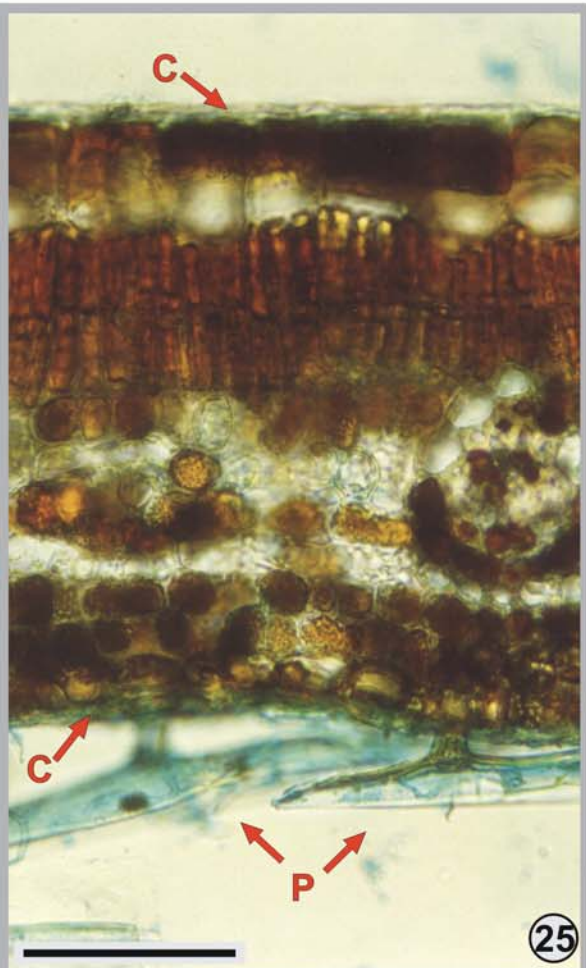
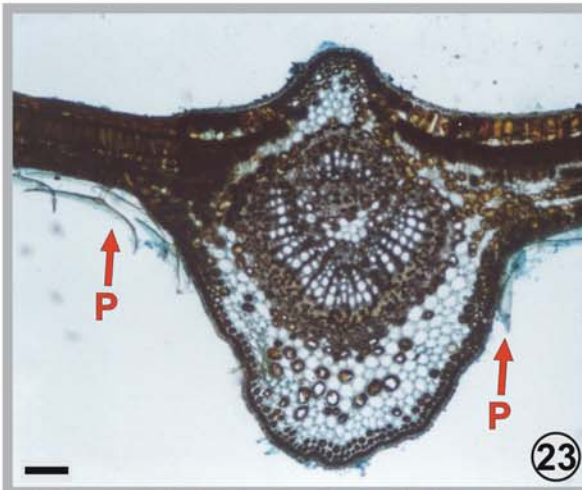


Figura 22- Número de eixo com frutos em *B. sericea* em função dos meses de coleta, em *C. verbenacea* e em *P. guineense*, nos locais de coleta e em *B. sericea*, na interação entre os meses e locais de coleta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Figuras 23-28- Detecção de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de folhas adultas de *B. sericea*, com azul de Prússia, observados ao microscópio fotônico. Figuras 23-25- Cortes realizados em folhas coletadas na área exposta às emissões da usina. Figuras 26-28- Cortes realizados em folhas coletadas na área não-exposta às emissões da usina. P - pêlos malpighianos e C - cutícula. Barras = 50 $\mu$ m.



epiderme das faces adaxial e abaxial da lâmina foliar (Figura 25) em comparação com um controle.

Folhas de *B. sericea* coletadas no local não exposto mostraram reação menos intensa que as plantas coletadas no local exposto, porém positiva nas cutículas e pêlos malpighianos que recobrem toda a face abaxial da folha (Figuras 26, 27 e 28) em comparação com o controle negativo.

Em cortes da lâmina foliar de *C. verbenacea* expostas às emissões da usina verificou-se reação positiva para o ferro nos pêlos, na epiderme, no colênquima, em algumas células do xilema e na endoderme localizada na nervura mediana (Figuras 29 e 30) quando se compara com as plantas sem reação, coletadas na mesma região (controle negativo). Todos os tecidos do mesofilo ficaram corados de azul nas plantas tratadas com ferrocianeto de potássio (Figuras 31 e 32). As células epidérmicas, da face adaxial e abaxial, incluindo o estômato, e o mesofilo também reagiram positivamente com a formação do azul de Prússia (Figuras 31 e 32) quando comparado com o controle negativo. Na face adaxial, observou-se maior acúmulo de ferro na célula da base do pêlo tector (Figura 31), na reentrância da epiderme adaxial onde se insere o pêlo glandular (Figura 32) e ao longo de todo o pêlo.

Nos cortes de *C. verbenacea* coletadas na área não exposta também foram verificadas reações positivas basicamente semelhantes às plantas coletadas na região exposta, mas a reação foi menos intensa (Figuras 33 a 35).

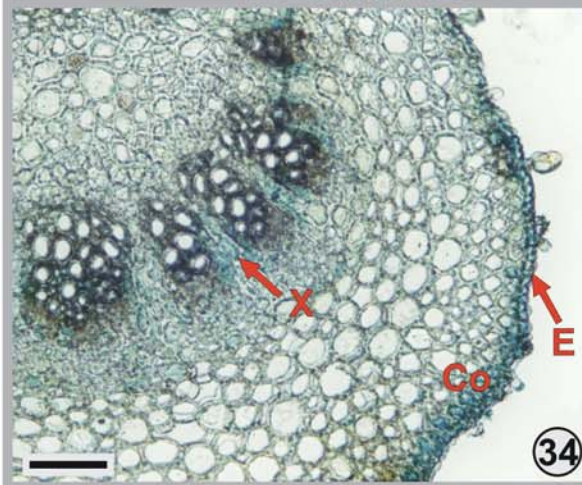
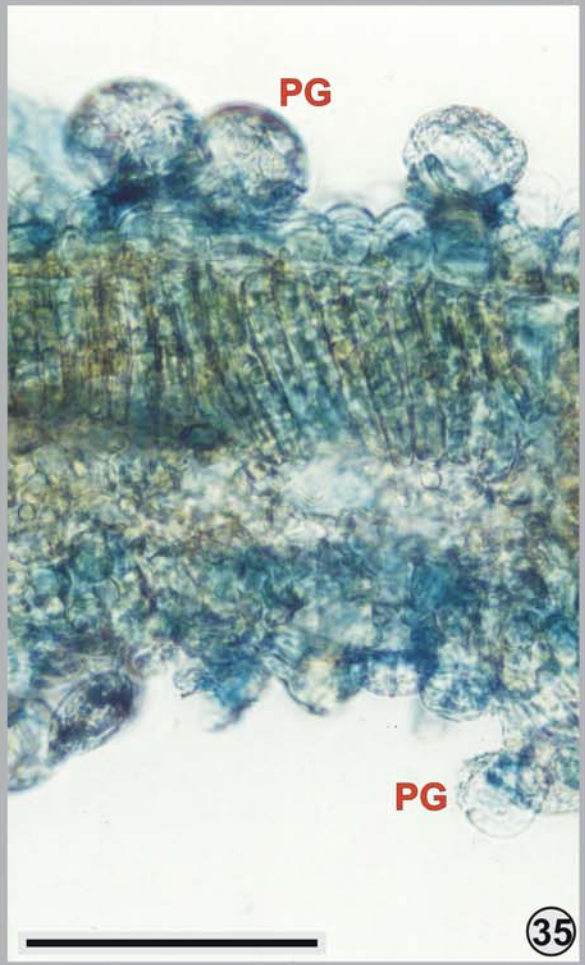
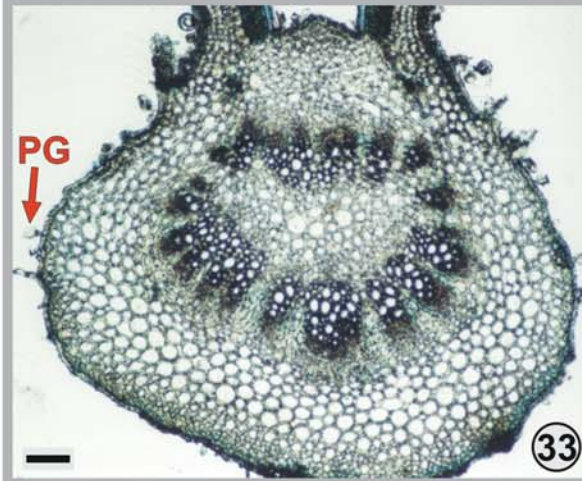
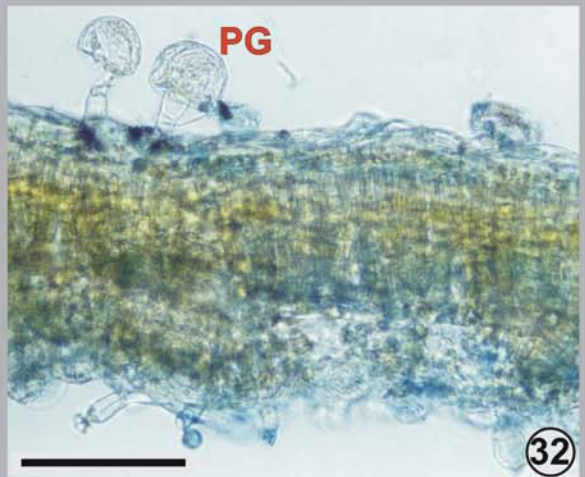
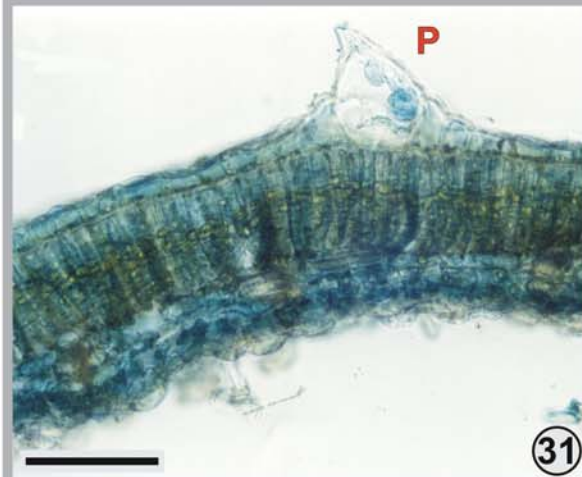
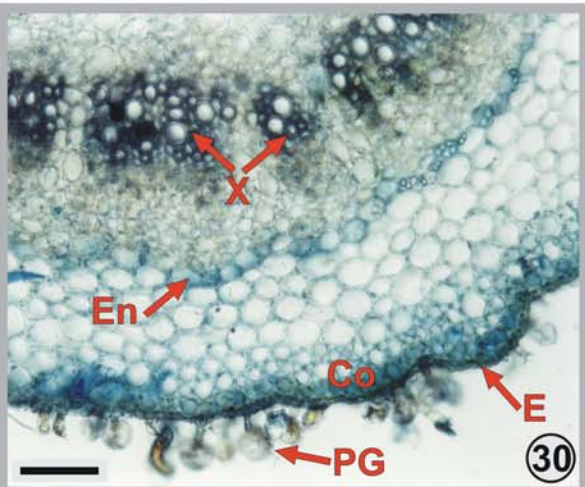
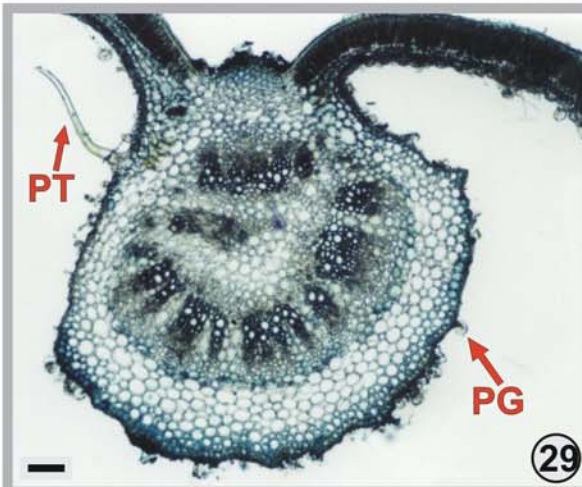
Nas folhas de *P. guineense* expostas ao ferro particulado, verificou-se que o ferro aderiu aos pêlos, penetrou nas células da epiderme, do colênquima e do parênquima da nervura mediana (Figuras 36 e 37), em comparação com o controle negativo. No mesofilo, verificou-se reação apenas na epiderme e nos pêlos (Figura 38).

Folhas de *P. guineense* coletadas no local não exposto mostraram reação positiva bastante sutil nos pêlos, nas epidermes, no colênquima e em algumas células parenquimáticas da nervura mediana (Figuras 39 e 40). No mesofilo, as observações foram semelhantes às plantas expostas, mas a reação foi menos intensa (Figura 41), quando comparada com o controle negativo.

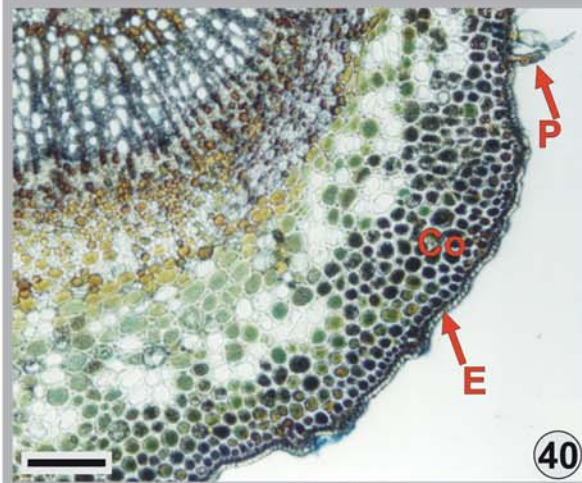
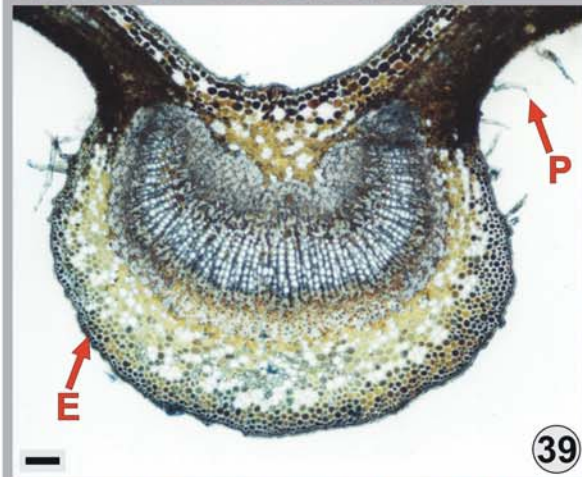
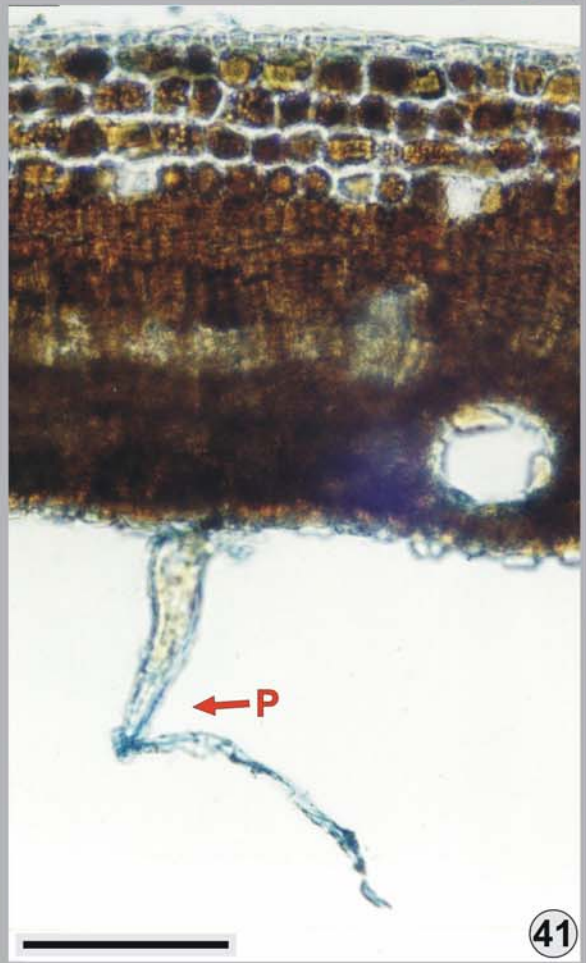
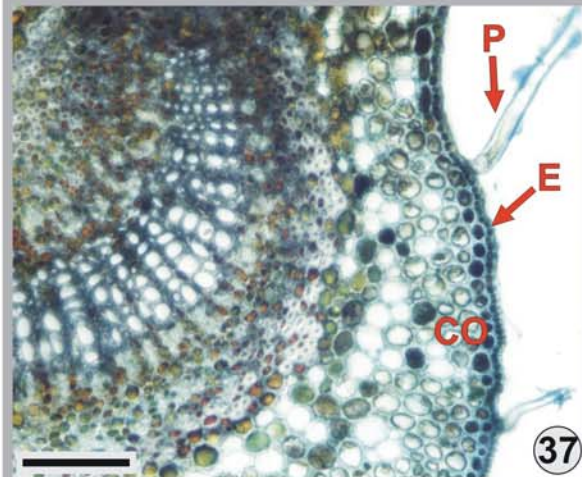
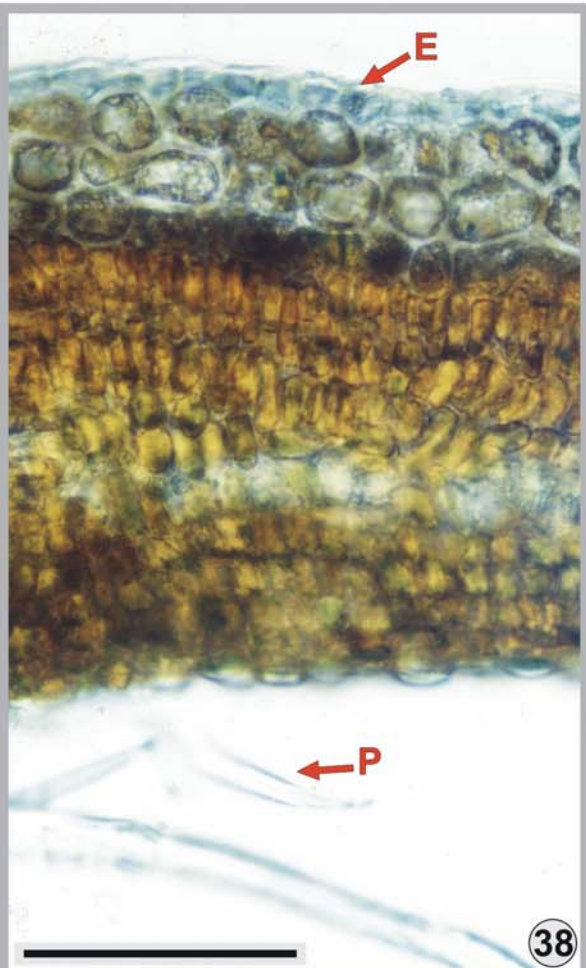
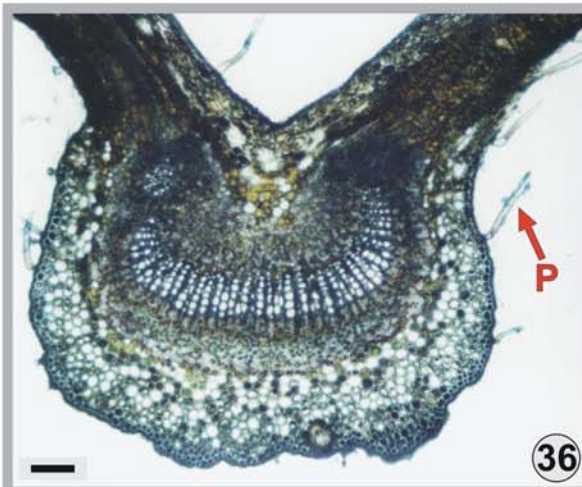
#### **4- Discussão e Conclusões**

A usina de pelotização está aumentando o nível de poluentes na atmosfera e ultrapassando o padrão secundário de deposição de partículas em suspensão

Figuras 29-35- Detecção de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de folhas adultas de *C. verbenacea*, com azul de Prússia, observados ao microscópio fotônico. Figuras 29-32- Cortes realizados em folhas coletadas na área exposta às emissões da usina. Figuras 33-35- Cortes realizados em folhas coletadas na área não-exposta às emissões da usina. PT - pêlo tector, PG - pêlo glandular, X – xilema, En – endoderme, Co – colênquima e E – epiderme. Barras = 50 $\mu$ m.



Figuras 36-41- Detecção de ferro em cortes transversais da lâmina foliar de folhas adultas de *P. guineense*, com azul de Prússia, observados ao microscópio fotônico. Figuras 36-38- Cortes realizados em folhas coletadas na área exposta às emissões da usina. Figuras 39-41- Cortes realizados em folhas coletadas na área não-exposta às emissões da usina. P - pêlos, E - epiderme e Co - colênquima. Barras = 50 $\mu$ m.



nos meses de junho de 2002 e janeiro de 2003. Com relação ao dióxido de enxofre, os valores emitidos foram aceitáveis pela resolução nº 3 do Conselho Nacional de Meio Ambiente de 1990. Os teores de ferro e enxofre encontrados no material vegetal confirmaram que tais poluentes estão sendo absorvidos pelas plantas em intensidades variáveis dependendo de fatores inerentes às plantas, do local e climáticos.

O solo da usina se mostrou ácido e com níveis elevados de alumínio ( $\text{Al}^{+3}$ ). A acidez, dentro de certos limites, favorece a disponibilização de alguns nutrientes para as plantas (Tamm, 1976), mas, também favorece a liberação de quantidade tóxica de alumínio ( $\text{Al}^{+3}$ ) e manganês ( $\text{Mn}^{+2}$ ). Além disso, a acidez pode provocar: redução da taxa de decomposição da matéria orgânica, lixiviação de nutrientes minerais, mudança na distribuição dos microorganismos do solo e diminuição na disponibilidade de molibdênio (Wood e Bormann, 1977; Olson, 1983; Mortvedt, 1983; Binns, 1985; Gorham, 1998). O baixo pH do solo e a presença de  $\text{Al}^{3+}$  podem estar contribuindo para os efeitos tóxicos observados nas plantas estudadas.

A maior absorção foliar de ferro metálico verificado em *C. verbenacea*, seguida de *P. guineense* e *B. sericea* devem estar relacionadas com a adesão das partículas depositadas nas folhas e com as características superficiais das mesmas, tais como serosidade e reentrâncias na lâmina foliar. As folhas mais rugosas e menos serosas, como as de *C. verbenacea*, tendem a reter maior quantidade de ferro particulado do que as folhas mais lisas e serosas, como as de *B. sericea*, na qual a precipitação pluviométrica e, ou a intensidade do vento podem reduzir a deposição foliar de ferro, à semelhança do verificado para outros poluentes (MacLean et al., 1989).

O teor de ferro encontrado em todas as espécies vegetais expostas às deposições particuladas e gasosas, durante este estudo, foram muito superiores ao nível crítico proposto de 300 a 500  $\text{mg.kg}^{-1}$  (Marschner, 1995; Dobermann e Fairhurst, 2000), demonstrando que as plantas absorvem o ferro emitido pela usina.

*B. sericea* apresentou teores mais elevados de clorofila, menor temperatura foliar, nenhuma variação no diferencial de temperatura folha-ar, maior número de folhas e nenhum efeito quanto ao lançamento de folhas novas, ao número de flores e frutos quando se expôs as plantas às emissões da usina, em relação ao

controle. Esta espécie foi, aparentemente, a menos afetada pela deposição particulada. Por outro lado, *C. verbenacea* apresentou maior teor de clorofila, maior temperatura foliar, assim como o diferencial de temperatura folha-ar, e menor número de folhas, flores e frutos. *P. guineense* apresentou menor teor de clorofila, maior diferencial de temperatura folha-ar e maior lançamento de folhas, embora o número de folhas tenha sido menor. Não apresentou flores e frutos neste local. A estratégia usada por *P. guineense*, portanto, parece ter sido o investimento na produção de novas folhas, já que as folhas adultas não se mantiveram nas plantas e não se verificou o desenvolvimento de flores e frutos. A deposição particulada de ferro afetou, portanto, a reprodução sexuada desta espécie, podendo levar, ao longo do tempo, a eliminação da referida espécie na área afetada pela usina à semelhança do citado por Grantz et al. (2003).

Um dos efeitos mais marcantes da deposição do ferro particulado nas folhas parece ser o aquecimento foliar, provocado pela obstrução dos estômatos, como observado em maior ou menor grau nas plantas avaliadas neste experimento. A diferença de temperatura da folha-ar aumentou em *C. verbenacea* e *P. guineense*, enquanto que em *B. sericea* não houve efeito significativo. Lopes et al. (2000) encontraram aumento no diferencial de temperatura folha-ar em *Sophora tomentosa* apenas nas plantas localizadas mais próximas da usina, enquanto que em *Rhedia brasiliensis* e em Myrtaceae, o diferencial de temperatura folha-ar aumentou nas plantas localizadas a até 800 m da fonte emissora. Segundo Larcher (1995) o aumento na temperatura das folhas provoca mudança na solubilidade dos gases, modifica as propriedades das membranas celulares, aumentando sua fluidez e alterando sua permeabilidade, diminui o metabolismo celular, modifica a atividade enzimática, provoca desnaturação de proteínas e afeta a estrutura química de macromoléculas como o DNA.

No mês de março, em que se verificou aumento significativo no diferencial de temperatura folha-ar nas três espécies, ocorreu considerável emissão de partículas totais e baixa precipitação pluviométrica. Este fato, parece, também justificar efeitos significativos sobre outros parâmetros como temperatura foliar em *C. verbenacea*, lançamento de folhas novas em *B. sericea* e *C. verbenacea*, número de folhas necrosadas nas três espécies, percentagem de folhas necrosadas em *B. sericea* e *C. verbenacea*, índice de fitotoxicidade de necrose em *P. guineense* e número de frutos em *B. sericea*.

Em *B. sericea*, no mês de março, verificou-se que, embora o diferencial de temperatura folha-ar das plantas expostas às emissões da usina e a percentagem de folhas necrosadas tenham aumentado, verificou-se também maior lançamento de folhas novas e antecipação da frutificação, tendo em vista que as plantas do local não-exposto o maior número de frutos ocorreu no mês de maio. A estratégia adotada por *B. sericea* garantiu a reprodução sexuada da espécie, à semelhança do citado por Grantz et al. (2003).

Em *C. verbenacea* verificou-se aumento no diferencial de temperatura folha-ar nos meses de junho e outubro, aumento na percentagem de folhas necrosadas e redução no número de flores no mês de outubro. Esta espécie foi a mais afetada pelas emissões da usina, comprometendo principalmente, a reprodução sexuada da espécie, que pode descaracterizar a vegetação original da restinga, com a persistência nas emissões.

Em *P. guineense* apesar de ter aumentado o diferencial de temperatura folha-ar no mês de outubro, não se observou diferenças em relação aos outros parâmetros.

O Parque Estadual Paulo César Vinha, usado como local não exposto ao ferro particulado proveniente da usina de pelletização em estudo, pode estar recebendo, na verdade, deposição particulada de outras mineradoras localizadas na região da grande Vitória, Espírito Santo, como a Companhia Vale do Rio Doce e Companhia Siderúrgica do Tubarão, implantadas nesta região. Devido a isto, algumas diferenças nas respostas entre as plantas do local exposto e do local não exposto, são sutis. O PEPCV é, portanto, um local referência usado para confrontar as respostas das plantas ao longo do presente experimento.

*B. sericea* foi a espécie que apresentou menor teor de ferro. A reação histoquímica mostrou que, neste caso, o metal ficou aderido aos pêlos malpighianos que se sobrepuseram na face abaxial da lâmina foliar e constituíram uma barreira à entrada de quantidade excessiva de ferro, protegendo os tecidos foliares. Na epiderme adaxial, a proteção dos tecidos pôde estar relacionada à presença de uma camada de hipoderme.

É provável que a estrutura anatômica de *P. guineense*, como a presença de duas a três camadas de hipoderme, tenham formado uma barreira junto à epiderme, impedindo a penetração do ferro metálico para o mesofilo, já que, pelos dados da quantificação de ferro, verificou-se estágio intermediário de acúmulo de ferro.

A estrutura anatômica de *C. verbenacea*, como as reentrâncias nas células epidérmicas das bases dos pêlos glandulares, parece ter proporcionado maior retenção de ferro particulado em suas folhas, em comparação com as outras espécies estudadas neste trabalho. Estudos têm mostrado que as bases dos pêlos são regiões permeáveis à entrada de poluentes (Evans, 1977; Azevedo, 1995; Chaves, 1997). A ausência de estruturas anatômicas que dificultam a penetração do ferro na planta, como os pêlos em *B. sericea* e hipoderme em *B. sericea* e *P. guineense*, podem ter colaborado para o maior acúmulo de ferro em *C. verbenacea*.

## 5- Bibliografia

- ARNDT, U., FLORES, F., WEINSTEIN, L. **Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil**. Porto Alegre: UFRGS, 155p., 1995.
- AZEVEDO, A. A. **Ação do flúor, em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de *Glycine max* (L.) Merrill**. São Paulo, SP: USP, 1995. 95 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, 1995.
- BANCROFT, J.D., STEVENS, A., TURNER, D.R. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill Livingstone, 4<sup>nd</sup> ed., 776 p., 1996.
- BINNS, W.O. Effects of acid depositions on forest and soils. **The Environmentalist**, v. 5, n. 4, p. 279-288, 1985.
- CHAVES, A. L. F. **Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-Rhodes) – Poaceae**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 79 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: nutrient disorders & nutrient management. Potash and Phosphate Institute and International Rice Research Institute. p. 1-4, 2000.
- EVANS, L. S., GMUR, N. F., COSTA, F. Leaf surface and histological perturbations of leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus* after exposure to simulated acid rain. **American Journal of Botany**, v.64, n.7, p.903-913, 1977.
- ELLENBERG, H., ARNDT, U., BRETTHAUER, R., RUTHSATZ, B., STEUBING, L. **Biological monitoring: signals from the environment**. Berlin: Vieweg, 318 p., 1991.
- GORHAM, E. Acid deposition and its ecological effects: a brief history of research. **Environmental Science & Policy**, v. 1, n. 1, p. 153-166, 1998.

- GRANTZ, D.A., GARNER, J.H.B., JOHNSON, D.W. Ecological effects of particulate matter. **Environment International**, v. 29, n. 1, p.213-239, 2003.
- KARNONSKY, M.J. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v. 27, n. 1, p. 27-137 A, 1965.
- KOZLOWSKI, T.T. Impacts of air pollution on forest ecosystems. **BioScience**, v. 30, n. 1, p. 89-93, 1980.
- LARCHER, W. **Physiological Plant Ecology**. Germany: Springer, 3 ed., 506 p., 1995.
- MACLEAN, D.C., SCHNEIDER, R.E., HANSEN, K.S., TROIANO, J.J. Effects of simulated acid rain on uptake, accumulation, and retention of fluoride in forage crops. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 43, n. 1, p. 191-198, 1989.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2 ed., California: Academic Press, California, 889 p., 1995.
- MORTVEDT, J.J. Impacts of acid deposition on micronutrient cycling in agroecosystems. **Environmental and Experimental Botany**, v. 23, n. 3, p. 243-249, 1983.
- MUDD, J.B., KOZLOWSKI, T.T. (Eds.). **Responses of plants to air pollution**. New York: Academic, 383 p., 1975.
- OLSON, R. A. The impacts of acid deposition on N and S cycling. **Environmental and Experimental Botany**, v. 23, n. 3, p.211-223, 1983.
- OTTAWAY, J.H. **Bioquímica da Poluição**. São Paulo: EDUSP, p. 33-35, 1982.
- RESOLUÇÕES CONAMA 1984 a 1991. **Resolução CONAMA n° 003/90**. Brasília, 4.ed., p. 199-205, 1992.
- TAMM, C.O., HALLBÄCKEN, L. Changes in soil acidity in two forests areas with different acid deposition: 1920s to 1980s. **Ambio**, v. 17, n. 1, p. 56-61, 1988.
- WOOD, T.; BORMANN, F.H. Short-term effects of a simulated acid rain upon the growth and nutrient relations of *Pinus strobus*, L. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 7, n. 1, p. 479-488, 1977.

## CONCLUSÕES GERAIS

A usina de pelotização contribuiu para o aumento do nível de material particulado e de dióxido de enxofre na atmosfera, algumas vezes, ultrapassando o padrão secundário admitido pela resolução nº 3 do Conselho Nacional de Meio Ambiente de 1990 (CONAMA). Os teores de ferro e enxofre encontrados no material vegetal confirmaram que tais poluentes foram absorvidos pelas plantas em intensidades variáveis dependendo de fatores inerentes às plantas, do local e climáticos.

Nas duas espécies, os teores total de ferro na folha foram maiores na estação mais próxima da fonte emissora, diminuindo em *C. hilariana* à medida em que se afastava da fonte emissora. Em *E. uniflora* não se verificou tal tendência.

*C. hilariana* apresentou maior teor de enxofre no material vegetal, do que *E. uniflora*, em especial nas plantas mais próximas da usina emissora.

O número de folhas em *E. uniflora* aumentou com o tempo de exposição, enquanto que em *C. hilariana* ele se manteve essencialmente constante. Nesta espécie, observou-se menor número de folhas nas plantas localizadas a 1700m da fonte emissora.

O número e a percentagem de folhas cloróticas e necróticas, assim como o índice de fitotoxicidade foliar aumentaram à medida em que aumentou o tempo de exposição ao ferro particulado e ao SO<sub>2</sub> e coincidiram com a época em que houve maior emissão de ferro particulado (meses de fevereiro e março).

As duas espécies apresentaram menos clorofila no final do período de exposição, e apenas *E. uniflora* apresentou maior clorofila a 800 m da fonte emissora.

O SO<sub>2</sub> e a deposição particulada de ferro aumentaram a permeabilidade das membranas celulares de *C. hilariana* nas estações mais próximas à fonte emissora. Em *E. uniflora* não foi verificada tal relação.

Em *C. hilariana* observou-se efeito das deposições sobre as variáveis **g<sub>s</sub>**, **E** e **A** nas plantas mais distantes da fonte emissora. Em *E. uniflora*, apenas **E** foi afetado e a 1700m da fonte. Nas duas espécies, entretanto, não se observou redução na produção de matéria seca total das plantas nas diferentes estações analisadas.

Dentre as plantas que acumularam maiores e menores teores de ferro, verificou-se que apenas **A** foi reduzida em *E. uniflora* e **g<sub>s</sub>** e **E** aumentaram em *C. hilariana*, demonstrando danos nos movimentos estomáticos.

As plantas de *E. uniflora* expostas à chuva ácida mostraram-se mais vulneráveis às alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas do que as plantas de *C. hilariana*, que apresentaram alta atividade das enzimas antioxidativas que permitiu que a espécie tolerasse os efeitos das chuvas simuladas.

Plantas de *Eugenia uniflora* submetidas à chuva ácida apresentaram maior índice de fitotoxicidade de necroses, assim como, de condutância estomática, da transpiração e da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ao longo do experimento, redução da clorofila a, da clorofila b e do caroteno e maior atividade da peroxidase.

As características estruturais das folhas, juntamente com o metabolismo ácido das crassuláceas, colaboraram para que *C. hilariana* apresentasse menos danos que *E. uniflora* em resposta à chuva ácida, embora tenham sido observadas grandes alterações celulares nas raras necroses pontuais encontradas.

As alterações anatômicas observadas nas folhas de *E. uniflora* indicam que o efeito da chuva ácida iniciou-se a partir da cutícula, ao contrário do observado em *C. hilariana*, na qual a rota de entrada da chuva ácida se deu a partir dos estômatos.

Acúmulo de compostos fenólicos e grãos de amido foram verificados nas células parenquimáticas vizinhas às necroses; adicionalmente, observou-se desenvolvimento de tecido de cicatrização ao redor das necroses, semi-plasmólise e colapso das células afetadas.

As mudas de *C. hilariana* apresentaram grande resistência ao tratamento com chuva ácida simulada podendo ser usadas no reflorestamento de áreas impactadas pela ação da chuva ácida.

*B. sericea*, parece ter sido a espécie menos afetada pelas deposições particuladas e gasosas do SO<sub>2</sub>, pois, mesmo em local exposto apresentaram mais clorofila, menor temperatura foliar, maior número de folhas e não sofreram redução no lançamento de folhas novas, e no número de flores e frutos. Além dessas características, esta espécie antecipou a frutificação no local exposto, garantindo a perpetuação de sua espécie.

*C. verbenacea* no local exposto apresentou mais clorofila, temperatura foliar mais elevada e menor número de folhas, flores e frutos. Parece ter sido, dentre as espécies analisadas, a mais afetada pelas emissões da usina.

As plantas de *P. guineense* expostas às emissões da usina produziram menos clorofila, maior temperatura entre o ar e a planta, maior lançamento de folhas novas, e menor número de folhas. As deposições podem ter afetado a reprodução sexuada desta espécie, pois, não se verificou flores e frutos nas plantas presentes no local exposto.

*C. verbenacea* acumulou maior quantidade de ferro que as demais espécies, provavelmente por causa do maior número de reentrâncias nas bases dos tricomas glandulares. *B. sericea* acumulou menor quantidade de ferro devido a presença de hipoderme e tricomas malpighianos, enquanto que em *P. guineense*, a proteção parece ter sido viabilizada pela hipoderme.

A detecção histoquímica mostrou diferenças específicas para a deposição de ferro metálico, provavelmente relacionadas com a estrutura anatômica, como os pêlos malpighianos e hipoderme em *B. sericea* e a hipoderme em *P. guineense*.