



ZÉLIA TEREZINHA TEIXEIRA ROSSI

**CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS,
ANATÔMICAS E ULTRAESTRUTURA DE *Vitex*
polygama CHAM. (VERBENACEAE)
SUBMETIDA À DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR**

LAVRAS – MG

2012

ZÉLIA TEREZINHA TEIXEIRA ROSSI

**CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E
ULTRAESTRUTURA DE *Vitex polygama* CHAM. (VERBENACEAE)
SUBMETIDA À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, área de concentração Ecologia e Conservação de Recursos Naturais em Paisagens Fragmentadas e Agrossistemas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

Orientador

Prof. Dr. João Paulo R. A. D. Barbosa

Coorientador

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Rossi, Zélia Terezinha Teixeira.

Características ecofisiológicas, anatômicas e ultraestrutura de *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae) submetida à diferentes concentrações de flúor / Zélia Terezinha Teixeira Rossi. – Lavras : UFLA, 2012.

91 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. Ecofisiologia. 2. Fluorescência da clorofila a. 3. Anatomia vegetal. 4. Microscopia eletrônica. 5. Biomonitoramento. I.

Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.88045222

ZÉLIA TEREZINHA TEIXEIRA ROSSI

**CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E
ULTRAESTRUTURA DE *Vitex polygama* CHAM. (VERBENACEAE)
SUBMETIDA À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, área de concentração Ecologia e Conservação de Recursos Naturais em Paisagens Fragmentadas e Agrossistemas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012.

Dr. Fernando Antônio Frieiro Costa UNILAVRAS

Dr. Fabrício José Pereira UFLA

Dr. Evaristo Mauro de Castro
Orientador

Dr. João Paulo R. A. D. Barbosa
Coorientador

LAVRAS – MG

2012

A Deus, sempre ao meu lado.
Ao papai, mamãe e Bruno, as pessoas mais importantes da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelas bênçãos e graças recebidas, por tornar possível chegar até aqui, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho e também pelos obstáculos que tanto me fizeram crescer.

Ao meu pai e à minha mãe que estão sempre ao meu lado, sendo sinônimo de força e alegria em todos os momentos.

Ao meu irmão e grande amigo Bruno, por todo o apoio sempre, e pelo auxílio precioso também na execução deste trabalho. Foi ótimo e divertidíssimo ter um auxílio deste futuro engenheiro maravilhoso!

Também agradeço a todos os meus tios e primos, que significam muito mais do que apenas familiares. Ao vovô Nelson e a vovó Dinha, que mais do que saudade deixaram exemplos preciosos de humildade e da importância do trabalho, e à vovó Zélia e vovô Lauro, pelo exemplo de coragem e força.

Ao Giu, que esteve sempre presente de uma forma ou de outra neste trabalho (ainda que por telefone) desde o planejamento até a execução, por me ajudar tanto e por dizer-me em todos os momentos: “Calma, vai dar certo!” À Gra, que também ajudou imensamente, tanto na execução quanto no planejamento! Tenho uma grande estima por vocês, obrigada pela amizade!

Ao meu orientador professor Dr. Evaristo Mauro de Castro, por todos os ensinamentos, amizade, disponibilidade e atenção.

Ao meu coorientador professor Dr. João Paulo Barbosa, por também ter colaborado imensamente para este trabalho, e pelas idéias, sugestões e auxílio.

Ao Gabriel, Cynthia, Marinês, Leandro, Tati e Vinícius, por toda a ajuda. À Silvinha, Yve, Filipe, aos amigos da Ecologia, da música, da conferência e do Emaús, pela valiosa amizade e por tornarem todos os momentos mais especiais e divertidos.

Ao professor Dr. Luís Lima, ao Joel, à Elo, à Cláudia, à Lenira (EPAMIG), ao professor Dr. Eduardo Alves e ao professor Dr. Fabrício, pela enorme ajuda, amizade, disponibilidade e pelas contribuições valiosas acerca deste estudo, só tenho a agradecer imensamente.

Aos professores Dr. Fernando, Dra. Mariana e Dr. Fabrício, por aceitarem o convite de participar da banca.

Ao meu primo Marco Aurélio (Marquinho), pela imensa ajuda na parte química. Ao pessoal da Universidade Federal de Viçosa (professoras Aristéa e Luzimar, Sarah e Nayara), que auxiliaram enormemente na parte da quantificação.

À Cemig, por ter disponibilizado as mudas.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Setor de Ecologia do Departamento de Biologia, pela oportunidade de realizar o mestrado.

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

À Fapemig, pelo financiamento das análises de microscopia eletrônica de transmissão e de microscopia eletrônica de varredura.

Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram diretamente ou indiretamente (simplesmente por estarem presentes, por serem extremamente importantes na minha vida), meu mais sincero **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

O flúor (F), liberado por indústrias ligadas à produção de alumínio, adubos, vidros e cerâmicas, é um elemento de elevada toxicidade, podendo causar danos em plantas em concentrações relativamente pequenas. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar os efeitos do F sobre *Vitex polygama* Cham., visando obter informações que permitam maior entendimento do mecanismo de ação deste poluente nesta espécie e a possibilidade de sua utilização no biomonitoramento da poluição atmosférica. Para isto, plantas foram expostas a chuvas simuladas contendo fluoreto de potássio em concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹, e a um tratamento controle contendo água deionizada por 15 minutos durante 10 dias. As plantas de *Vitex polygama* não demonstraram injúrias visuais após o término das simulações, e acumularam uma quantidade relativamente baixa de F, significativa apenas para os tratamentos com maiores concentrações do poluente. Foi observado aumento do quenching não-fotoquímico (qN) e do coeficiente devido à extinção não-fotoquímica (NPQ) nas doses crescentes de flúor, o que indica aumento da dissipação da energia radiante na forma de calor. O F promoveu alterações estruturais nos cloroplastos, citoplasma e membrana celular, além de danos nas ceras epicuticulares e irregularidades no formato e na parede de células epidérmicas. Não foram verificadas alterações na espessura dos tecidos foliares das plantas expostas ao poluente. Os resultados obtidos demonstram uma considerável resistência de *Vitex polygama* ao F e reforçam o valor prognóstico das análises fisiológicas, anatômicas e ultraestruturais na detecção de danos pelo poluente na estrutura foliar da espécie.

Palavras-chave: Ecofisiologia. Fluorescência da clorofila *a*. Microscopia eletrônica. Anatomia vegetal. Biomonitoramento.

ABSTRACT

Fluorine (F), released during the manufacture of aluminum, fertilizers, glass and ceramics, is an element highly toxic that can cause damage to plants in relatively small concentrations. In this study, we aimed to evaluate the effects of this pollutant on *Vitex polygama* Cham., in order to obtain information that enable a better understanding of fluorine action mechanism on this species and the possibility of using it in biomonitoring studies. With this purpose, plants were exposed to simulated rain containing potassium fluoride in concentrations of 5, 10, 15 and 20 mg L⁻¹, and to a control treatment containing deionized water for 15 minutes during 10 days. *Vitex polygama* presented no visual injuries after the end of the simulations, and accumulated a relatively small amount of F, significant only for the treatments with higher concentrations of the pollutant. An increase in non-photochemical quenching (qN) and in the coefficient due to non-photochemical extinction (NPQ) was observed in the increasing fluoride doses, which indicates higher dissipation of radiant energy as heat. F promoted structural changes in the chloroplasts, cytoplasm and cell membrane, damages in epicuticular waxes and irregularities in the epidermal cell walls. No significant change was detected in the leaf tissue thickness of the plants exposed to the pollutant. The results demonstrate a considerable resistance of *Vitex polygama* against F and reinforce the prognostic value of physiological, anatomical and ultrastructural analysis in the detection of damages caused by the pollutant in the leaf structure of this species.

Keywords: Ecophysiology. Chlorophyll *a* fluorescence. Electron Microscopy. Plant anatomy. Biomonitoring studies.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1 Folíolos de *Vitex polygama* expostos a diferentes concentrações de fluoreto de potássio na chuva simulada, durante 10 dias. A: tratamento controle (0 mg L⁻¹); B: 5 mg L⁻¹; C: 10 mg L⁻¹; D: 15 mg L⁻¹; E: 20 mg L⁻¹. Barras = 2 cm.46
- Gráfico 1 Teor de flúor (µg g⁻¹ MS) nas plantas de *Vitex polygama* expostas a diferentes concentrações de fluoreto de potássio (0, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹) em chuva simulada, durante dez dias consecutivos. As barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=8). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si, segundo o teste Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade.....48
- Gráfico 2 Quenching não-fotoquímico (qN) em indivíduos de *Vitex polygama*, em relação às concentrações de KF na chuva simulada (em mg L⁻¹), após 10 dias de simulações. As barras verticais representam o desvio-padrão da média.52
- Gráfico 3 Coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) em indivíduos de *Vitex polygama*, em relação às concentrações de KF na chuva simulada (em mg L⁻¹), após 10 dias de simulações. As barras verticais representam o desvio-padrão da média.53
- Figura 2 Fotomicrografias de clorênquimas de folíolos de *Vitex polygama* Cham. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A) e quando expostos a 5 (B), 10 (C), 15 (D e E) e 20 mg L⁻¹ (F) de fluoreto de potássio durante 10 dias. B, C, D, F: cloroplastos deformados, com maior tamanho e ondulações na parede; B, C, D: grãos de amido de grande tamanho

no interior dos cloroplastos; E: destacamento e rompimento da membrana plasmática (seta); B, E, F: citoplasma com aparência granular. Barra=2 μm56

Figura 3 Fotomicrografias de clorênquimas de folíolos de *Vitex polygama* Cham. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A) e quando expostos a 5 (B), 10 (C), 15 (D) e 20 mg L^{-1} (E e F) de fluoreto de potássio durante 10 dias. B, C, E, F: cloroplastos deformados, com maior tamanho e ondulações na parede; B, C, E: grãos de amido de grande tamanho no interior dos cloroplastos; B, C, D, F: citoplasma com aparência granular; E: rompimento de vesículas nas células, liberando compostos elétrons-densos. Barras= 1 μm (F) e 2 μm (A,B,C,D,E). ...57

ARTIGO 2

Figura 1 Fotomicrografias da superfície abaxial de folíolos de *Vitex polygama* no tratamento controle (A) e quando expostos a 5 (B), 10 (C), 15 (D e E) e 20 (F) mg L^{-1} de fluoreto de potássio durante 10 dias. B, D, E, F: presença de hifas fúngicas; C: ruptura da cera epicuticular (seta); E: acúmulo de cera epicuticular (seta). Barras= 10 μm (C) e 20 μm (A,B,D,E,F).77

Figura 2 Fotomicrografias da superfície adaxial de folíolos de *Vitex polygama* no tratamento controle (A) e quando expostos a 5 (B), 10 (C), 15 (D) e 20 (E e F) mg L^{-1} de fluoreto de potássio durante 10 dias. E, F: presença de hifas fúngicas (setas claras); C e E: cera epicuticular mais proeminente; B, D, E: erosão de cera epicuticular devido ao seu acúmulo (setas escuras). Barras= 10 μm (B) e 20 μm (A,C,D,E,F).78

Figura 3 Secção transversal da estrutura foliar de *Vitex polygama* em microscopia de luz, no tratamento controle (A) e quando exposta a 5 (B), 10 (C), 15 (D) e 20 mg L⁻¹ (E) de fluoreto de potássio. D: formato celular alterado (seta). E: alteração na parede anticlinal de células epidérmicas (seta). Barra=50 µm82

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Tabela 1 Efeitos de diferentes concentrações de fluoreto de potássio na chuva simulada, após 10 dias, sobre as seguintes características estruturais de folíolos de <i>Vitex polygama</i> : espessuras do limbo foliar (LF), da epiderme da face adaxial (ED), do parênquima paliçádico (PP), do parênquima esponjoso (PE) e da epiderme da face abaxial (EB).....	84
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Poluição atmosférica por flúor	16
2.2	Efeitos do flúor nas plantas	17
2.2.1	Efeitos em níveis macroscópicos.....	18
2.2.2	Efeitos em níveis microscópicos.....	21
2.2.3	Efeitos em nível de comunidades e ecossistemas.....	23
2.3	Uso de espécies vegetais no monitoramento da poluição por flúor	24
2.4	Interação do flúor com outros poluentes.....	27
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
	REFERÊNCIAS	30
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	37
	ARTIGO 1 Fluorescência da clorofila <i>a</i> e ultraestrutura de <i>Vitex polygama</i> CHAM. (Verbenaceae) submetida à diferentes concentrações de Flúor.....	37
1	INTRODUÇÃO	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.1	Análise visual e acúmulo de Flúor.....	45
3.2	Fluorescência da clorofila <i>a</i>	51
3.3	Análise ultraestrutural	55
4	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS	61
	ARTIGO 2 Características anatômicas e ultraestruturais em <i>Vitex polygama</i> CHAM. (Verbenaceae) submetida ao Flúor.....	68
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
3.1	Modificações ultraestruturais.....	76
3.2	Análise anatômica.....	80
4	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS	87

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O flúor (F) e os fluoretos (F⁻), liberados durante a manufatura de alumínio, cerâmicas, vidros e aço, estão entre as substâncias mais perigosas, uma vez que o F é o elemento mais eletronegativo e o ametal mais quimicamente ativo (FORNASIERO, 2001). Em espécies susceptíveis, este elemento pode causar injúrias em concentrações atmosféricas 10 a 1000 vezes menores que outros poluentes, tais como ozônio, dióxido de enxofre, óxidos de nitrogênio e pesticidas, além de poder apresentar efeito cumulativo (WEINSTEIN, 1977).

Na vegetação, os danos causados pelo F incluem de injúrias visuais (FORNASIERO, 2001) a alterações celulares (MILLER, 1993), fisiológicas (BOESE; MACLEAN; EL-MOGAZI, 1995), anatômicas (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005) e bioquímicas (REDDY; KAUR, 2008), e podem se estender a outros organismos através da rede trófica (FORNASIERO, 2003). Sabe-se que a vegetação de determinada área pode continuar a ser influenciada por emissões de flúor do passado, mesmo que a concentração atual de F na atmosfera não represente ameaça (KLUMPP et al., 1996). Alguns trabalhos têm mostrado o acúmulo de F e danos induzidos por este elemento em plantas localizadas ou transplantadas próximas ou a maiores distâncias de fontes emissoras, tais como necroses foliares (FORTES et al., 2003; KLUMPP et al., 1996), diminuição do crescimento (FORNASIERO, 2003; KLUMPP et al., 1996; PANDEY, 2005) e alterações bioquímicas (FORNASIERO, 2003).

Segundo Weinstein e Davison (2004), ainda não é possível um entendimento completo dos eventos que ocorrem em plantas expostas ao flúor.

Sendo assim, mais estudos são necessários para ampliar o conhecimento a respeito da influência deste poluente em organismos vegetais.

O uso de organismos vivos em programas de monitoramento de poluição atmosférica tem se mostrado muito vantajoso, fornecendo dados não possíveis de serem avaliados pelo monitoramento físico convencional. Entre estes, pode-se citar: avaliação dos efeitos cumulativos do poluente no organismo, detecção de poluentes presentes no ambiente em concentrações muito baixas, estudo dos efeitos sinérgicos do poluente com outras substâncias ou com fatores ambientais, e possibilidade de uma abordagem mais realista dos impactos da substância poluidora sobre o ambiente e o ser humano (FALLA et al., 2000).

Determinadas espécies podem reagir visualmente a um poluente (bioindicadores), enquanto outras, chamadas biossensores, não apresentam sintomas visuais, embora possam acumular o agente estressor ou apresentar danos em níveis microscópicos, fisiológicos e bioquímicos (TEMMERMAN et al., 2004). Em ambos os casos, mostra-se de maior interesse o uso de espécies da flora local para o biomonitoramento, uma vez que estão adaptadas às condições ambientais locais, não apresentando alterações mediadas pelo ambiente que mascarem os sintomas específicos do organismo ao poluente (ELLENBERG, 1991).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos da chuva simulada com diferentes concentrações de flúor (0, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹) sobre folhas de *Vitex polygama* Cham., visando uma possível indicação da espécie como bioindicadora ou biossensora deste poluente. Isto foi feito através da detecção da ocorrência ou não de danos visíveis e de acúmulo de flúor nas plantas expostas ao poluente, e da avaliação do seu efeito sobre características da fluorescência da clorofila *a*, a ultraestrutura e a anatomia foliar desta espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Poluição atmosférica por flúor

O flúor está naturalmente presente na natureza, em rochas minerais, solos, gases liberados por vulcões, na água e até mesmo em tecidos vegetais e animais. Entretanto, fontes industriais podem aumentar significativamente a concentração deste elemento no ambiente e nos organismos, podendo resultar em danos (MILLER, 1993).

Atividades ligadas a fundições de alumínio, produção de adubos minerais (como fertilizantes fosfatados), fabricação de vidros e cerâmicas, entre outras, podem emitir ácido fluorídrico (HF) e tetrafluoreto de silício (SiF₄) na atmosfera. Estes compostos são altamente reativos e de uma a três vezes mais tóxicos do que outros poluentes comuns, como o ozônio, dióxido de enxofre, cloretos e nitrato de peroxi-acetila (PAN). Isto faz com que a presença de quantidades relativamente pequenas de F na atmosfera possa causar danos extensos a organismos vegetais (WEINSTEIN; DAVISON, 2003). Recentemente, o aumento no uso de pesticidas que apresentam F em sua constituição, como a criolita, também tem constituído importante fonte deste elemento no ambiente (CAPE; FOWLER; DAVISON, 2003). Na atmosfera, o F pode ser encontrado na forma gasosa ou particulada, sendo esta última menos tóxica (KOZYRENKO et al., 2007).

Os danos causados pelo flúor sobre a vegetação foram reconhecidos há mais de um século, e estimularam o desenvolvimento de pesquisas para o estabelecimento de diretrizes que resultassem em melhoria da qualidade do ar. Nos últimos 50 anos, estima-se que as emissões de F por tonelada de alumínio tenham diminuído, devido ao avanço do uso de tecnologias mais “limpas”.

Entretanto, incidentes como liberações acidentais do poluente podem resultar em danos agudos na vegetação que se estende por vários quilômetros de distância da fonte poluidora (CAPE; FOWLER; DAVISON, 2003), uma vez que o F particulado pode ser transportado pelo vento a distâncias maiores que 100 km (ROZHKOV; MIKHAILOVA, 1993).

O F não é biodegradável, e, portanto, pode se acumular lentamente no meio ambiente (FORNASIERO, 2003). O acúmulo em organismos vegetais possibilita que este poluente entre na rede trófica através dos herbívoros e volte ao solo por meio dos dejetos animais (WEINSTEIN, 1977). Plantas com elevadas concentrações de flúor são impróprias para a ingestão pelos herbívoros, uma vez que, em animais, este elemento pode se acumular nos ossos e dentes, causando lesões e deformações, além de danos no metabolismo destas estruturas (WEINSTEIN; DAVISON, 2004). Tudo isto aliado ao fato de que tanto as plantas quanto os animais são capazes de desintoxicar este poluente apenas fracamente, faz com que os danos possam chegar até o ser humano, também por meio da rede trófica (FORNASIERO, 2003).

2.2 Efeitos do flúor nas plantas

O flúor, encontrado na atmosfera principalmente na forma de ácido fluorídrico (HF) (ARNDT; FLORES; WEINSTEIN, 1995), pode ser absorvido nas plantas por meio dos estômatos (MILLER, 1993). Outras formas pelas quais o F pode penetrar nas folhas são por difusão através da cutícula (TRESHOW; ANDERSON, 1989) e pela base dos tricomas (CHAVES et al., 2002). Entretanto, acredita-se que a entrada do F ocorre preferencialmente via estômatos, uma vez que este composto se acumula bem menos quando estes se encontram fechados (MILLER, 1993). Ao entrar na folha, o F pode ser

transportado no apoplasto através da corrente transpiratória, se acumulando em níveis tóxicos no ápice e nas margens foliares (CHOI et al., 2006).

O F pode entrar no solo por meio de precipitação, deposição seca e serrapilheira contaminada (ARNESEN, 1997), e, a partir da lixiviação, atingir corpos d'água ou lençóis freáticos (ARNESEN; KROGSTAD, 1998). Por estar presente no ambiente edáfico, este composto pode entrar nas plantas através de absorção pelo sistema radicular. Entretanto, se este poluente estiver presente tanto no solo quanto na atmosfera, a absorção direta do F atmosférico pelas folhas é predominante (DOMINGOS et al., 2003) ou pode até mesmo mascarar sua absorção pelas raízes (KLUMPP et al., 1996). Braen e Weinstein (1985) afirmaram que o solo não é uma fonte de níveis tóxicos de F para a maioria das plantas. Desta forma, a maioria dos estudos relacionados aos efeitos do F sobre organismos vegetais se concentra nas alterações provocadas nas folhas, devido a este órgão constituir a principal via de entrada do poluente (DOMINGOS et al., 2003) e também porque o F se acumula preferencialmente ou somente nos tecidos foliares (PITA-BARBOSA et al., 2009).

Embora o mecanismo sob o qual o F causa injúrias em plantas ainda não esteja completamente entendido (REDDY; KAUR, 2008), sua toxicidade pode advir de sua capacidade de reação com cátions como o Ca^{2+} (desencadeando uma cascata de efeitos) e o Mg^{2+} , afetando atividades enzimáticas, fisiológicas e outros processos metabólicos nas plantas (WEINSTEIN; DAVISON, 2004).

2.2.1 Efeitos em níveis macroscópicos

As injúrias morfológicas causadas em espécies vegetais pelo F vão desde níveis macroscópicos até ultraestruturais. Os sintomas visuais dos danos pelo flúor na vegetação geralmente correspondem a necroses marginais e nos

ápices das folhas, separadas dos tecidos saudáveis e não afetados por uma linha fortemente marcada, de cor vermelho-amarronzada. Inicialmente, é detectada clorose, seguida por desidratação do tecido, que muda de cor e se torna necrótico e, eventualmente, pode ocorrer perda da parte necrosada, levando a deformações na forma original da folha (FORNASIERO, 2001).

Outros sintomas visíveis incluem murchamento (FORNASIERO, 2001) e enrugamento de folhas (CHAVES et al., 2002; SILVA et al., 2000), cloroses de forma e tamanho irregular (CHAVES et al., 2002; OLIVA; FIGUEIREDO, 2005; PITA-BARBOSA et al., 2009) e descolorações ou alterações de cor nas folhas ou em regiões das folhas (FORNASIERO, 2001; PITA-BARBOSA et al., 2009), as quais podem ocorrer devido a uma possível ligação do F aos íons de Mg (Mg^{2+}), levando à redução na biossíntese de clorofila (FORNASIERO, 2001).

O flúor também pode alterar a senescência foliar, acelerando a abscisão de folhas basais de algumas espécies (SILVA et al., 2000). Em tempos de exposição suficientemente longos, a concentração mínima de flúor capaz de causar injúrias visíveis em plantas é de $0,3 \mu\text{g m}^{-3}$ de ar (CAPE; FOWLER; DAVISON, 2003).

É registrada maior ocorrência de danos visíveis nos ápices e margens foliares, devido ao fato do flúor se acumular preferencialmente nestes locais, pelo crescimento vigoroso durante a formação da folha e pelas altas taxas de movimento de água que ocorrem nestas regiões (LEECE; SCHECTEMA; WEIR, 1982). Entretanto, também podem ser verificadas injúrias na base das folhas, especialmente naquelas espécies com folhas que acumulam mais água da chuva e partículas na base da lâmina foliar (CHAVES et al., 2002). Há também registros de danos nas regiões compreendidas entre nervuras foliares (FORTES,

2003) e em outras espécies, ainda, as injúrias podem se distribuir por toda a lâmina foliar (CHAVES et al., 2002).

A fitotoxicidade do flúor depende da espécie avaliada, da concentração do poluente e do estágio de desenvolvimento foliar. Há espécies que apresentam injúrias apenas nas folhas completamente expandidas, não sendo detectados danos nas folhas jovens (FORNASIERO, 2001; PITA-BARBOSA et al., 2009; SILVA et al., 2000). Em outras, as folhas jovens e em expansão são as mais sensíveis ao flúor, quando comparadas às folhas completamente expandidas (CHAVES et al., 2002; SILVA et al., 2000; WEINSTEIN; DAVISON, 2003).

Há também espécies que não demonstram sintomas visuais expressivos (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007), ou que não apresentam qualquer sintoma visual em resposta à presença do flúor (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010; RIBEIRO, 2008).

Além de sintomas visuais, outros danos macroscópicos podem envolver a redução nas taxas de crescimento (KLUMPP et al., 1996; PANDEY, 2005). O F pode estimular o alongamento da parte aérea em algumas espécies. Porém, se o alongamento do caule não for acompanhado por um aumento na biomassa, este efeito não é tão benéfico quanto se poderia supor (WEINSTEIN, 1977). O F também pode interferir na absorção, transporte e redistribuição de nutrientes nas plantas, podendo afetar indiretamente a produtividade (OTTO et al., 2007).

A maioria dos trabalhos se concentra na detecção de danos visuais e na concentração de F nas plantas, e poucos se direcionam para a avaliação dos danos morfológicos, celulares e bioquímicos (FORNASIERO, 2001), essenciais para o diagnóstico da poluição por F, uma vez que geralmente antecedem os sintomas visuais ou ocorrem na ausência destes (FORNASIERO, 2003; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2000).

2.2.2 Efeitos em níveis microscópicos

Em nível microscópio, o F pode causar danos como ruptura da cutícula (PITA-BARBOSA et al., 2009), erosão de ceras epicuticulares (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007), perda de turgidez de células (PITA-BARBOSA et al., 2009), distorções da forma das células (FORNASIERO, 2001; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007), colapso celular (FORNASIERO, 2001; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007) danos na estrutura dos estômatos (SANT'ANNA-SANTOS; AZEVEDO, 2007) e alterações no tamanho dos tecidos foliares (PITA-BARBOSA et al., 2009). É interessante observar que a estrutura da parede celular pode influenciar o grau de injúria das células. Células vivas do tecido vascular, por exemplo, podem apresentar menores injúrias do que as células de outros tecidos, devido à maior espessura de suas paredes (SOLBERG; ADAMS, 1956).

Na fisiologia vegetal, há registros da ação do F sobre diversas características. Sobre as taxas respiratórias, pode ocorrer tanto inibição (principalmente devido à inibição de enzimas como a succinato desidrogenase e a malato desidrogenase) quanto estímulo, que pode estar ligado ao aumento no uso da rota das pentoses fosfato ou ao aumento da atividade de outras enzimas, como glicose-6-fosfato desidrogenase, citocromo oxidase, catalase e peroxidases (MILLER, 1993). Acredita-se que o F possa afetar os estágios iniciais da síntese de pigmentos ou causar sua destruição (MCNULTY; NEWMAN, 1961), resultando em redução no conteúdo de clorofilas *a* e *b* (KUMAR; RAO, 2008) e de carotenóides (FORNASIERO, 2001; MCNULTY; NEWMAN, 1961; REDDY; KAUR, 2008).

Além disso, outros efeitos adversos incluem alterações na fluorescência da clorofila *a* (BOESE; MACLEAN; EL-MOGAZI, 1995; SINGH-RAWAL;

JAJOO; BHARTI, 2010) e diminuição da área foliar e das taxas fotossintéticas (RATHORE, 1992). Os efeitos sobre a fotossíntese podem estar relacionados aos danos provocados pelo F nos pigmentos fotossintéticos e nos cloroplastos, os quais incluem diminuição do número e aumento do tamanho destas organelas (WEI; MILLER, 1972), além de alteração em sua forma e dispersão (CHAVES et al., 2002).

A integridade de membranas é outro fator que pode ser afetado pela exposição ao F. Em plantas expostas ao poluente, pode ocorrer aumento na permeabilidade de membranas, o qual pode ser detectado através de maior extravasamento de eletrólitos (DIVAN-JUNIOR et al., 2007).

Este poluente também pode causar efeitos sobre o metabolismo celular, porque interage com muitos compostos presentes na célula. Por exemplo, ele pode inibir a conversão de glicose em amido (ASTHIR; SING, 1995). Além disso, os carboidratos podem também deixar de serem utilizados para os processos de crescimento normais, ocorrendo desvio dos açúcares para a síntese de compostos fenólicos, tais como as antocianinas (FORNASIERO, 2003). A produção de metabólitos secundários como estes indica que a planta está submetida a estresse, uma vez que o acúmulo de compostos fenólicos pode constituir um mecanismo de defesa dos organismos vegetais, quando submetidos a determinado agente estressor (VAUGHN; DUKE, 1984).

O F pode reduzir a absorção de água e a condutividade hidráulica (KAMALUDDIN; ZWIAZEK, 2003). Sendo assim, as plantas submetidas a esta substância podem sofrer estresse hídrico, o qual pode levar ao estresse oxidativo, com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). O aumento no nível de antocianinas em *Hypericum perforatum*, por exemplo, pode ser um indicativo da formação destes derivados tóxicos e reativos do oxigênio, uma vez que as

antocianinas podem tentar sequestrar as EROS e atuar como compostos protetores (FORNASIERO, 2001).

Os efeitos do F podem também incluir aceleração de danos genéticos (CHOI et al., 2006) e danos citogenéticos. O F pode se ligar ao cálcio e destruir pontes iônicas, resultando em dispersão de cromossomos (MILLER, 1993). Além disso, este elemento tem demonstrado efeito mutagênico, principalmente na forma de HF, podendo causar aberrações cromossômicas como formação de pontes e fragmentação de cromossomos (GRITSAN, 1993), além do aparecimento de núcleos tetraplóides e anáfases multipolares (MOHAMED; SMITH; APPLGATE, 1966) e da formação de células binucleadas e micronúcleos (BALE; HART, 1973).

2.2.3 Efeitos em nível de comunidades e ecossistemas

Além dos efeitos citados em nível de indivíduo, as alterações podem se estender a processos da comunidade e do ecossistema como um todo. A competição natural entre as espécies de um determinado ecossistema pode ser afetada (SILVA et al., 2000) porque, ao levar à supressão do crescimento de uma determinada espécie (CHOI et al., 2006), o crescimento de outra (como uma espécie oportunista) pode ser estimulado (SILVA et al., 2000). Além disso, sabe-se que a poluição atmosférica pode apresentar impactos sobre os processos sucessionais (LEITÃO FILHO, 1993). Há também a possibilidade do F causar distúrbios na decomposição de serrapilheira (KLUMPP et al., 1996).

Os efeitos diretos e indiretos do F sobre a vegetação, aliados aos danos causados pelos outros poluentes liberados pelas indústrias podem, em última instância, afetar a estrutura e o funcionamento do ecossistema como um todo (KLUMPP; DOMINGOS; KLUMPP, 2002).

2.3 Uso de espécies vegetais no monitoramento da poluição por flúor

O monitoramento das emissões de flúor emprega métodos físico-químicos de alto custo e difícil aplicação, ou biológicos que muitas vezes envolvem apenas a observação de injúrias em plantas ou animais (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005). Sendo assim, mostra-se importante e vantajoso o uso de espécies vegetais em estudos de monitoramento da poluição ambiental, através da análise não só dos danos macroscópicos, mas também de alterações em características bioquímicas, fisiológicas e celulares (PITA-BARBOSA et al., 2009; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007). Tais alterações têm importante valor prognóstico da injúria das plantas pelo F, além de constituírem uma ferramenta valiosa para pesquisas básicas sobre o mecanismo de ação do poluente (WEINSTEIN; DAVISON, 2003).

Determinadas espécies não apresentam sintomas visuais em resposta à presença do poluente (biossensores), enquanto outras (bioindicadores) reagem visualmente à poluição (TEMMERMAN et al., 2004). Além disso, determinadas espécies podem acumular F, sendo denominadas biomonitoras ou bioacumuladoras, as quais apresentam uma grande importância ecológica (PITA-BARBOSA et al., 2009).

A utilização de espécies vegetais para monitoramento da qualidade do ar é justificável, pois mesmo organismos com ausência ou menor ocorrência de danos visuais podem apresentar alterações em características microscópicas (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010). Sendo assim, em organismos biossensores, é importante a detecção de alterações utilizando técnicas anatômicas, ultraestruturais, fisiológicas, ou análises bioquímicas (WEINSTEIN; DAVISON, 2003). O uso de tais técnicas e análises se mostra fundamental, pois a avaliação da presença de poluentes utilizando apenas dados

baseados na análise visual de injúrias pode subestimar o potencial de uma espécie para o biomonitoramento (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007).

Nos estudos de monitoramento de poluição usando organismos vegetais, é importante sempre levar em consideração que a tolerância ou sensibilidade das espécies pode variar de acordo com fatores climáticos, edáficos e diferenças genéticas, fazendo com que espécies que se mostrem sensíveis ao F em uma região possam ser menos sensíveis em outra (WEINSTEIN; DAVISON, 2003). Também existe variação no grau de tolerância das diferentes espécies de plantas. Algumas espécies são capazes de acumular F em concentrações de até 4000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca, sem apresentar qualquer sinal de injúria, enquanto outras se mostram extremamente sensíveis a concentrações menores do que 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca (CRONIN et al., 2000). Esta variação na tolerância das plantas à presença do flúor pode ser explicada por características próprias da espécie e pela presença ou não de mecanismos de desintoxicação (ARNDT; FLORES; WEINSTEIN, 1995).

Alguns estudos já têm sido feitos no sentido de analisar e comparar a resposta de diferentes espécies ao flúor (tanto herbáceas quanto arbóreas), com o objetivo de identificar aquelas que apresentam maior suscetibilidade a este poluente, e sugeri-las como possíveis bioindicadoras da poluição atmosférica (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005; SILVA et al., 2000). O melhor bioindicador da presença de F corresponde à espécie mais sensível, na qual são detectados sintomas visuais nas folhas (WEINSTEIN; DAVISON, 2003). Na Europa, cultivares de espécies do gênero *Gladiolus* são geralmente utilizadas como indicadores sensíveis e acumuladores em estudos de monitoramento de F (KLUMPP et al., 1997).

Porém, procura-se também identificar espécies mais tolerantes, as quais podem ser utilizadas no reflorestamento de áreas cuja vegetação foi afetada pela

ação deste poluente (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005; SILVA et al., 2000). A espécie *Lolium multiflorum* é uma das mais utilizadas como indicadora de acúmulo de F em áreas poluídas de diversos países, sendo considerada resistente (KLUMPP et al., 1997).

Os bioindicadores também podem ser classificados como ativos e passivos, caso ocorram naturalmente na área estudada ou caso seja necessária sua introdução. A bioindicação ativa é realizada por plantas de espécies com sensibilidade conhecida, as quais, introduzidas numa área impactada, apresentam inequívocas respostas a determinado poluente ou a um conjunto deles (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005). Já a bioindicação passiva envolve organismos que ocorrem naturalmente na área impactada, o que geralmente se mostra mais interessante, uma vez que espécies exóticas podem ter suas propriedades alteradas pelas condições ambientais, sendo, assim, mascarados os sintomas específicos do organismo ao poluente (ELLENBERG, 1991). Por exemplo, ao avaliar as respostas de *Lolium multiflorum* ssp. *italicum*, Oliva e Figueiredo (2005) observaram baixas taxas de crescimento e pouca capacidade de rebrota da espécie sob as condições tropicais, o que pode indicar que a espécie não se encontra adaptada a tais condições e a necessidade de serem utilizadas espécies nativas ou adaptadas à região estudada.

Um cuidado que deve ser tomado no estudo dos efeitos do F sobre a vegetação (e no uso de plantas para monitorar a presença deste composto na atmosfera) é que há muitos fatores climáticos, edáficos e biológicos que mimetizam os sintomas induzidos por este poluente, como seca, frio, calor, deficiências e excessos de nutrientes, excessos de outras substâncias (como cobalto, níquel, cádmio, alumínio, entre outras), compostos orgânicos tóxicos (como pesticidas e herbicidas), danos causados por insetos (minadores e brocas) e patógenos (vírus, bactérias, micoplasmas, fungos). Para, então, determinar o

que é e o que não é efeito do F em estudos de campo, é preciso ter algum conhecimento das concentrações atmosféricas da substância, os sintomas devem acompanhar o padrão de dispersão do poluente e as injúrias devem ser condizentes com as sensibilidades conhecidas das espécies (WEINSTEIN; DAVISON, 2003).

2.4 Interação do flúor com outros poluentes

Não se pode deixar de considerar que o F não é o único agente estressante ocorrente em determinada região impactada por atividades industriais. Sendo assim, a variação na tolerância das plantas ao F está ligada também à presença ou não de outros poluentes, os quais podem interagir com o flúor e intensificar os danos causados por este elemento nas plantas. As fábricas de fertilizantes, por exemplo, são responsáveis por liberar tanto F quanto SO_2 na atmosfera (MCCUNE, 1971). Embora o estudo de Pandey (2005) em áreas a diferentes distâncias de uma indústria de fertilizantes na Índia tenha detectado o F como o poluente principal e presente em maiores concentrações, o autor não descarta que a coocorrência do SO_2 possa ter sido responsável pelo agravamento dos danos observados nas espécies estudadas, como alterações na altura, diâmetro basal, área de copa, área e biomassa foliar, biomassa total e concentrações de clorofila, ácido ascórbico e nitrogênio.

Segundo Klumpp et al. (1996), a disponibilidade e a consequente absorção de F do solo aumenta com o aumento da acidez e da mobilização de alumínio no ambiente edáfico. Ao contribuir para a formação de chuva ácida, a liberação de SO_2 na atmosfera (SINGH; AGRAWAL, 2008) pode tornar o F mais solúvel no solo, aumentando a disponibilidade e consequentemente a fitotoxicidade deste elemento (WAINWRIGHT; SULPHARUNGSUN;

KILHAM, 1982). Segundo Horner e Bell (1995), isto pode ocorrer porque, em valores baixos de pH, o F se encontra na sua forma não iônica, e isso facilita sua absorção por membranas celulares. A liberação de alumínio por indústrias siderúrgicas também contribui para maior disponibilização de F no ambiente edáfico. As plantas absorvem o F mais facilmente quando este forma o complexo AlF_x do que na forma de íons livres em solução (TAKMAZ-NISANCIOGLU; DAVISON, 1988). No Brasil, a já registrada presença de alumínio nos solos do cerrado, algumas vezes em excesso (HARIDASAN, 1982) pode, então, ser um fator preocupante da poluição por F neste ambiente.

Entretanto, mais estudos devem ser feitos para se ter uma visão mais realista de quais podem ser os verdadeiros efeitos dessa combinação Al-F sobre as plantas, uma vez que, segundo Domingos et al. (2003), a absorção do F na forma de complexos de Al-F nos solos contaminados ou a formação destes complexos dentro das plantas podem levar à desintoxicação dos organismos, uma vez que ocorrem menos danos (como necrose e morte de células). Klumpp et al. (1996) também propuseram que um mecanismo de desintoxicação mútua entre Al e F pode explicar os maiores índices de sobrevivência e a dominância de espécies da família Melastomataceae em áreas altamente poluídas por F próximas a Cubatão. Segundo este mecanismo, o complexo AlF_x não atravessa as membranas celulares, acumulando-se no apoplasto e levando à diminuição da toxicidade de ambos os elementos (TAKMAZ-NISANCIOGLU; DAVISON, 1988).

Sendo assim, podem ocorrer interações sinérgicas do flúor com outros poluentes presentes no ambiente, o que justifica a necessidade de também se conhecer os demais poluentes presentes em uma dada região.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estudo dos efeitos do flúor sobre as espécies vegetais se mostra de extrema importância, devido aos danos e alterações que pode causar, tanto isoladamente quando em conjunção com outras substâncias poluidoras, e uma vez que seus efeitos podem se manifestar ao longo de muito tempo e se estender a outros organismos da rede trófica.

Além disso, o maior conhecimento do efeito deste poluente sobre uma determinada espécie vegetal auxilia no entendimento de seu mecanismo de ação e pode possibilitar a utilização deste organismo em programas de monitoramento da poluição ambiental, uma aplicação prática e extremamente vantajosa.

REFERÊNCIAS

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

ARNESEN, A. K. M. Availability of fluoride to plants grown in contaminated soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 191, n. 1, p. 13-25, 1997.

ARNESEN, A. K. M.; KROGSTAD, T. Sorption and desorption of fluoride in soil polluted from the aluminum smelter at Ardal in Western Norway. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 103, n. 1/4, p. 357-373, Jan. 1998.

ASTHIR, B.; SINGH, R. Fluoride-induced changes in the activities of sucrose metabolizing enzymes in relation to starch accumulation in sorghum caryopsis, raised through liquid culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 33, n. 2, p. 219-223, 1995.

BALE, S. S.; HART, G. E. Studies on the cytogenetic and genetic effects of fluoride on barley: I., a comparative study of the effects of sodium fluoride and hydrofluoric acid on seedling root tips. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ontario, v. 16, p. 695-702, 1973.

BOESE, S. R.; MACLEAN, D. C.; EL-MOGAZI, D. Effects of fluoride on chlorophyll a fluorescence in spinach. **Environmental Pollution**, Barking, v. 89, n. 2, p. 203-208, Apr. 1995.

BRAEN, S. N.; WEINSTEIN, L. H. Uptake of fluoride and aluminum by plants grown in contaminated soils. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 215-223, 1985.

CAMPOS, N. V.; AZEVEDO, A. A.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F. Acúmulo e efeitos fitotóxicos do flúor em folhas de boldo-gambá e capim-cidreira utilizadas para chás. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 7, p. 646-653, jul. 2010.

CAPE, J. N.; FOWLER, D.; DAVISON, A. Ecological effects of sulfur dioxide, fluorides, and minor air pollutants: recent trends and research needs. **Environment International**, Elmsford, v. 29, n. 2, p. 201-211, Feb. 2003.

CHAVES, A. L. F. et al. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-rhodes) - Poaceae. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 395-406, out./dez. 2002.

CHOI, D. S. et al. Growth and photosynthetic responses of two pine species (*Pinus koraiensis* and *Pinus rigida*) in a polluted industrial region in Korea. **Environmental Pollution**, Barking, v. 139, n. 3, p. 421-432, Mar. 2006.

CRONIN, S. J. et al. Fluoride: a review of its fate, bioavailability, and risks of fluorosis in grazed-pasture systems in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 43, n. 3, p. 295-321, 2000.

DIVAN-JUNIOR, A. M. et al. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colonião. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 67, n. 2, p. 247-253, 2007.

DOMINGOS, M. et al. Combined effects of air and soil pollution by fluoride emissions on *Tibouchina pulchra* Cogn., at Cubatão, SE Brazil, and their relations with aluminum. **Plant and Soil**, The Hague, v. 249, n. 2, p. 297-308, Feb. 2003.

ELLENBERG, H. Bioindicator and biological monitoring. In: _____. **Biological monitoring: signal from the environment**. Braunschweig: Gate/GTZ, 1991. p. 13-74.

FALLA, J. et al. Biological air quality monitoring: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 64, n. 3, p. 627-644, Oct. 2000.
FORNASIERO, R. B. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 3, p. 507-513, Sept. 2003.

FORNASIERO, R. B. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 5, p. 979-985, Oct. 2001.

FORTES, C. et al. Toxicidade de flúor em cultivares de milho em área próxima a uma indústria cerâmica, Araras, SP: nota científica. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 275-281, 2003.

GRITSAN, N. P. Cytogenetic effects of gaseous fluorides on grain crops. **Fluoride**, Detroit, v. 26, n. 1, p. 23-32, 1993.

HARIDASAN, M. Aluminum accumulation by some cerrado native species of central Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 65, n. 3, p. 265-273, June 1982.

HORNER, J. M.; BELL, J. N. B. Effects of fluoride and acidity on early plant growth. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 205-211, Apr. 1995.

KAMALUDDIN, M.; ZWIAZEK, J. J. Fluoride inhibits root water transport and affects leaf expansion and gas exchange in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, n. 3, p. 368-375, Mar. 2003.

KLUMPP, A.; DOMINGOS, M.; KLUMPP, G. Foliar nutrient contents in tree species of the Atlantic rain Forest as influenced by air pollution from the industrial complex of Cubatão, SE-Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 133, n. 1/4, p. 315-333, Jan. 2002.

KLUMPP, A. et al. Fluoride impact on native tree species of the Atlantic Forest near Cubatão, Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 87, n. 1, p. 57-71, Feb. 1996.

_____. Susceptibility of various *Gladiolus* cultivars to fluoride pollution and their suitability for bioindication. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 239-247, mar. 1997.

KOZYRENKO, M. M. et al. Effect of fluoride pollution on genetic variability of *Larix gmelinii* (Pinaceae) in East Siberia. **Journal of Forest Research**, Sapporo, v. 12, n. 5, p. 388-392, Oct. 2007.

KUMAR, K. A.; RAO, V. B. Physiological responses to fluoride in two cultivars of mulberry. **World Journal of Agricultural Sciences**, Deira, v. 4, n. 4, p. 463-466, Aug. 2008.

LEECE, D. R.; SCHECTEMA, J. H.; WEIR, R. G. The use of leaf analysis to diagnose fluoride toxicity in grapes. In: MURRAY, F. (Ed.). **Fluoride emissions**. New York: Academic, 1982. p. 101-124.

LEITÃO FILHO, H. F. **Ecologia da Mata Atlântica**. Campinas: UNESP; UNICAMP, 1993. 184 p.

MCCUNE, D. C. Problems involved in devising air quality criteria for the effects of fluoride on vegetation. **American Industrial Hygiene Association Journal**, Baltimore, v. 32, p. 697-701, 1971.

MCNULTY, I. B.; NEWMAN, D. W. Mechanism(s) of fluoride induced chlorosis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 36, n. 4, p. 385-388, 1961.

MILLER, G. W. The effect of fluoride on higher plants: with special emphasis on early physiological and biochemical disorders. **Fluoride**, Detroit, v. 26, n. 1, p. 3-22, 1993.

MOHAMED, A. H.; SMITH, J. D.; APPLGATE, H. G. Cytological effects of hydrogen fluoride on tomato chromosomes. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ontario, v. 8, p. 575-583, 1966.

OLIVA, M. A.; FIGUEIREDO, J. G. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 389-397, abr./jun. 2005.

OTTO, R. et al. Rendimento da cana-de-açúcar é afetado por flúor. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 505-509, 2007.

PANDEY, J. Evaluation of air pollution phytotoxicity downwind of a phosphate fertilizer factory in India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 100, n. 2, p. 249-266, June 2005.

PITA-BARBOSA, A. et al. Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 4, p. 1027-1033, dez. 2009.

RATHORE, S. Effect of fluoride toxicity on leaf area, net assimilation rate and relative growth rate of *Hordeum vulgare* and *Zea mays*. **Fluoride**, Detroit, v. 25, n. 2, p. 175-183, 1992.

REDDY, M. P.; KAUR, M. Sodium fluoride induced growth and metabolic changes in *Salicornia brachiata* Roxb. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 188, n. 2, p. 171-179, Mar. 2008.

RIBEIRO, S. F. C. **Efeitos da aplicação de flúor sobre os processos fotossintéticos em três espécies lenhosas e nativas da região de Ouro Preto, MG**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

ROZHKOV, A. S.; MIKHAILOVA, T. A. **The effect of fluorine-containing emissions on conifers**. Heidelberg: Springer, 1993. 142 p.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxicidade do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 48-50, 2007. Suplemento.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. et al. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 4, p. 761-771, jul./ago. 2007.

SILVA, L. C. et al. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 385-393, dez. 2000.

SINGH, A.; AGRAWAL, M. Acid rain and its ecological consequences. **Journal of Environmental Biology**, Vikas Nagar, v. 29, n. 1, p. 15-24, 2008.

SINGH-RAWAL, P.; JAJOO, A.; BHARTI, S. Fluoride affects distribution of absorbed excitation energy more in favour of photosystem 1. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 3, p. 556-560, June 2010.

SOLBERG, R. A.; ADAMS, D. F. Histological responses of some plant leaves to hydrogen fluoride and sulfur dioxide. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 43, p. 755-760, 1956.

TAKMAZ-NISANCIOGLU, S.; DAVISON, A. W. Effects of aluminum on fluoride uptake by plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 109, n. 2, p. 149-155, Feb. 1988.

TEMMERMAN, L. et al. Biomonitoring of air pollutants with plants: considerations for the future. In: KLUMPP, A.; ANSEL, W.; KLUMPP, G. (Ed.). **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness**. Göttingen: Cuvillier Verlag, 2004. p. 337-374.

TRESHOW, M.; ANDERSON, F. K. **Plant stress from air pollution**. Chichester: J. Wiley, 1989. 283 p.

VAUGHN, K.; DUKE, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 60, n. 1, p. 106-112, Jan. 1984.

WAINWRIGHT, M.; SULPHARUNGSUN, S.; KILHAM, K. Effect of acid rain on the solubility of heavy metal oxides and fluorspar (CaF₂) added to soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 85-90, Apr. 1982.

WEI, L.; MILLER, G. W. Effect of HF on the fine structure of mesophyll cells from *Glycine max*, Merr. **Fluoride**, Detroit, v. 5, n. 2, p. 67-72, 1972.

WEINSTEIN, L. H. Fluoride and plant life. **Journal of Occupational Medicine**, Chicago, v. 19, p. 49-78, 1977.

WEINSTEIN, L. H.; DAVISON, A. W. **Fluorides in the environment**. Cambridge: CABI, 2004. 287 p.

_____. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution**, Barking, v. 125, n. 1, p. 3-11, Jan. 2003.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* E ULTRAESTRUTURA DE *Vitex polygama* CHAM. (VERBENACEAE) SUBMETIDA À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR

RESUMO

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o acúmulo do flúor e seus efeitos sobre características macroscópicas, a fluorescência da clorofila *a* e a ultra-estrutura de *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae). Para isto, plantas desta espécie foram submetidas a chuvas simuladas contendo 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de F, por 15 minutos, durante 10 dias. No tratamento controle, foi utilizada água deionizada. Antes do início e ao final do experimento, foi avaliada a fluorescência da clorofila *a* no claro através de fluorômetro portátil, e, ao final das simulações, foram coletadas folhas para quantificação do teor de F na massa seca e para microscopia eletrônica de transmissão. As plantas não apresentaram sintomas de injúria foliar visíveis, e o acúmulo do poluente só foi detectado nas plantas dos tratamentos que receberam maiores concentrações de flúor (15 e 20 mg L⁻¹), características que sugerem considerável resistência da espécie ao poluente. Foi observado aumento do quenching não-fotoquímico (qN) e do coeficiente devido à extinção não-fotoquímica (NPQ) nas doses crescentes de flúor, o que indica aumento da dissipação da energia radiante na forma de calor. Foram detectadas alterações ultraestruturais, como danos na estrutura dos cloroplastos, nas membranas celulares e granulação do citoplasma. Os resultados obtidos demonstram a ocorrência de danos microscópicos anteriores e na ausência de alterações visíveis, podendo ter importante valor no prognóstico de danos causados pelo poluente nesta espécie.

Palavras-chave: Ecofisiologia. Biomonitoramento. Estrutura celular.

ABSTRACT

In this study, we aimed to evaluate fluoride accumulation and its effects on macroscopic characteristics, chlorophyll *a* fluorescence and ultrastructure of *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae). With this purpose, plants of this species were submitted to simulated rains containing 5, 10, 15 and 20 mg L⁻¹ of F, for 15 minutes during 10 days. In the control treatment, deionized water was used. At the beginning and at the end of the experiment, chlorophyll *a* fluorescence was measured using a portable fluorometer, and at the end of the simulations, leaves were collected to quantify the F content in the dry mass and for transmission electron microscopy. The plants presented no visible symptoms of foliar injury, and the pollutant accumulation was detected only in treatments with higher fluoride concentrations (15 and 20 mg L⁻¹), which suggest considerable resistance of the species to the pollutant. An increase in non- photochemical quenching (qN) and in the coefficient due to non-photochemical extinction (NPQ) was observed in the increasing fluoride doses, which indicates higher dissipation of radiant energy as heat. Ultrastructural changes were detected, such as damages in the chloroplast structure, in cellular membranes and cytoplasm granulation. The results demonstrate the occurrence of microscopic damage before and in the absence of visible alterations, presenting important value in the prognostic of damages caused by the pollutant in this species.

Keywords: Ecophysiology. Biomonitoring studies. Celular structure.

1 INTRODUÇÃO

O flúor é considerado um dos poluentes de maior fitotoxicidade (WEINSTEIN, 1977), podendo ser liberado por atividades antrópicas ligadas a fundições de alumínio, produção de adubos minerais (como fertilizantes fosfatados), fabricação de vidros e cerâmicas, entre outras (WEINSTEIN; DAVISON, 2003).

O F absorvido se acumula preferencialmente em margens foliares, (MILLER, 1993), e pode causar cloroses e necroses foliares (MESQUITA et al., 2011). Parte do fluoreto dissolvido penetra nas células, onde se acumula em organelas celulares (como mitocôndrias, cloroplastos e vacúolos), podendo induzir alterações ultraestruturais (FORNASIERO, 2001), anatômicas (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007), bioquímicas (REDDY; KAUR, 2008), e fisiológicas às plantas (KUMAR; RAO, 2008).

A análise da fluorescência da clorofila *a* do fotossistema II (FSII) é um método simples, rápido e não destrutivo (SCHREIBER, 1978) que constitui um excelente indicador do estado deste fotossistema e de sua operação (LÜTTGE, 2008), uma vez que o estado funcional das membranas do tilacoide pode ser alterado por um determinado agente estressor (BAKER; ROSENQVST, 2004). Sabe-se que o flúor pode acelerar o fluxo de elétrons do FSII sem, entretanto, formar um gradiente simultâneo de prótons (BOESE; MACLEAN; ELMOGAZI, 1995), além de resultar em distribuição de maior quantidade da energia absorvida em direção ao FSI, à custa do FSII (SINGH-RAWAL; JAJOO; BHARTI, 2010). O flúor também pode alterar significativamente a estrutura dos cloroplastos (MILLER, 1993), o que também pode afetar as características da fluorescência da clorofila *a*.

O uso de organismos vegetais no monitoramento da poluição atmosférica tem se mostrado muito vantajoso, especialmente se a espécie pertencer à flora local (ELLENBERG, 1991), devido ao menor custo e à possibilidade de avaliação dos efeitos cumulativos do poluente e de detecção de concentrações muito baixas da substância, entre outras vantagens (FALLA et al., 2000). Os organismos submetidos ao agente estressor podem demonstrar sintomas visuais (bioindicadores) ou danos em níveis microscópicos, fisiológicos e bioquímicos, na ausência de alterações visíveis (biosensores) (TEMMERMAN et al., 2004).

A espécie *Vitex polygama* Cham., popularmente conhecida como “tarumã”, “Maria-preta” e “velame-do-campo”, pertence à família Verbenaceae (CANTINO; HARLEY; WAGSTAFF, 1992) e apresenta hábito arbóreo ou arbustivo e ampla distribuição, sendo encontrada principalmente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (MOLDENKE; MOLDENKE, 1957). Esta espécie ocorre na região de Poços de Caldas, no sul de Minas Gerais (BERG et al., 2007), na qual está instalada uma fábrica de alumínio e quatro empresas de fabricação de cristais (CAPPELLIN, 2008), atividades que podem liberar F na atmosfera (FORNASIERO, 2001).

Com este estudo, objetivou-se avaliar o acúmulo de flúor e alterações causadas por este poluente em características macroscópicas, ultraestruturais e da fluorescência da clorofila *a* em *Vitex polygama*, as quais podem ser um importante subsídio para a sugestão de seu uso no biomonitoramento da poluição atmosférica por flúor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Mudas da espécie *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae) foram fornecidas em tubetes pelo viveiro da CEMIG-Lavras (Companhia Energética de Minas Gerais). As mudas com cerca de 25,0 cm foram transferidas para sacos plásticos de 3,0 L, os quais foram preenchidos com mistura de solo, areia e esterco, em uma proporção de 2:1:1, respectivamente. As plantas permaneceram 120 dias em casa de vegetação do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para aclimatização, e, durante este período, receberam solução nutritiva de Hoagland e Arnon a 0,5 de força iônica (HOAGLAND; ARNON, 1950) a cada 15 dias, sendo também irrigadas por água deionizada, de forma que fosse sempre mantida a capacidade de campo do substrato.

Sete dias antes do início do experimento, as plantas foram transferidas para o laboratório de Ecologia do Departamento de Biologia da UFLA, para aclimatização, onde permaneceram até o final das simulações de chuva, para que não houvesse grande interferência de estressores ambientais na resposta das plantas aos tratamentos. Ao longo do período experimental, as plantas foram submetidas a fotoperíodo de 12 horas, com radiação global em torno de $19,4 \pm 3,4 \text{ W m}^{-2}$, o que correspondeu a um valor médio de $88,2 \pm 15,4 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As temperaturas máxima, média e mínima durante o período foram de: $24,2 \pm 1,0$; $22,4 \pm 1,7$; $20,8 \pm 1,3 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Durante 10 dias consecutivos, as plantas foram submetidas a 15 minutos diários de chuva simulada, totalizando $9,15 \text{ mm dia}^{-1}$ de precipitação, a qual foi aplicada em uma câmara construída a partir do modelo proposto por Evans, Gmur e Costa (1977). Foram utilizados cinco tratamentos: controle (chuva apenas com água deionizada) e quatro tratamentos com diferentes concentrações

de flúor. Os tratamentos de chuva com F foram preparados mediante a mistura de flúor, na forma de fluoreto de potássio (KF), em água deionizada, nas seguintes concentrações: 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹. Os valores de pH do tratamento controle e dos tratamentos com flúor foram aferidos com pHmetro portátil Hanna HI 98127, e ajustados para 6,0 com solução de HCl 2N. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento.

Durante o período experimental foram feitas observações diárias nas folhas para detecção da presença de injúrias relacionadas à ação do flúor.

Foram também realizadas medições de características associadas à fluorescência da clorofila *a* no claro, antes do início das simulações (dia 1) e 24 horas após o término do experimento (dia 11). As medições foram feitas no folíolo central de folhas completamente expandidas localizadas no primeiro nó a partir do ápice caulinar, através da aplicação de oito pulsos sucessivos de luz actínica saturante (PAR) sobre as folhas, utilizando fluorômetro portátil modulado MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), equipado com pinça especial para suporte da folha modelo 2030-B (BILGER; SCHREIBER; BOCK, 1995). As características de fluorescência da clorofila *a* no claro mensuradas foram: quenching não-fotoquímico (qN), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ), quenching fotoquímico (qP), taxa de transporte de elétrons (ETR) e produtividade quântica do fotossistema II (yield).

Para análise ultraestrutural, foi utilizada Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). O preparo das amostras e as observações em MET foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da UFLA. 24 horas após a última simulação de chuva, fragmentos foliares de aproximadamente 0,5 cm² foram retirados do folíolo central de folhas do primeiro nó e fixados em solução Karnovsky (glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%), em tampão

cacodilato, pH 7,0, 0,05 M + CaCl₂ 0,001 M). Posteriormente, os fragmentos foram lavados (três vezes por 10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio (1%) com o mesmo tampão, por quatro horas. Em seguida, o material foi contrastado com acetato de uranila, desidratado em série crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100% por três vezes) e incluído em resina Spurr. Os blocos obtidos foram desbastados e cortados em ultramicrotomo para obtenção de cortes ultrafinos, os quais foram contrastados com citrato de chumbo e documentados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, com câmera digital acoplada (ALVES, 2004).

Para determinação do teor de flúor, foram coletadas amostras de folhas inteiras (jovem, em expansão e completamente expandida) de todas as plantas, 24 h após a última chuva. As amostras foram previamente secas em estufa de circulação forçada a 70 °C até se obter massa constante e depois trituradas em moinho tipo Wiley, a partículas com dimensões inferiores a 1,0 mm. Alíquotas de 0,5 g foram submetidas à extração com ácido perclórico 0,1 M (GARCIA-CIUDAD et al., 1985). Para determinação potenciométrica do teor de flúor, foi utilizado o ajustador de força iônica (ORION) proposto por Larsen e Widdowson (1971), com eletrodo específico. As análises de quantificação do flúor foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para a análise dos dados de teor de flúor na massa seca, foi utilizado o teste Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade, através do programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

Para a análise estatística dos dados de fluorescência da clorofila *a* no claro, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x8 (cinco concentrações de F e oito intensidades de radiação) com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando o efeito das concentrações de flúor foi significativo, foram construídas regressões de

acordo com o ajuste do modelo, por meio do software Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008). A normalidade dos dados foi averiguada através do teste de Shapiro-Wilk, e, por não apresentarem normalidade, os dados de fluorescência foram transformados utilizando a equação $(x+1)^{0.5}$ onde x representa a média real.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise visual e acúmulo de Flúor

A espécie *Vitex polygama* Cham. não apresentou nenhum sintoma de injúria foliar aparente com o término do experimento, em nenhum dos tratamentos com flúor (Figura 1).

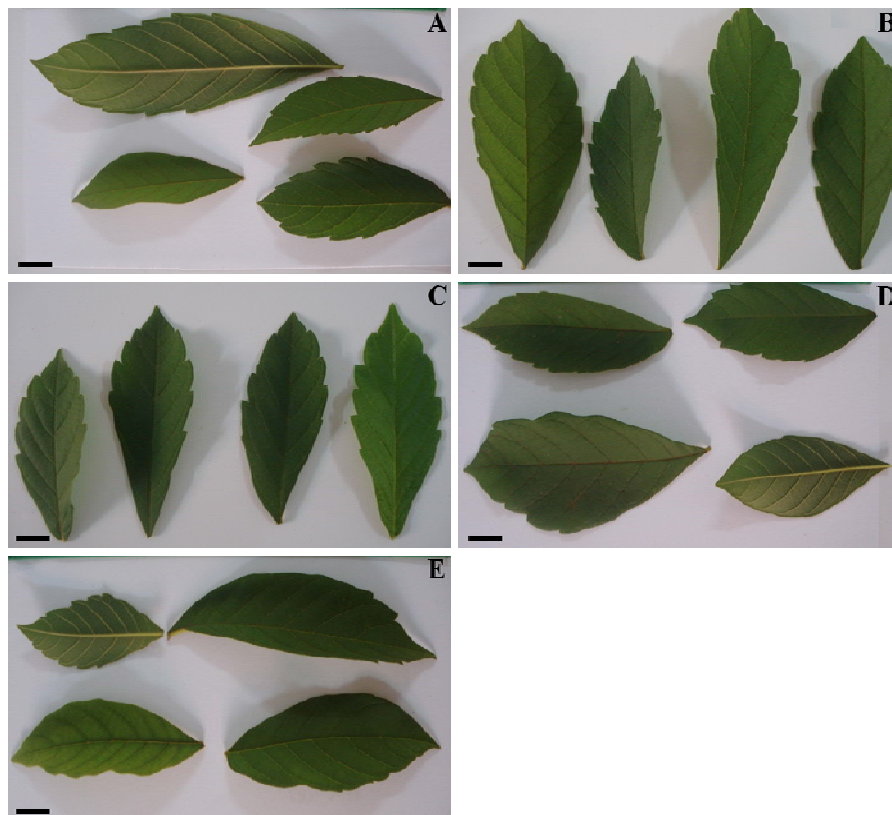


Figura 1 Folíolos de *Vitex polygama* expostos a diferentes concentrações de fluoreto de potássio na chuva simulada, durante 10 dias. A: tratamento controle (0 mg L^{-1}); B: 5 mg L^{-1} ; C: 10 mg L^{-1} ; D: 15 mg L^{-1} ; E: 20 mg L^{-1} . Barras = 2 cm.

Ribeiro (2008) submeteu quatro espécies a chuva contendo 15 mg L^{-1} de flúor durante 30 dias, e uma das espécies (*Eremanthus erythropappus*) não apresentou nenhum sintoma de injúria foliar após o término do período de simulações, embora tenham ocorrido alterações em características fisiológicas. Campos, Azevedo e Sant'Anna-Santos (2010) também não detectaram cloroses ou necroses em *Plectranthus neochilus* e em *Cymbopogon citratus* expostas a concentrações de 10 e 20 mg L^{-1} de flúor durante 20 e 10 dias, respectivamente,

porém foi possível a detecção de danos ultra-estruturais. Em espinafre, a aplicação de flúor gasoso alterou características da fluorescência da clorofila *a* sem, entretanto, levar ao aparecimento de sintomas visíveis (BOESE; MACLEAN; EL-MOGAZI, 1995). *Lolium multiflorum*, espécie frequentemente utilizada em estudos de monitoramento de flúor como resistente, não apresentou danos macroscópicos mesmo ao ser exposta a concentrações mais elevadas de HF (correspondentes a $0,16 \text{ mol L}^{-1}$) nos estudos de Mesquita et al. (2011).

A análise dos teores de flúor na massa seca (MS) de *Vitex polygama* mostram que apenas as concentrações mais altas de flúor (15 e 20 mg L^{-1}) foram responsáveis por acumulações significativamente maiores do poluente ($F=9,946$; $p < 0,005$), sendo $47,1$ e $81,3\%$ maiores do que no tratamento controle, respectivamente (Gráfico 1). Isto indica que concentrações mais elevadas de flúor são requeridas para provocar acúmulo do elemento em plantas de *Vitex polygama*. A exposição a concentrações mais elevadas de F favorece a maior retenção do poluente nas folhas (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010).

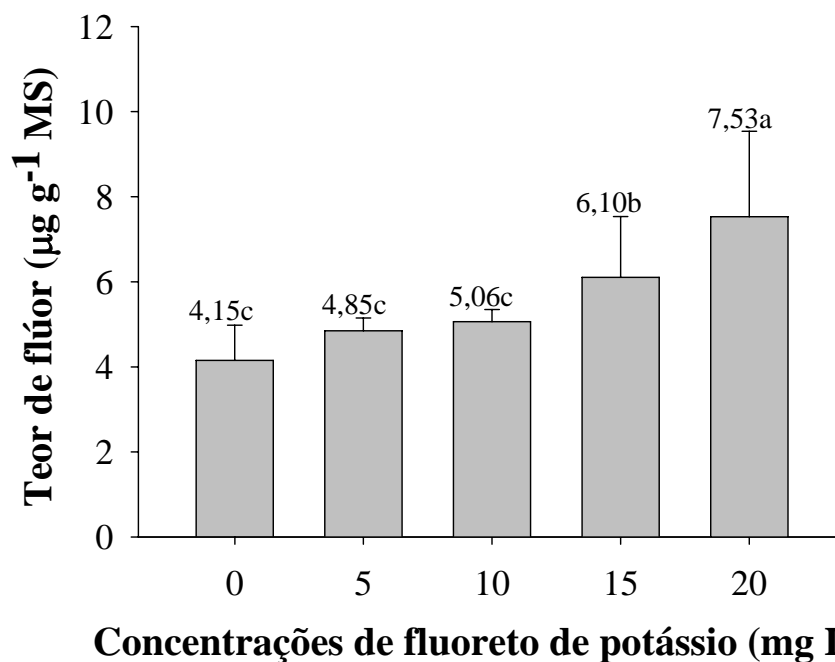


Gráfico 1 Teor de flúor ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) nas plantas de *Vitex polygama* expostas a diferentes concentrações de fluoreto de potássio (0, 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1}) em chuva simulada, durante dez dias consecutivos. As barras verticais indicam o desvio padrão da média ($n=8$). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si, segundo o teste Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade.

Os dados obtidos mostram que a espécie apresenta uma acumulação relativamente baixa de flúor, uma vez que, mesmo em ambientes não-poluídos, considera-se normal encontrar níveis de flúor até 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas folhas (FRANZARING et al., 2006; MILLER, 1993; WEINSTEIN, 1977), o que inclusive justifica a presença de flúor no tratamento controle (MESQUITA et al., 2011; SILVA et al., 2000). A concentração natural de F na massa seca foliar depende de fatores como características do solo e da água e espécie vegetal considerada. No feno, por exemplo, registra-se 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de MS como

quantidade natural de F, enquanto em folhas de batata esta quantidade pode ser de até $30 \mu\text{g g}^{-1}$ de MS (MILLER, 1993).

O teor máximo de flúor acumulado no presente experimento foi de cerca de $7,53 \mu\text{g g}^{-1}$ no tratamento de maior concentração de KF na chuva (20mg L^{-1}). Sabe-se que, no Brasil, os níveis de F nas folhas de plantas que ocorrem em áreas poluídas, próximas a fábricas de fertilizantes, podem ser até mesmo maiores do que $600 \mu\text{g g}^{-1}$ (MESQUITA et al., 2011). Entretanto, no campo, o flúor pode estar presente em maiores concentrações e na forma gasosa, sob a qual o poluente é mais facilmente absorvido (SANT'ANNA-SANTOS, 2008). Ainda assim, exposições de outras espécies às mesmas concentrações de fluoreto de potássio e durante o mesmo período de tempo em laboratório (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007) mostraram maiores taxas de acúmulo do poluente, se comparadas às apresentadas por *Vitex polygama*. Segundo Klumpp et al. (1996), as baixas taxas de acumulação aliadas a um longo período de exposição ao poluente são alguns dos aspectos a serem considerados na proposição de uma espécie como acumuladora de flúor.

Alguns estudos sugerem que plantas sensíveis podem ser injuriadas quando a concentração de F nas folhas é maior do que $30 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca (TRESHOW; ANDERSON, 1989). A relativamente baixa acumulação de flúor apresentada pela espécie *Vitex polygama* no presente experimento poderia talvez explicar a ausência de sintomas visuais. Segundo Silva et al. (2000), em determinadas espécies, há uma relação entre o grau de injúria e o conteúdo de flúor nas folhas, sendo que maiores graus de injúria estão associados a maiores taxas de acumulação do poluente. No entanto, Oliva e Figueiredo (2005) detectaram cloroses e necroses em espécies de gramíneas que apresentaram teores foliares de F entre $4,7$ e $27 \mu\text{g g}^{-1}$ folha, enquanto em *Lolium multiflorum*,

não foram verificados danos visíveis mesmo em concentrações tão elevadas quanto $180 \mu\text{g g}^{-1}$ folha (MESQUITA et al., 2011). Isto mostra que a ocorrência de injúrias visuais não está ligada a um limite de concentração de flúor, mas sim à resposta específica de cada organismo vegetal ao poluente.

A variação de susceptibilidade tanto entre espécies quanto entre cultivares pode estar associada a diferenças no acúmulo, translocação e distribuição do F (JACOBSON et al., 1966). Os resultados relativos à baixa acumulação de F e à ausência de injúrias visíveis em *Vitex polygama* indicam que esta espécie pode apresentar algum mecanismo que diminua a absorção e o acúmulo do poluente. As respostas das plantas ao flúor podem estar relacionadas a determinadas características que variam de uma espécie para outra, tais como ciclo de vida, anatomia e morfologia da folha e presença ou ausência de mecanismos específicos de desintoxicação, transporte e eliminação do poluente (ARNDT; FLORES; WEINSTEIN, 1995).

A espécie *Vitex polygama* apresenta grande quantidade de tricomas, o que pode contribuir para sua relativa resistência ao poluente. Chaves et al. (2002) sugeriram o maior número de tricomas como uma das características que poderiam estar ligadas à maior resistência da espécie *Chloris gayana* ao flúor, quando comparada com *Panicum maximum*. Segundo Garg e Varshney (1980), maior resistência à poluição geralmente ocorre em plantas com maior densidade de tricomas, sendo que plantas expostas a maior poluição atmosférica podem apresentar maior comprimento e densidade de tricomas foliares. Além disso, a também ocorrência de tricomas glandulares na epiderme de ambas as faces pode representar uma cobertura protetora, impedindo a retenção do flúor na superfície foliar por tempo prolongado (RIBEIRO, 2008).

3.2 Fluorescência da clorofila *a*

O efeito da interação entre os fatores avaliados neste experimento (concentração de flúor e intensidade de pulso de luz actínica saturante) não foi significativo para nenhum dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (qN dia 1: F= 0,434, p= 0,9926; qN dia 11: F= 0,701, p= 0,8539; NPQ dia 1: F= 0,213, p= 1,00; NPQ dia 11: F= 0,742, p= 0,8109; qP dia 1: F= 0,773, p= 0,7759; qP dia 11: F= 1,488, p= 0,0867; ETR dia 1: F= 0,655, p= 0,8954; ETR dia 11: F= 1,062 , p= 0,94039; Yield dia 1: F=0,556, p=0,9589; Yield dia 11: F=1,450; p=0,1014).

Antes do início das simulações (dia 1), não houve efeito da concentração de fluoreto de potássio sobre nenhuma das características de fluorescência (qN: F=0,358, p=0,8382; NPQ: F=1,26, p=0,2898; qP: F=0,526, p =0,7169; ETR: F=0,925, p=0,4518; Yield: F=0,337, p=8525), o que indica que as plantas de todos os tratamentos estavam sob as mesmas condições iniciais, e que alterações posteriores nas características de fluorescência, se houvessem, seriam possivelmente devido à exposição ao KF.

Vinte e quatro horas após o término das simulações (dia 11) foi possível verificar que as concentrações de KF não afetaram significativamente o quenching fotoquímico (F=0,775, p=0,5436), a taxa de transporte de elétrons (F=0,327, p=0,8591) e a produtividade do fotossistema II (F=0,132, p=0,9704). Entretanto, houve efeito significativo das diferentes concentrações de KF sobre o quenching não-fotoquímico (F=8,508, p<0,05) e sobre o coeficiente de extinção não-fotoquímica (F=10,465, p<0,05). O modelo de regressão linear mostra que o quenching não-fotoquímico aumenta com o aumento das concentrações de flúor na chuva simulada ($y=0,0127x+0,2036$, $R^2=0,6203$)

(Gráfico 2), o que também ocorre para o coeficiente de extinção não-fotoquímica ($y=0,0169x+0,1791$; $R^2=0,6296$) (Gráfico 3).

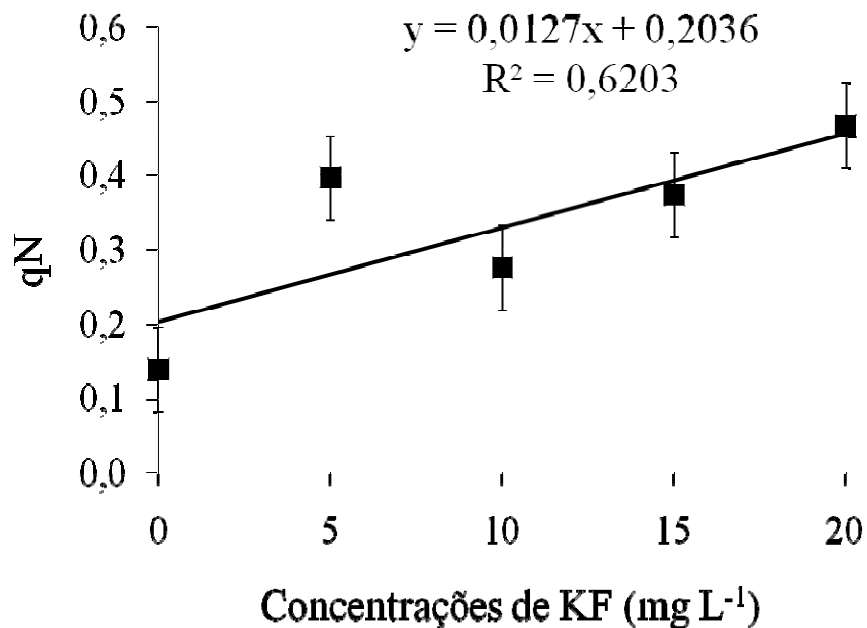


Gráfico 2 Quenching não-fotoquímico (qN) em indivíduos de *Vitex polygama*, em relação às concentrações de KF na chuva simulada (em mg L⁻¹), após 10 dias de simulações. As barras verticais representam o desvio-padrão da média.

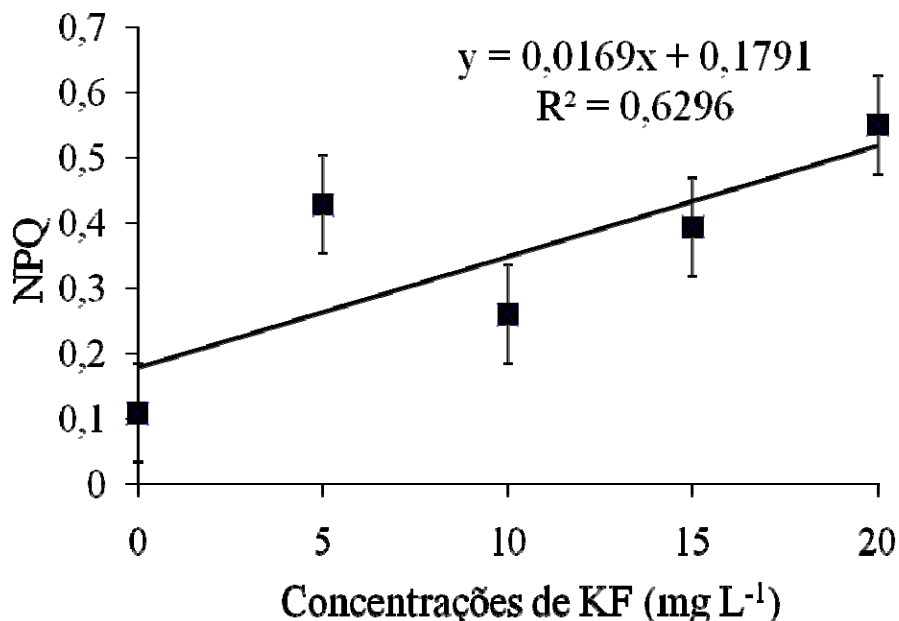


Gráfico 3 Coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) em indivíduos de *Vitex polygama*, em relação às concentrações de KF na chuva simulada (em mg L⁻¹), após 10 dias de simulações. As barras verticais representam o desvio-padrão da média.

O aumento do qN ocorre sob o efeito de muitos agentes estressores sobre as plantas (como luz excessiva, temperaturas altas ou baixas, escassez de CO₂, seca, salinidade, metais pesados). Este aumento está ligado à perda de grande parte da energia de excitação absorvida na forma de calor, um mecanismo regulatório e protetor reversível que envolve modificações na conformação das membranas dos tilacoides desencadeadas pelo gradiente de pH transtilacoidal, estados de transição e pela fotoinativação do fotossistema II (FSII) (ROHÁČEK; SOUKUPOVÁ; BARTÁK, 2008). Segundo Lorenzini et al. (1999), esta perda de energia em calor evita a super-excitação do FSII.

O NPQ (coeficiente devido à extinção não-fotoquímica de energia absorvida) também caracteriza um mecanismo protetor da planta para a dissipação da energia radiante excessiva não utilizada nas reações fotoquímicas (SILVA et al., 2011), sendo considerado o principal mecanismo contra danos ao aparato fotossintético (HORTON; HAGUE, 1998). Ele está relacionado com a oxidação das xantofilas no ciclo das xantofilas, além de refletir menor obtenção de luz pelo complexo antena e inativação do FSII (ROHÁCEK; SOUKUPOVÁ; BARTÁK, 2008). Segundo Ribeiro (2008), a erosão das ceras epicuticulares em espécies submetidas ao flúor poderia resultar em maior incidência de luminosidade sobre as folhas, ativando o ciclo das xantofilas. Neste caso, os prótons da zeaxantina se ligam a proteínas do complexo antena, modificando sua conformação e levando à dissipação de calor e ao aumento no NPQ (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1992).

Os aumentos de qN e NPQ em *Vitex polygama* demonstram que, mesmo na ausência de danos visuais, o flúor constitui um fator estressante para a planta, e este estresse se manifesta na forma de dissipação do excesso de energia. Este mecanismo pode inclusive ter resultado na não-influência do flúor sobre a produtividade quântica do fotossistema II (yield) no claro observada neste estudo. Ao avaliar os efeitos da chuva ácida simulada sobre características da fluorescência das espécies *Schima superba* e *Pinus massoniana*, Liu et al. (2007) observaram que *S. superba* é mais resistente, uma vez que foi capaz de dissipar a energia excessiva, pois apresentou aumento em qN e estado de oxidação das xantofilas um pouco maior do que no tratamento controle. Já *P. massoniana* apresentou diminuição no estado de oxidação das xantofilas e não registrou variação significativa em qN, demonstrando baixa capacidade de dissipar o excesso de energia e maior susceptibilidade à chuva ácida.

A ausência de variação significativa em qP e ETR de *Vitex polygama* indica que o flúor não afetou a conversão da energia radiante em química nos centros de reação do FSII (KRAUSE; WEIS, 1991) e o transporte de elétrons na cadeia fotossintética, respectivamente. No estudo de Ribeiro (2008), que envolveu o efeito do flúor sobre quatro espécies de plantas, a que demonstrou maior resistência ao poluente (*Eremanthus erythropappus*), apresentando os menores teores de acúmulo e ausência de danos visuais, demonstrou resposta ecofisiológica similar a *Vitex polygama*, sem alterações significativas em qP e em ETR. Já em *Panicum maximum*, espécie considerada altamente sensível ao flúor devido à capacidade de acúmulo de elevados teores do poluente e à ocorrência de sintomas evidentes na lâmina foliar (DIVAN-JUNIOR et al., 2007; OLIVA; FIGUEIREDO, 2005), o flúor resultou em diminuição significativa de qP e ETR. Analisando o comportamento destas duas espécies, pode-se observar, portanto, que a resposta da fluorescência da clorofila *a* de *Vitex polygama* no que se refere a estas características a aproximam mais de uma espécie tolerante do que de uma espécie que apresenta sensibilidade ao elemento.

3.3 Análise ultraestrutural

Os cloroplastos corresponderam à organela que mais apresentou alterações ultraestruturais na presença do F, em relação ao tratamento controle, tais como maior tamanho (Figuras 2B,C,D,F e 3B,C,F), membrana ondulada (Figuras 2F e 3C) e formato irregular (2B,C,D e 3B,C,D,E,F).

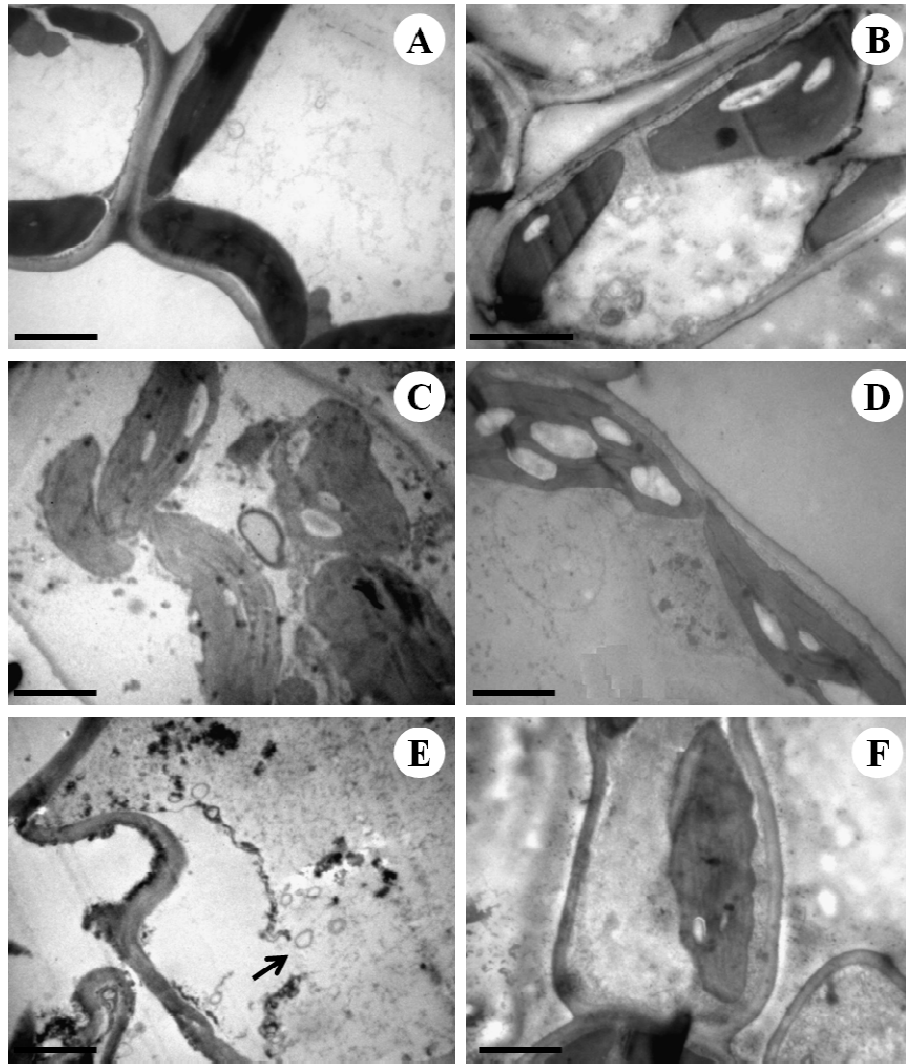


Figura 2 Fotomicrografias de clorênquimas de folíolos de *Vitex polygama* Cham. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A) e quando expostos a 5 (B), 10 (C), 15 (D e E) e 20 mg L^{-1} (F) de fluoreto de potássio durante 10 dias. B, C, D, F: cloroplastos deformados, com maior tamanho e ondulações na parede; B, C, D: grãos de amido de grande tamanho no interior dos cloroplastos; E: destacamento e rompimento da membrana plasmática (seta); B, E, F: citoplasma com aparência granular. Barra=2 μm .

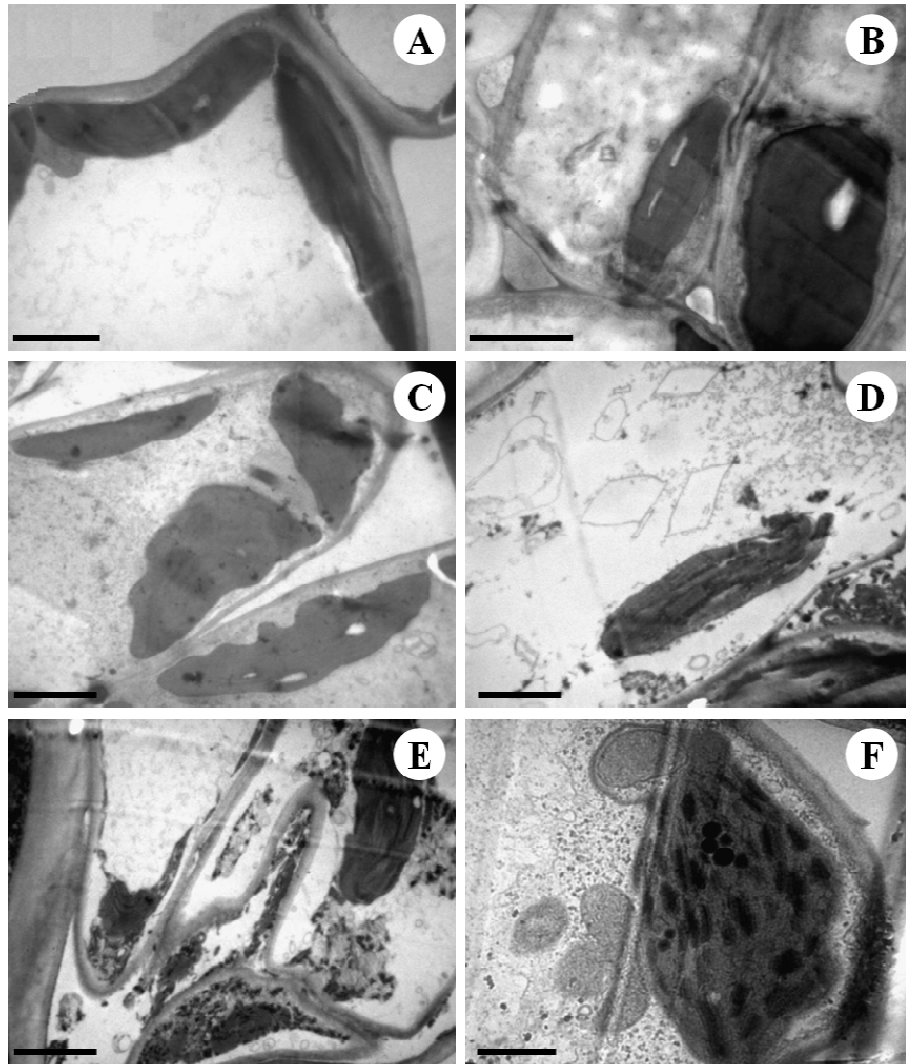


Figura 3 Fotomicrografias de clorênquimas de folíolos de *Vitex polygama* Cham. (secção transversal em microscopia eletrônica de transmissão) no tratamento controle (A) e quando expostos a 5 (B), 10 (C), 15 (D) e 20 mg L⁻¹ (E e F) de fluoreto de potássio durante 10 dias. B, C, E, F: cloroplastos deformados, com maior tamanho e ondulações na parede; B, C, E: grãos de amido de grande tamanho no interior dos cloroplastos; B, C, D, F: citoplasma com aparência granular; E: rompimento de vesículas nas células, liberando compostos elétron-densos. Barras= 1 μm (F) e 2 μm (A,B,C,D,E).

A maior ocorrência de danos nos cloroplastos pode estar ligada ao maior acúmulo de F nesta organela, como foi determinado por Chang e Thompson (1966), que, através do fracionamento de folhas da laranja *Citrus sinensis* em componentes subcelulares, demonstraram que os cloroplastos correspondem à organela de maior acumulação de fluoreto. O acúmulo de F está ligado ao pH do microambiente imediato, sendo que, quanto maior o valor do pH, maior a acumulação do poluente. De acordo com os valores de pH do apoplasto e dos diferentes componentes celulares, o acúmulo do F é, em ordem decrescente, maior nos cloroplastos, mitocôndria e citoplasma, e menor no apoplasto. Sendo assim, mesmo baixas concentrações de F no apoplasto podem levar a altos níveis de concentração do poluente nas organelas, resultando em danos (MILLER, 1993).

Wei e Miller (1972) observaram cloroplastos maiores e com um envelope parcialmente ou completamente interrompido em folhas de *Glycine max* submetidas ao flúor. Estudos ultraestruturais de Fornasiero (2001) registraram grandes alterações na estrutura dos cloroplastos, entre elas: dificuldade de reconhecimento do sistema lamelar, ruptura do envelope externo, e aumento em tamanho e em número da organela, juntamente com uma redução na concentração de clorofilas. Ao analisar cortes transversais da lâmina foliar de *Panicum maximum*, Chaves et al. (2002) observaram cloroplastos mais dispersos, em número reduzido e maior tamanho nas plantas tratadas com F, além de desintegração destas organelas.

Foram observados grãos de amido de maior tamanho no interior dos cloroplastos das plantas tratadas com flúor (Figuras 2B,C,D e 3B,C,E), também observados por outros autores (ELEFTHERIOU; TSEKOS, 1991; SANT'ANNA-SANTOS, 2008; WEI; MILLER, 1972). Em situações estressantes como a presença de poluentes, a translocação de carboidratos das

folhas para as raízes pode ser inibida, o que pode levar ao acúmulo de grãos de amido nestas organelas. Esta inibição pode ocorrer por inativação de células do floema, as quais são responsáveis pela translocação dos fotoassimilados para outros órgãos vegetais (RENNENBERG; HERSCHBACH; POLLE, 1996; SODA et al., 2000). De acordo com Schmitt e Ruetze (1990), o acúmulo dos grãos de amido nos cloroplastos também pode constituir um indicador da aceleração da senescência.

Outra alteração detectada nas eletromicrografias foi o destacamento da membrana plasmática da parede celular, e seu rompimento (Figura 2E), como também verificado em *Hypericum perforatum* por Fornasiero (2001). O F pode afetar as membranas celulares através de dois mecanismos principais: baixa disponibilidade de energia para a síntese dos componentes desta estrutura celular ou hidrólise dos lipídios da membrana para serem utilizados como fontes alternativas de energia (BHATNAGAR; BHATNAGAR, 2000). Os efeitos do poluente sobre as membranas celulares podem resultar em outros danos, como perda acelerada de eletrólitos (DIVAN-JUNIOR et al., 2007).

Foi também registrada formação de pequenos e numerosos vacúolos no citoplasma celular, ficando este com uma aparência granular (Figuras 2B,E,F e 3B,C,D,F), e, em algumas células, rompimento de vesículas, liberando compostos elétron-densos (Figura 3E), também outros dos possíveis sintomas causados pelo F dentro das células (ELEFTHERIOU; TSEKOS, 1991). A formação de vacúolos pode estar ligada ao rompimento do tonoplasto, formando vesículas e corpos multivesiculares (WEI; MILLER, 1972). Segundo Miller (1993), o tonoplasto se mostra a membrana mais sensível ao F, e sua ruptura leva à liberação de compostos fenólicos e outras substâncias orgânicas que podem acelerar a degeneração de outras organelas, uma vez que induzem mudanças osmóticas no citoplasma, e exercem efeitos tóxicos sobre a célula.

Isto pode resultar na desintegração do citoplasma e de algumas organelas (CHAVES et al., 2002; WEI; MILLER, 1972).

É importante destacar que todas as concentrações de KF utilizadas neste experimento foram responsáveis por causar danos em nível ultraestrutural, sendo que os tipos de danos foram basicamente os mesmos em todos os tratamentos com o poluente. De acordo com Wei e Miller (1972), a concentração de flúor parece não alterar o tipo de injúria ocorrida nas células, mas sim a taxa e velocidade de desenvolvimento destes danos.

4 CONCLUSÃO

Vitex polygama Cham. apresenta potencial para ser utilizada como biosensora de poluição atmosférica por F, uma vez que não apresentou sintomas visuais quando exposta ao fluoreto de potássio nas concentrações e no tempo utilizados no presente experimento. Além disso, o acúmulo do poluente se mostrou relativamente baixo, apenas ocorrendo nas concentrações mais elevadas de KF na chuva.

No entanto, o flúor resultou em maior dissipação da energia absorvida na forma de calor e em danos ultraestruturais. Estas alterações se mostram importantes em programas de monitoramento da poluição atmosférica por flúor, podendo ser utilizadas como biomarcadores, além de ter importante valor na detecção prognóstica de injúria pelo poluente nesta espécie.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de transmissão**. Lavras: FAEPE, 2004. 51 p. Apostila.

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

BAKER, N. R.; ROSENQVST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 55, n. 403, p. 1607-1621, Aug. 2004.

BERG, E. van den et al. Estrutura do componente arbóreo de uma floresta de galeria aluvial em Poços de Caldas, MG. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 150-152, 2007. Suplemento.

BHATNAGAR, M.; BHATNAGAR, A. Algal and cyanobacterial responses to fluoride. **Fluoride**, Detroit, v. 33, n. 2, p. 55-65, 2000.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, Berlin, v. 102, n. 4, p. 425-432, 1995.

BOESE, S. R.; MACLEAN, D. C.; EL-MOGAZI, D. Effects of fluoride on chlorophyll a fluorescence in spinach. **Environmental Pollution**, Barking, v. 89, n. 2, p. 203-208, Apr. 1995.

CAMPOS, N. V.; AZEVEDO, A. A.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F. Acúmulo e efeitos fitotóxicos do flúor em folhas de boldo-gambá e capim-cidreira utilizadas para chás. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 7, p. 646-653, jul. 2010.

CANTINO, P. D.; HARLEY, R. M.; WAGSTAFF, S. J. Genera of Labiatae: status and classification. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. (Ed.). **Advances in Labiate science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 511-522.

CAPPELLIN, P. Entre a memória e o mercado: o desenvolvimento da empresa de porte médio no Brasil. **Revista de Sociologia e Política**, Curitiba, v. 16, n. 31, p. 49-70, 2008.

CHANG, C. W.; THOMPSON, C. R. Site of fluoride accumulation in navel orange leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 41, p. 211-213, 1966.

CHAVES, A. L. F. et al. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-rhodes) - Poaceae. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 395-406, out./dez. 2002.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 599-626, 1992.

DIVAN-JUNIOR, A. M. et al. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colonião. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 67, n. 2, p. 247-253, June 2007.

ELEFThERIOU, E. P.; TSEKOS, I. Fluoride effects of leaf cell ultrastructure of olive trees growing in the vicinity of the Aluminum Factory of Greece. **Trees**, Santa Monica, v. 5, n. 1, p. 83-89, 1991.

ELLENBERG, H. Bioindicator and biological monitoring. In: _____. **Biological monitoring: signal from the environment**. Braunschweig: Gate/GTZ, 1991. p. 13-74.

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**, Baltimore, v. 64, p. 903-913, 1977.

FALLA, J. et al. Biological air quality monitoring: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 64, n. 3, p. 627-644, Oct. 2000.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

FORNASIERO, R. B. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 5, p. 979-985, Oct. 2001.

FRANZARING, J. et al. Environmental monitoring of fluoride emissions using precipitation, dust, plant and soil samples. **Environmental Pollution**, Barking, v. 144, n. 1, p. 158-165, Jan. 2006.

GARCIA-CIUDAD, A. et al. Determination of fluoride in plant samples by a potentiometric method and near-infrared reflectance spectroscopy. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 16, n. 10, p. 1107-1122, 1985.

GARG, K. K.; VARSHNEY, C. K. Effect of air pollution on the leaf epidermis at the submicroscopic level. **Experientia**, Basel, v. 36, n. 12, p. 1364-1366, 1980.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p.

HORTON, P.; HAGUE, A. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts: IV., resolution of non-photochemical quenching. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 932, n. 1, p. 107-115, 1998.

JACOBSON, J. S. et al. The accumulation of fluorine by plants. **Journal of the Air Pollution Control Association**, Pittsburgh, v. 16, p. 412-417, 1966.

KLUMPP, A. et al. Fluoride impact on native tree species of the Atlantic Forest near Cubatão, Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 87, n. 1, p. 57-71, Feb. 1996.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 313-349, 1991.

KUMAR, K. A.; RAO, V. B. Physiological responses to fluoride in two cultivars of mulberry. **World Journal of Agricultural Sciences**, Deira, v. 4, n. 4, p. 463-466, Aug. 2008.

LARSEN, S.; WIDDOWSON, A. E. Soil fluorine. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 22, p. 210-221, 1971.

LIU, J. et al. Responses of chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle in leaves of *Schima superb* Gardn. & Champ. and *Pinus massoniana* Lamb. to simulated acid rain at Dinghushan Biosphere Reserve, China. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warsaw, v. 29, n. 1, p. 33-38, Apr. 2007.

LORENZINI, G. et al. Quenching analysis in poplar clones exposed to ozone. **Tree Physiology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 607-612, Sept. 1999.

LÜTTGE, U. **Physiological ecology of tropical plants**. Berlin: Springer, 2008. 458 p.

MESQUITA, G. L. et al. Atmospheric absorption of fluoride by cultivated species: leaf structural changes and plant growth. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 219, n. 1, p. 143-156, Jan. 2011.

MILLER, G. W. The effect of fluoride on higher plants: with special emphasis on early physiological and biochemical disorders. **Fluoride**, Detroit, v. 26, n. 1, p. 3-22, 1993.

MOLDENKE, H. N.; MOLDENKE, A. L. Materials toward a monograph of the genus *Vitex*. **Phytologia**, Huntsville, v. 6, p. 80-89, 1957.

OLIVA, M. A.; FIGUEIREDO, J. G. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 389-397, abr./jun. 2005.

REDDY, M. P.; KAUR, M. Sodium fluoride induced growth and metabolic changes in *Salicornia brachiata* Roxb. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 188, n. 2, p. 171-179, Mar. 2008.

RENNENBERG, H.; HERSCHBACH, C.; POLLE, A. Consequences of air pollution on shoot-root interactions. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 148, n. 3/4, p. 296-301, 1996.

RIBEIRO, S. F. C. **Efeitos da aplicação de flúor sobre os processos fotossintéticos em três espécies lenhosas e nativas da região de Ouro Preto, MG**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

ROHÁČEK, K.; SOUKUPOVÁ, J.; BARTÁK, M. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. **Research Signpost**, Trivandrum, v. 2, n. 1, p. 41-104, 2008.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. **Avaliação dos efeitos fitotóxicos do flúor em *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae), espécie tropical sensível**. 2008. 102 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. et al. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 4, p. 761-771, jul./ago. 2007.

SCHMITT, U.; RUETZE, M. Structural changes in spruce and fir needles. **Environmental Pollution**, Barking, v. 8, n. 2, p. 187-190, Apr. 1990.

SCHREIBER, U. Chlorophyll fluorescence assay for ozone injury in intact plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 61, p. 80-84, 1978.

SILVA, E. N. et al. Stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 1, p. 62-68, 2011.

SILVA, L. C. et al. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 385-393, dez. 2000.

SINGH-RAWAL, P.; JAJOO, A.; BHARTI, S. Fluoride affects distribution of absorbed excitation energy more in favour of photosystem 1. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 3, p. 556-560, June 2010.

SODA, C. et al. Impacts of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 44, n. 1, p. 69-82, Jan. 2000.

TEMMERMAN, L. et al. Biomonitoring of air pollutants with plants: considerations for the future. In: KLUMPP, A.; ANSEL, W.; KLUMPP, G. (Ed.). **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness**. Göttingen: Cuvillier Verlag, 2004. p. 337-374.

TRESHOW, M.; ANDERSON, F. K. **Plant stress from air pollution**. Chichester: J. Wiley, 1989. 283 p.

WEI, L.; MILLER, G. W. Effect of HF on the fine structure of mesophyll cells from *Glycine max*, Merr. **Fluoride**, Detroit, v. 5, n. 2, p. 67-72, 1972.

WEINSTEIN, L. H. Fluoride and plant life. **Journal of Occupational Medicine**, Chicago, v. 19, p. 49-78, 1977.

WEINSTEIN, L. H.; DAVISON, A. W. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution**, Barking, v. 125, n. 1, p. 3-11, Jan. 2003.

ARTIGO 2

**CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM
Vitex polygama CHAM. (VERBENACEAE) SUBMETIDA AO FLÚOR**

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho determinar os efeitos do flúor sobre a anatomia e a ultraestrutura de *Vitex polygama* Cham. Para isto, plantas da espécie foram submetidas a chuvas simuladas contendo 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de fluoreto de potássio (KF) por 15 minutos durante 10 dias. No tratamento controle, utilizou-se água deionizada. Ao final das simulações, fragmentos foliares foram preparados para análises em microscopia fotônica e microscopia eletrônica de varredura. Os danos causados pelo flúor se concentraram principalmente na epiderme, sendo detectados acúmulo e erosão de ceras epicuticulares. Também foi observada colonização das superfícies foliares por fungos, possivelmente como dano direto ou indireto da erosão das ceras. Os tratamentos com maiores concentrações de KF resultaram em deformações nas paredes das células epidérmicas. Não foi detectada alteração significativa na espessura do limbo e dos tecidos foliares entre o tratamento controle e os tratamentos com flúor. Os resultados obtidos mostram a epiderme como um dos primeiros sítios de ação do flúor em *Vitex polygama*, e sugerem a utilização das alterações neste tecido como biomarcadores em programas de biomonitoramento que utilizem a espécie.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica de varredura. Ceras epicuticulares. Anatomia vegetal

ABSTRACT

In this study, we aimed to determine fluoride effects on the anatomy and ultrastructure of *Vitex polygama* Cham. For this, plants of the species were submitted to simulated rains containing 5, 10, 15 and 20 mg L⁻¹ of potassium fluoride (KF) for 15 minutes during 10 days. In the control treatment, deionized water was used. At the end of the simulations, leaf fragments were prepared for analysis in light microscopy and scanning electron microscopy. The damages caused by fluoride were mainly observed in the epidermis, such as accumulation and erosion of epicuticular waxes. It was also observed colonization of leaf surfaces by fungi, possibly as a direct or indirect damage due to the erosion of the waxes. The treatments with higher concentrations of KF resulted in deformations of the epidermal cell walls. No significant change was detected in the thickness of the blade and leaf tissues, between control and fluoride treatments. The results show the epidermis as one of the first action sites of fluoride in *Vitex polygama*, and suggest the use of the damages in this tissue as biomarkers in biomonitoring studies that involve this species.

Keywords: Scanning Electron Microscopy. Epicuticular waxes. Plant anatomy.

1 INTRODUÇÃO

O flúor pode ser liberado na atmosfera através do aquecimento de rochas e solos em indústrias de fundição de alumínio e outros metais não ferrosos, fertilizantes minerais, vidros e cerâmicas (ARNDT; FLORES; WEINSTEIN, 1995), e constitui um dos poluentes de maior fitotoxicidade (FORNASIERO, 2001). Em espécies sensíveis, este poluente pode causar necroses e reduções no crescimento, mesmo em plantas que se encontram a uma distância relativamente grande da fonte emissora (KLUMPP et al., 1996).

Na vegetação, a maior parte do flúor é absorvida nas folhas através dos estômatos (CHAVES et al., 2002; OLIVA; FIGUEIREDO, 2005), podendo também entrar em menor proporção por meio da cutícula (MILLER, 1993) ou da base dos tricomas (PITA-BARBOSA et al., 2009).

A tolerância ou sensibilidade das espécies vegetais ao flúor depende de vários fatores, tais como estágio de desenvolvimento da planta, fatores edáficos, climáticos e genéticos. Maior número de espécies tende a ser tolerante ao poluente (WEINSTEIN; DAVISON, 2003).

Mesmo quando não apresentam injúrias visíveis, plantas expostas ao F podem acumular este poluente e apresentar alterações em características fisiológicas (BOESE; MACLEAN; EL-MOGAZI, 1995; RIBEIRO, 2008), anatômicas e ultra-estruturais (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010; MESQUITA et al., 2011). Algumas destas alterações incluem plasmólise e colapso dos tecidos foliares em regiões necrosadas (CHAVES et al., 2002; FORNASIERO, 2001), erosão de ceras epicuticulares, danos na estrutura dos estômatos (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007) e ruptura da cutícula (PITA-BARBOSA et al., 2009).

Sabe-se que as alterações microscópicas precedem os danos visíveis (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2000). Desta forma, estudos que envolvam tais alterações são importantes para a observação de danos decorrentes da presença do flúor na atmosfera antes mesmo que possam ser detectadas injúrias visuais, além de também auxiliar no entendimento do mecanismo de ação do poluente no organismo vegetal (WEINSTEIN; DAVISON, 2003).

Em estudos de bioindicação e biomonitoramento, o uso de uma espécie naturalmente ocorrente em uma região que apresenta o poluente estudado se mostra mais importante e vantajoso. Isto porque, caso sejam estudadas espécies exóticas, os sintomas específicos do organismo ao poluente podem ser mascarados pelos efeitos provocados pelas condições ambientais locais (ELLENBERG, 1991).

Vitex polygama Cham. (Verbenaceae) (CANTINO; HARLEY; WAGSTAFF, 1992) é uma espécie de ampla distribuição no território brasileiro, ocorrendo principalmente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. Popularmente conhecida como “tarumã”, “velame-do-campo” e “Maria-preta”, a espécie se apresenta na forma arbustiva ou arbórea. Na região do Sul de Minas Gerais, é considerada importante por responder por grande parte do número de indivíduos em determinadas áreas como no município de Poços de Caldas (GUIMARÃES, 2007), que possui grande número de indústrias de alumínio e cristais, as quais geram flúor como poluente (CAPELLIN, 2008).

Este trabalho teve como objetivo identificar modificações anatômicas e ultraestruturais provocadas pelo flúor na lâmina foliar de *Vitex polygama*. Isto se torna importante subsídio da atuação desta espécie no biomonitoramento da

poluição atmosférica por flúor, além de poder contribuir com informações sobre sua resposta ao poluente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Mudas da espécie *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae) foram fornecidas em tubetes pelo viveiro da CEMIG-Lavras (Companhia Energética de Minas Gerais). As mudas com cerca de 25,0 cm foram transferidas para sacos plásticos de 3,0 L, os quais foram preenchidos com mistura de solo, areia e esterco, em uma proporção de 2:1:1, respectivamente. As plantas permaneceram 120 dias em casa de vegetação do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para aclimatização, e, durante este período, receberam solução nutritiva de Hoagland e Arnon a 0,5 de força iônica (HOAGLAND; ARNON, 1950) a cada 15 dias, sendo também irrigadas por água deionizada, de forma que fosse sempre mantida a capacidade de campo do substrato.

Sete dias antes do início do experimento, as plantas foram transferidas para o laboratório de Ecologia da UFLA, para aclimatização, onde permaneceram até o final das simulações de chuva, para que não houvesse a interferência de estressores ambientais na resposta das plantas aos tratamentos. Ao longo do período experimental, as plantas foram submetidas a fotoperíodo de 12 horas, com radiação global em torno de $19,4 \pm 3,4 \text{ W m}^{-2}$, o que correspondeu a um valor médio de $88,2 \pm 15,4 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As temperaturas máxima, média e mínima durante o período foram de: $24,2 \pm 1,0$; $22,4 \pm 1,7$; $20,8 \pm 1,3 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Durante 10 consecutivos, as plantas foram submetidas a 15 minutos diários de chuva simulada, totalizando $9,15 \text{ mm dia}^{-1}$ de precipitação, a qual foi

aplicada em uma câmara construída a partir do modelo proposto por Evans, Gmur e Costa (1977). Foram utilizados cinco tratamentos: controle (chuva apenas com água deionizada) e quatro tratamentos com diferentes concentrações de flúor. Os tratamentos de chuva com F foram preparados mediante a mistura de flúor, na forma de fluoreto de potássio, em água deionizada, nas seguintes concentrações: 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹. Os valores de pH do tratamento controle e dos tratamentos com flúor foram aferidos com pHmetro portátil Hanna HI 98127, e ajustados para 6,0 com solução de HCl 2,0 N. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e oito repetições.

Para a análise ultraestrutural, amostras foliares foram preparadas e observadas em microscópio eletrônico de varredura no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Fragmentos foliares foram retirados do folíolo central de folhas completamente expandidas do primeiro nó e fixados em solução Karnovsky (glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%), em tampão cacodilato, pH 7,0, 0,05 M + CaCl₂ 0,001 M). As amostras foram lavadas (três vezes por 10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M. Posteriormente, foi feita pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (1,0%) com o mesmo tampão, por 1 hora. Em seguida, o material foi desidratado em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes) e submetido à secagem em aparelho de ponto crítico. Após a secagem, os espécimes foram montados em stubs com fitas de carbono dupla face, colocadas sobre uma película de papel alumínio, e cobertos com ouro em evaporador. Foram geradas imagens de cada amostra em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40, as quais foram registradas digitalmente, a aumentos variáveis (ALVES, 2004).

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras em Lavras, MG. Para a caracterização das modificações anatômicas das espécies selecionadas, folíolos de folhas completamente expandidas localizadas no primeiro nó foram colhidos e fixados em F.A.A₇₀ (JOHANSEN, 1940). Em cada tratamento, foi retirado um folíolo por repetição, em um total de cinco repetições. Após fixação, regiões medianas dos folíolos foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesina, Leica Instruments). Utilizando micrótomo de deslizamento, foram feitas secções transversais com 8,0 µm de espessura, as quais foram coradas com azul de toluidina pH 4,7 (O'BRIEN; MCCULLY, 1981). As lâminas permanentes foram montadas em bálsamo do Canadá. As imagens foram capturadas utilizando-se uma câmera Moticam 2500 acoplada a microscópio Olympus CX 41.

Foram medidas as espessuras do limbo foliar (LF), da epiderme da face adaxial (ED) e abaxial (EB), do parênquima paliçádico (PP) e do parênquima esponjoso (PE). Foram mensurados 25 campos por características avaliadas por repetição, utilizando-se o software Image Tool versão 3.0 para Windows, disponibilizado pelo University of Texas Health Science Center at Santo Antonio (EUA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Modificações ultraestruturais

Nas superfícies abaxial e adaxial de folhas do tratamento controle, foi possível observar a presença de células epidérmicas de contorno sinuoso e com a porção central elevada, cutícula lisa, e a presença de muitos tricomas tectores e glandulares peltados. Os tricomas peltados possuem pedicelo curto e cabeça ovóide. Os tricomas tectores são multisseriados (Figuras 1A e 2A). A folha de *Vitex polygama* é hipostomática e os estômatos apresentam distribuição aleatória na epiderme e posição projetada (Figura 1A).

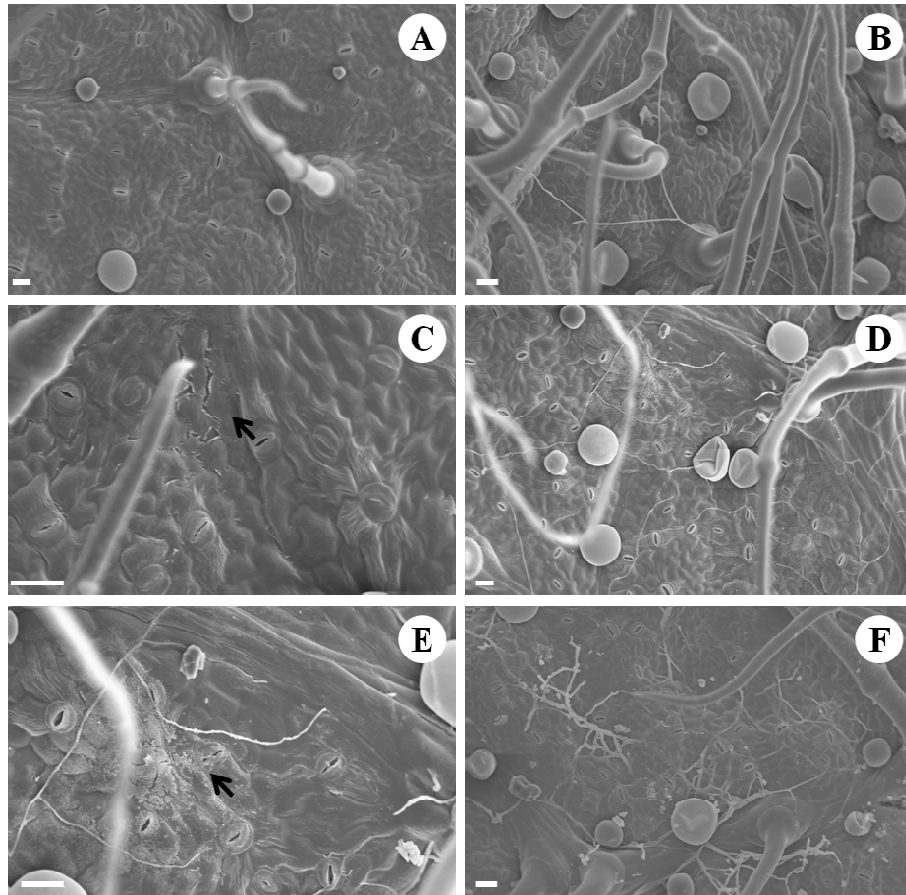


Figura 1 Fotomicrografias da superfície abaxial de folíolos de *Vitex polygama* no tratamento controle (A) e quando expostos a 5 (B), 10 (C), 15 (D e E) e 20 (F) mg L⁻¹ de fluoreto de potássio durante 10 dias. B, D, E, F: presença de hifas fúngicas; C: ruptura da cera epicuticular (seta); E: acúmulo de cera epicuticular (seta). Barras= 10 µm (C) e 20 µm (A,B,D,E,F).

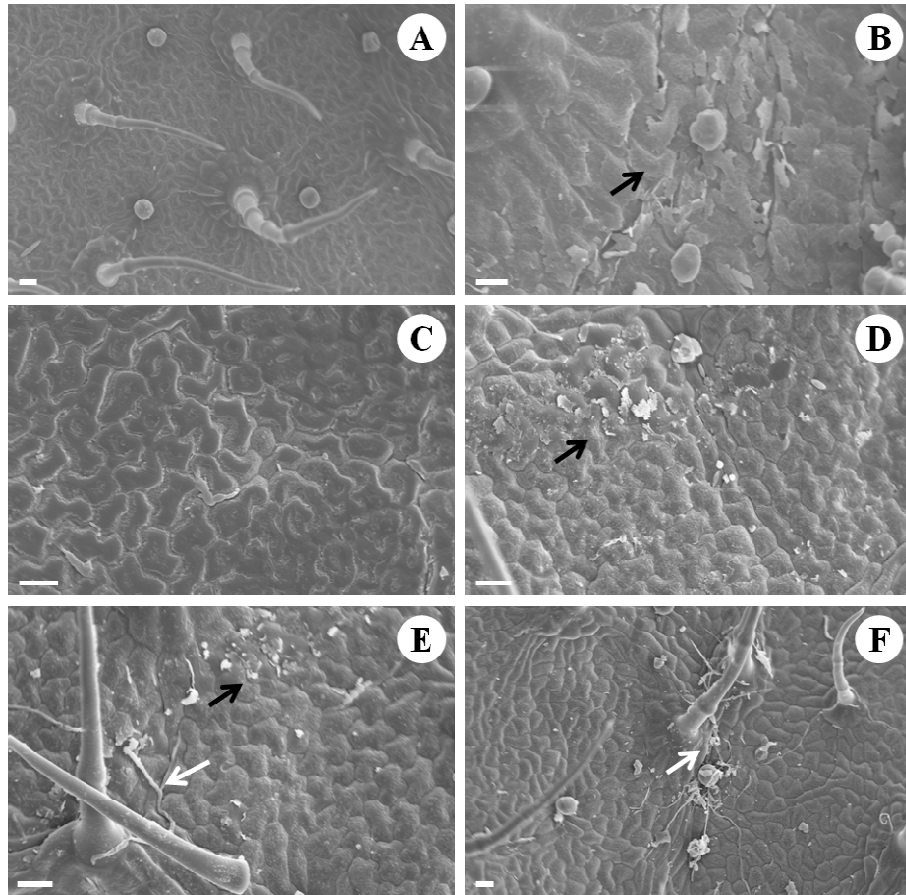


Figura 2 Fotomicrografias da superfície adaxial de folíolos de *Vitex polygama* no tratamento controle (A) e quando expostos a 5 (B), 10 (C), 15 (D) e 20 (E e F) mg L^{-1} de fluoreto de potássio durante 10 dias. E, F: presença de hifas fúngicas (setas claras); C e E: cera epicuticular mais proeminente; B, D, E: erosão de cera epicuticular devido ao seu acúmulo (setas escuras). Barras= $10\mu\text{m}$ (B) e $20\mu\text{m}$ (A,C,D,E,F).

Todas as concentrações de fluoreto de potássio na chuva simulada (5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹) foram responsáveis por causar modificações na superfície foliar de *Vitex polygama*, o que pode ter relação com a fitotoxicidade do flúor. Em ambas as faces da epiderme, foram detectados o acúmulo de cera epicuticular (Figuras 1E e 2B, C, D e E) e sua erosão (Figuras 1C e 2B, D, E).

Nas plantas tratadas com flúor, a cera epicuticular apresentou-se mais pronunciada, trincada em alguns pontos (Figura 1C) e soltando-se em outros (Figuras 2B,D). A maior proeminência da camada de cera epicuticular também foi registrada em plantas de *Lolium multiflorum* submetidas a altas concentrações de F em decorrência da degeneração de paredes celulares, levando a deformação da superfície foliar (MESQUITA et al., 2011). A erosão e descamação de ceras epicuticulares também foi detectada por outros autores em folíolos ou folhas expostas ao F (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010; CHAVES et al., 2002; MESQUITA et al., 2011; PITA-BARBOSA et al., 2009; SANT'ANNA-SANTOS, 2008; SANT'ANNA-SANTOS; AZEVEDO, 2007, 2010; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007), e pode ser resultante da perda da integridade da epiderme (MESQUITA et al., 2011). A erosão destas ceras pode facilitar a entrada de poluentes presentes na água das chuvas na epiderme, uma vez que altera a impermeabilização da superfície foliar (EVANS, 1982).

Foram também detectadas colonizações da superfície foliar de *Vitex polygama* por hifas fúngicas (Figuras 1B,D,E,F e 2F). A ocorrência de infestação fúngica na superfície foliar de plantas tratadas com F também foi observada em trabalhos envolvendo o efeito deste poluente (PITA-BARBOSA et al., 2009; SANT'ANNA-SANTOS, 2008; SANT'ANNA-SANTOS; AZEVEDO, 2007; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007) e de outros agentes estressores sobre as plantas, como a chuva ácida (SANT'ANNA-SANTOS et al.,

2006; SILVA et al., 2005) e o glifosato presente em formulações herbicidas (TUFFI-SANTOS et al., 2009). As ceras epicuticulares podem apresentar compostos secundários em sua composição (tais como terpenos e flavonóides) ligados à proteção da planta contra patógenos (ALCERITO et al., 2002). Sendo assim, sua desestruturação pode predispor a planta ao ataque destes agentes. Além disso, o aumento da infestação fúngica também pode ser um dano indireto decorrente das alterações causadas na camada de cera, uma vez que a remoção ou erosão deste componente, juntamente com a desestruturação da cutícula, podem resultar em maior umedecimento da folha, o que facilita a invasão por patógenos (PITA-BARBOSA et al., 2009; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007), pois superfícies úmidas são mais facilmente colonizadas por microorganismos (BARTHLOTT, 1981).

A detecção de danos microscópicos (como acúmulo e erosão de ceras epicuticulares e a proliferação de fungos) em folhas de *Vitex polygama* com aspecto visual sadio reforça o resultado esperado segundo o qual as alterações microscópicas antecedem as macroscópicas, tendo, portanto, importante valor prognóstico na detecção de injúrias causadas pelo flúor (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010; CHAVES et al., 2002; PITA-BARBOSA et al., 2009; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007).

3.2 Análise anatômica

As análises anatômicas em microscopia de luz mostram que o mesofilo das folhas de *Vitex polygama* é dorsiventral e apresenta, em secção transversal, epiderme das faces adaxial e abaxial unisseriadas, parênquima paliádico composto por duas a três camadas de células e parênquima esponjoso, composto por 3 a 4 camadas de células e com muitos espaços intercelulares (Figura 3). Em

plântulas de *Vitex megapotamica*, a descrição anatômica se mostra bastante similar, com epidermes unisseriadas em ambas as faces da folha e mesofilo heterogêneo dorsiventral, com uma camada de células de parênquima paliçádico e de 3 a 4 de lacunoso (COSMO et al., 2009).

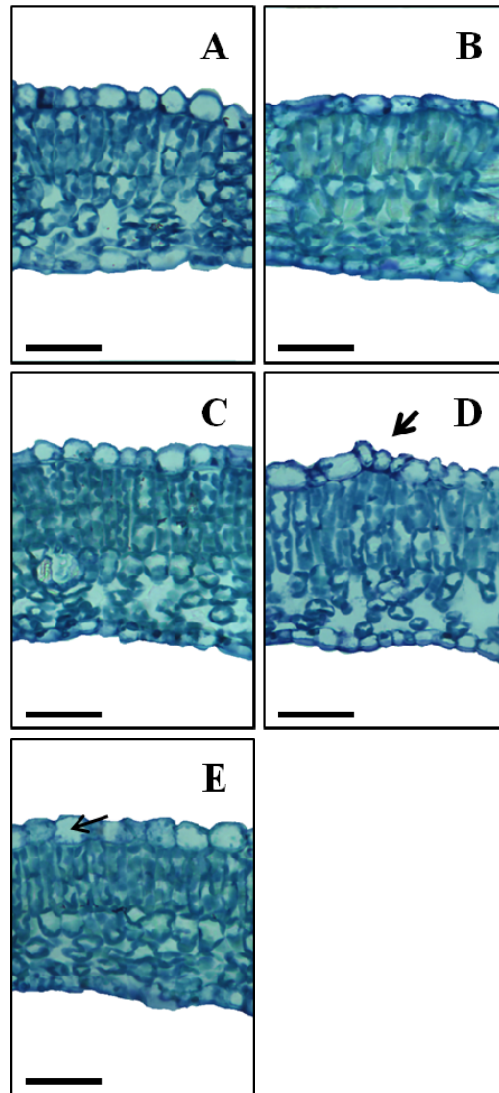


Figura 3 Secção transversal da estrutura foliar de *Vitex polygama* em microscopia de luz, no tratamento controle (A) e quando exposta a 5 (B), 10 (C), 15 (D) e 20 mg L⁻¹ (E) de fluoreto de potássio. D: formato celular alterado (seta). E: alteração na parede anticlinal de células epidérmicas (seta). Barra=50 µm

A análise anatômica mostra que as principais alterações provocadas pelo flúor em *Vitex polygama* ocorrem nas células epidérmicas da face adaxial, e constituem alterações na forma destas células (Figura 3D), e distorções em sua parede anticlinal (Figuras 3D, E), especialmente em plantas expostas às maiores concentrações de KF (15 e 20 mg L⁻¹). Sant'Anna-Santos e Azevedo (2007) também detectaram células epidérmicas com forma alterada em plantas de *Magnolia ovata* expostas à chuva simulada contendo este poluente. O registro de injúrias iniciais na epiderme da face adaxial pode refletir o fato de este tecido sofrer o impacto direto das gotas de chuva (ALVES; OLIVA-CANO, 1993).

Em outras espécies, foram detectados danos anatômicos mais severos. Em *Hypericum perforatum*, o flúor levou ao colapso total de células de todos os tecidos, alterando intensamente toda a arquitetura foliar (FORNASIERO, 2001). Em plântulas e mudas de *Spondias dulcis*, ocorreram áreas necrosadas generalizadas, plasmólise e colapso de células do mesofilo, sendo que apenas as regiões estomáticas se apresentaram nítidas em certas regiões (SILVA et al., 2000). Chaves et al. (2002) observaram plasmólises e necroses de células epidérmicas, erosões nas superfícies das folhas e desintegração do conteúdo celular nas células do mesofilo de *Panicum maximum* e *Chloris gayana*, além de hipertrofia e necrose de células do mesofilo de *P. maximum*.

A não-ocorrência de danos anatômicos muito severos reforça a relativa tolerância de *Vitex polygama* ao F. Mesquita et al. (2011) estudaram o efeito deste poluente sobre duas espécies e, por motivos de comparação, utilizaram uma espécie considerada sensível (*Gladiolus* spp.) e outra tolerante (*Lolium multiflorum*) ao poluente. Enquanto em *Gladiolus* foram detectadas degenerações celulares, alterações do arranjo de células e colapso da parede de algumas células, em *L. multiflorum* as injúrias anatômicas nas folhas expostas às

maiores concentrações de HF corresponderam principalmente a irregularidades no formato de células epidérmicas, enquanto nas menores concentrações, não houve danos aparentes na estrutura celular e na anatomia desta espécie.

Não foram detectadas alterações na espessura do limbo foliar ($F=0,385$; $p=0,8187$), da epiderme adaxial ($F=1,326$; $p=0,2689$), do parênquima paliçádico ($F=1,992$; $p=0,1051$), do parênquima esponjoso ($F=2,496$; $p=0,0505$), e da epiderme da face abaxial ($F=1,571$; $p=0,1916$) entre as plantas de *Vitex polygama* do tratamento controle e as expostas a chuvas simuladas com flúor (Tabela 1).

Tabela 1 Efeitos de diferentes concentrações de fluoreto de potássio na chuva simulada, após 10 dias, sobre as seguintes características estruturais de folíolos de *Vitex polygama*: espessuras do limbo foliar (LF), da epiderme da face adaxial (ED), do parênquima paliçádico (PP), do parênquima esponjoso (PE) e da epiderme da face abaxial (EB).

Concentração de flúor (mg L⁻¹) / Espessura (μm)	LF	ED	PP	PE	EB
0	118,88 a	17,31 a	59,04 a	29,88 a	12,07 a
5	117,31 a	15,38 a	64,89 a	28,37 a	10,78 a
10	119,24 a	17,63 a	63,73 a	25,56 a	11,65 a
15	121,47 a	16,78 a	65,52 a	27,97 a	11,98 a
20	120,60 a	17,17 a	63,85 a	31,19 a	11,15 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, segundo o teste Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Em *Magnolia ovata*, também não foram detectadas diferenças significativas na espessura da epiderme e do mesofilo em plantas submetidas e não submetidas ao tratamento com flúor (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007). Pita-Barbosa et al. (2009) também não detectaram alterações significativas na espessura do limbo, das epidermes e do mesofilo de *Brachiaria brizantha*, embora o flúor tivesse resultado em redução da espessura destes caracteres em *Brachiaria decumbens*, o que os levou a caracterizar *B. brizantha* como mais resistente à chuva com flúor, em relação a *B. decumbens* (PITA-BARBOSA et al., 2009).

Em espécies cujas alterações em níveis macro e microscópicos demonstram elevada sensibilidade ao poluente, como *Spondias dulcis* (SANT'ANNA-SANTOS, 2008; SANT'ANNA-SANTOS; AZEVEDO, 2007; SILVA et al., 2000), o flúor pode causar redução na espessura dos tecidos foliares (SANT'ANNA-SANTOS, 2008; SANT'ANNA-SANTOS; AZEVEDO, 2007). Também houve redução na espessura da lâmina foliar de quatro espécies de hortaliças (SANT'ANNA-SANTOS; AZEVEDO, 2010) e em *Hypericum perforatum* (FORNASIERO, 2001) expostos ao poluente. A diminuição da espessura do limbo foliar pode constituir plasticidade anatômica em resposta a poluentes atmosféricos, uma vez que pode ser causada por uma redução dos espaços intercelulares (ALVES et al., 2001), a qual dificulta a circulação dos gases tóxicos dentro da folha (ELEFTHERIOU, 1987).

Sendo assim, a ausência de efeitos sobre a espessura do limbo e dos tecidos foliares de *Vitex polygama* pode ser considerada como uma característica de tolerância da espécie às concentrações e ao tempo de exposição ao flúor utilizado

4 CONCLUSÃO

Os danos ocorridos na epiderme de *Vitex polygama* (como acúmulo e erosão das ceras epicuticulares e deformações na parede das células epidérmicas) podem ter importante valor prognóstico na detecção de danos causados pelo poluente.

Os resultados obtidos reforçam a possibilidade de uso da espécie como biossensora da poluição por este elemento.

REFERÊNCIAS

- ALCERITO, T. et al. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 677-683, July 2002.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 43 p.
- ALVES, E. S. et al. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes de poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 567-576, 2001. Suplemento.
- ALVES, P. L. C. A.; OLIVA-CANO, M. A. Reações da soja à chuva ácida e solo contaminado. **Ambiente: Revista CETESB de Tecnologia**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 34-39, 1993.
- ARNDT, U.; FLORES, F.; WEINSTEIN, L. **Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 155 p.
- BARTHLOTT, W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v. 1, p. 345-355, 1981.
- BOESE, S. R.; MACLEAN, D. C.; EL-MOGAZI, D. Effects of fluoride on chlorophyll a fluorescence in spinach. **Environmental Pollution**, Barking, v. 89, n. 2, p. 203-208, Apr. 1995.
- CAMPOS, N. V.; AZEVEDO, A. A.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F. Acúmulo e efeitos fitotóxicos do flúor em folhas de boldo-gambá e capim-cidreira utilizadas para chás. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 7, p. 646-653, jul. 2010.

CANTINO, P. D.; HARLEY, R. M.; WAGSTAFF, S. J. Genera of Labiatae: status and classification. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. (Ed.). **Advances in Labiate science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 511-522.

CAPPELLIN, P. Entre a memória e o mercado: o desenvolvimento da empresa de porte médio no Brasil. **Revista de Sociologia e Política**, Curitiba, v. 16, n. 31, p. 49-70, 2008.

CHAVES, A. L. F. et al. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-rhodes) - Poaceae. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 395-406, out./dez. 2002.

COSMO, N. L. et al. Morfologia do fruto, da semente e morfo-anatomia da plântula de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (Lamiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 389-397, 2009.

ELEFThERIOU, E. P. A comparative study of the leaf anatomy of olive trees growing in the city and the country. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 27, n. 1, p. 105-117, Feb. 1987.

ELLENBERG, H. Bioindicator and biological monitoring. In: _____. **Biological monitoring: signal from the environment**. Braunschweig: Gate/GTZ, 1991. p. 13-74.

EVANS, L. S. Biological effects of acidity in precipitation on vegetation: a review. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 22, n. 1, p. 55-169, Apr. 1982.

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**, Baltimore, v. 64, p. 903-913, 1977.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

FORNASIERO, R. B. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 5, p. 979-985, Oct. 2001.

GUIMARÃES, J. C. C. **Dinâmica do componente arbustivo-arbóreo de uma floresta de galeria aluvial no planalto de Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil**. 2007. 65 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 31 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill, 1940. 523 p.

KLUMPP, A. et al. Fluoride impact on native tree species of the Atlantic Forest near Cubatão, Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 87, n. 1, p. 57-71, Feb. 1996.

MESQUITA, G. L. et al. Atmospheric absorption of fluoride by cultivated species: leaf structural changes and plant growth. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 219, n. 1, p. 143-156, Jan. 2011.

MILLER, G. W. The effect of fluoride on higher plants: with special emphasis on early physiological and biochemical disorders. **Fluoride**, Detroit, v. 26, n. 1, p. 3-22, 1993.

O'BRIEN, P. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plants structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty, 1981. 45 p.

OLIVA, M. A.; FIGUEIREDO, J. G. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 389-397, abr./jun. 2005.

PITA-BARBOSA, A. et al. Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 4, p. 1027-1033, dez. 2009.

RIBEIRO, S. F. C. **Efeitos da aplicação de flúor sobre os processos fotossintéticos em três espécies lenhosas e nativas da região de Ouro Preto, MG**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. **Avaliação dos efeitos fitotóxicos do flúor em *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae), espécie tropical sensível**. 2008. 102 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 48-50, 2007. Suplemento.

_____. Toxicidade e acúmulo de flúor em hortaliças nas adjacências de uma fábrica de alumínio. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 24, n. 4, p. 952-963, 2010.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. et al. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 58, n. 1, p. 158-168, Feb. 2006.

_____. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 4, p. 761-771, jul./ago. 2007.

SILVA, L. C. et al. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 385-393, dez. 2000.

SILVA, L. C. et al. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in Restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 168, n. 1, p. 129-143, Mar. 2005.

TUFFI-SANTOS, L. D. et al. Micromorfologia foliar na análise de fitotoxidez por glyphosate em *Eucalyptus grandis*. **Planta Daninha**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 711-720, 2009.

WEINSTEIN, L. H.; DAVISON, A. W. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution**, Barking, v. 125, n. 1, p. 3-11, Jan. 2003.