

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS- AGRONOMIA

Byrsonima basiloba como bioindicador de poluentes atmosféricos
simulados: mudanças morfoanatômicas e fisiológicas em resposta
ao fluoreto de potássio

Autor: Douglas Almeida Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

RIO VERDE - GO
Fevereiro – 2018

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS- AGRONOMIA

Byrsonima basiloba como bioindicador de poluentes atmosféricos
simulados: mudanças morfoanatômicas e fisiológicas em resposta
ao fluoreto de potássio

Autor: Douglas Almeida Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

Dissertação apresentada como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias –
Agronomia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências
Agrárias - Agronomia do Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia Goiano. – Campus Rio Verde -
Área de concentração Ciências Agrárias - Agronomia.

Rio Verde - GO
Fevereiro – 2018

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Rodrigues, Douglas Almeida

R696b Byrsonima basiloba como bioindicador de poluentes atmosféricos simulados: mudanças morfoanatômicas e fisiológicas em resposta ao fluoreto de potássio / Douglas Almeida Rodrigues; orientador Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho; co-orientador Fernanda dos Santos Farnese. -- Rio Verde, 2018.
41 p.

Dissertação (Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia) -- Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, 2018.

1. Anatomia. 2. fotossíntese. 3. fotorrespiração. 4. respiração. 5. flúor. I. Carvalho Vasconcelos Filho, Sebastião , orient. II. dos Santos Farnese, Fernanda , co-orient. III. Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA

Byrsonima basiloba como bioindicador de poluentes atmosféricos
simulados: mudanças morfoanatômicas e fisiológicas em resposta
ao fluoreto de potássio

Autor: Douglas Almeida Rodrigues
Orientador: Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias-Agronomia

APROVADO em 5 de fevereiro de 2018.

Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho
(Orientador)

Leandro Carlos
Avaliador Interno
(Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde)

Jaqueline Martins Vasconcelos
Avaliadora externa
(Universidade Federal de Rondônia)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e ensinamento.

A Virgem de Guadalupe, por me guardar em seu manto sagrado e me orientar em todas as decisões.

Aos meus pais, Vilma e Odailton, por sempre estarem presentes em toda a minha vida, desde a paciência de ensinar a ler e escrever até aqui na Pós-Graduação.

A meu irmão, Arthur Almeida Rodrigues, pela parceria e amizade em todos os projetos realizados desde a iniciação científica.

Ao professor, Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho, por estar sempre presente na elaboração e execução do projeto.

A minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Fernanda Farnese, pelo comprometimento em nos ajudar nas avaliações fisiológicas e também na melhoria do trabalho.

A Caroline Muller pela grande parceria e dedicação em todo o trabalho.

Aos colegas do laboratório de Anatomia Vegetal, Larissa e Eduardo.

À banca de avaliação: Prof.^a Dr.^a Jaqueline Martins Vasconcelos (membro externo - IF Goiano – Campus Rio Verde) e Prof. Dr. Leandro Carlos (membro interno – IF Goiano – Campus Rio Verde).

Ao IF Goiano/Campus Rio Verde, GO e ao PPGCA - Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Douglas Almeida Rodrigues, filho de Odailton Rodrigues Ferreira e Vilma de Almeida Couto Rodrigues, nasceu no município de Rio Verde, GO, no dia 13 de junho de 1993.

Em janeiro de 2011, ingressou-se na graduação em Engenharia Ambiental na Universidade de Rio Verde, graduando-se em dezembro de 2015.

Em março do ano de 2016, passou a fazer parte do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, pelo IF Goiano/Campus Rio Verde, a nível de mestrado, submetendo-se à defesa da dissertação, requisito indispensável para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias - Agronomia, em fevereiro de 2018.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
OBJETIVOS.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE CULTIVO E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	19
2.2. SINTOMAS FOLIARES VISÍVEIS	19
2.3. AVALIAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i>	20
2.4. TROCAS GASOSAS	20
2.5. RESPIRAÇÃO NOTURNA E RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL.....	21
2.6. DETERMINAÇÃO DA TAXA FOTORRESPIRATÓRIA.....	21
2.7. CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA FOLIAR.....	21
2.8. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	22
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
3. RESULTADOS	22
3.1. SINTOMAS MORFOLÓGICOS/VISÍVEIS.....	22
3.2. ALTERAÇÕES ANATÔMICAS.....	23
3.3. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	25
3.4. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i>	26
3.5. TROCAS GASOSAS.....	27
3.6. RESPIRAÇÃO E FOTORRESPIRAÇÃO.....	28
4. DISCUSSÃO.....	30
5. CONCLUSÃO.....	33
AGRADECIMENTOS.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do flúor na estrutura foliar de <i>Byrsonima basiloba</i> após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio (KF) em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L ⁻¹).....	18
Tabela 2. Eficiência de operação do fotossistema II (Φ_{PSII}), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), fluorescência mínima (F_0), dissipação não fotoquímica (NPQ), quenching não fotoquímico (qN), rendimento quântico da assimilação de CO ₂ (Φ_{CO_2}) e relação da eficiência de operação do fotossistema II (Φ_{PSII}) e rendimento quântico da assimilação de CO ₂ (Φ_{CO_2}) em plantas de <i>Byrsonima basiloba</i> após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L ⁻¹).....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sintomas visíveis nas folhas de *Byrsonima basiloba*, destacadas por setas pretas, após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações: (A1-A2) 0 mg L⁻¹ (controle). (B1-B2) 10 mg L⁻¹. (C1-C2) 20 mg L⁻¹. (D1-D1) 30 mg L⁻¹. Barra de escala 2 cm.....17
- Figura 2.** Alterações anatômicas causadas por fluoreto de potássio (KF) nas folhas de *Byrsonima basiloba*. (A) tratamento controle, (B) 10 mg L⁻¹, (C) 20 mg L⁻¹, (D, E-F) 30 mg L⁻¹. (Ad ep) epiderme adaxial. (Ab ep) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas amarelas indicam aumento de espaços intracelulares. Barra de escala 200 μm.....18
- Figura 3.** Acúmulo de compostos fenólicos marcado na cor preta após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em folhas de *Byrsonima basiloba*. (A) tratamento controle, (B) 10 mg L⁻¹, (C) 20 mg L⁻¹ e (D) 30 mg L⁻¹. (Ad ep) epiderme adaxial. (Ab ep) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliádico. (SP) parênquima esponjoso. Barra de escala 200 μm.....20
- Figura 4.** Trocas gasosas em plantas de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹). (A) - Taxa fotossintética líquida (A), (B) - relação da taxa fotossintética entre a concentração interna de CO₂ (A/C_i), (C) - relação entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a) e (D) - condutância estomática (g_s). Barras corresponde à média ± EP (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas à 5% (*) e 1% (**) de probabilidade, em relação ao controle, pelo teste de Dunnett.....22
- Figura 5.** Respiração e fotorrespiração de plantas de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹). (A) - Taxa de fotorrespiração (R_p), (B) - Fluxo de elétrons utilizado para carboxilação (ETR_c) e (C) - oxigenação (ETR_o) pela rubisco, (D) - Razão ETR_c/ETR_o, (E) - respiração mitocondrial (R_D) e (F) - respiração noturna (R_N) em plantas de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹). Barras corresponde à média ± EP (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas à 5% (*) e 1% (**) de probabilidade, em relação ao controle, pelo teste de Dunnett.....23

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACOES E UNIDADES

SÍMBOLO	SIGNIFICADO	UNIDADE DE MEDIDA
KF	Fluoreto de potássio	mg L ⁻¹
ROS	Espécie reativa de oxigênio	-
S	Sul	-
W	Oeste	-
CaF ₂	Fluoreto de Cálcio	-
Ca	Cálcio	-
K	Potássio	-
Mg	Magnésio	-
N	Nitrogênio	-
m	Metro	-
L	Litro	-
P	Fósforo	-
M	Molar	-
pH	Potencial Hidrogeniônico	-
HCl	Ácido clorídrico	-
NaOH	Hidróxido de Sódio	-
µm	Micrômetro	-
%	Porcentagem	-
cm	Centímetro	-
F ₀	Fluorescência mínima	-
F _m	Fluorescência máxima	-
s	Segundo	-
PSII	Fotossistema II	-
qN	Quenching não fotoquímico	-
ETR	Taxa de transporte de elétrons	-
NPQ	Coefficiente de extinção não-fotoquímico	-
ΔF/F _m '	Rendimento quântico efetivo do FSII quando os centros de reação estão	-
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa	-
ΦCO ₂	Rendimento quântico de assimilação de dióxido de carbono	-
ΦPSII	Eficiência de operação do fotossistema II	-
IRGA	Analizador de gases no infravermelho	-
FSII	Fotossistema II	-
A	Taxa fotossintética	-
gs	Condutância estomática	-

E	Taxa de transpiração	-
A/C_i	Relação da taxa fotossintética entre a concentração interna de CO_2	-
C_i/C_a	Razão entre a concentração interna e externa de dióxido de carbono	-
ETR/A	Relação entre a taxa aparente de transporte de elétrons e a assimilação de CO_2	-
R_N	Respiração noturna	-
R_D	Respiração mitocondrial	-
Adep	Epiderme adaxial	μm
Abep	Epiderme abaxial	μm
PP	Parênquima paliçádico	μm
SP	Parênquima esponjoso	μm
Fi	Fibra	μm
Xy	Xilema	μm
Ph	Floema	μm
FP	Parênquima fundamental	μm
$^{\circ}C$	Temperatura em graus Celsius	Graus Celsius
CV	Coefficiente de Variação	%

RESUMO

RODRIGUES, DOUGLAS. ALMEIDA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Fevereiro de 2018. ***Byrsonima basiloba* como bioindicador de poluentes atmosféricos simulados: mudanças morfoanatômicas e fisiológicas em resposta ao fluoreto de potássio.** Orientador: Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho. Coorientador: Dr.^a Fernanda Farnese.

O flúor é um poluente lançado em grandes proporções na atmosfera por fábricas de tijolos, cerâmicas, minerais fosfatados e alumínio. Quando comparado à outros poluentes atmosféricos, é o composto de maior fitotoxicidade, causando danos em diferentes espécies arbóreas. A espécie *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae) é uma árvore frutífera com grande distribuição em regiões antropizadas e alto potencial para bioindicação. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do flúor, via chuva simulada, através de respostas morfoanatômicas e fisiológicas nas folhas de *Byrsonima basiloba*, a fim de avaliar o potencial bioindicador da espécie ao KF. Plantas jovens com aproximadamente 90 dias foram selecionadas a partir da padronização da altura (~25 cm) e transferidas individualmente para vasos contendo 5 litros de substrato composto por areia lavada, vermiculita e bioplant[®] (1:1:1). As plantas foram submetidas diariamente ao KF, através de chuva simulada nas concentrações de 0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹ de KF, por um período de 30 dias. *Byrsonima basiloba* apresentou formação de pigmentos avermelhados na superfície foliar sentido ápice a região mediana da folha, e acúmulo de compostos fenólicos e reprogramação do metabolismo vegetal. Enquanto o poluente impactou negativamente os parâmetros relacionados à fotossíntese e fotorrespiração, observou-se aumento na respiração, provavelmente com o intuito de fornecer energia e esqueletos de carbono para a planta. Os resultados obtidos permitiram avançar no conhecimento das respostas das plantas ao fluoreto de potássio, além de demonstrarem o potencial de *Byrsonima basiloba* para a bioindicação desse poluente.

Palavras-chave: Anatomia, fotossíntese, fotorrespiração, respiração, flúor

ABSTRACT

RODRIGUES, DOUGLAS. ALMEIDA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, February 2018. ***Byrsonima basiloba* as a bioindicator of simulated air pollutants: morphoanatomical and physiological changes in response to potassium fluoride.** Advisor: DSc. Sebastião Vasconcelos Carvalho Filho. Co-advisor: DSc. Fernanda Farnese.

Fluoride is released in large amounts in the atmosphere by brick, ceramic, phosphate mineral and aluminum industries. When compared to other air pollutants, it shows the highest phytotoxicity, causing damage to different tree species. *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae) is a fruit tree widely distributed in anthropic regions, displaying high potential as a bioindicator. In this context, the aim of the present study was to investigate fluoride effects, by means of simulated rainfall, by evaluating morphological and physiological responses of *Byrsonima basiloba* leaves, in order to evaluate the bioindicator potential of this species to potassium fluoride (KF). Young plants, approximately 90 days old, were selected through height standardization (~ 25 cm) and individually transferred to pots containing 5 liters of a substrate composed of washed sand, vermiculite and bioplant® (1:1:1). The plants were daily submitted to KF exposure, by means of simulated rain, at 0, 10, 20 and 30 mg L⁻¹ KF, for 30 days. *Byrsonima basiloba* revealed the production of reddish pigments on the leaf surface, from the apex to the median region, as well as accumulation of phenolic compounds and reprogramming of plant metabolism. While the pollutant negatively impacted parameters related to photosynthesis and photorespiration, an increase in respiration was observed, probably with the purpose of supplying energy and carbon skeletons to the plants. These results allow for advancements in the knowledge on plants responses to KF, in addition to demonstrating *Byrsonima basiloba* potential as a bioindicator

regarding this atmospheric pollutant.

Keywords: Anatomy; photosynthesis; photorespiration; respiration; fluoride.

INTRODUÇÃO

O Cerrado abrange uma área de aproximadamente 2 milhões km² quadrados do Brasil, incluindo todo o estado de Goiás e Tocantins, quase todo o Mato Grosso do Sul, oeste de Minas Gerais e da Bahia, leste e sul do Mato Grosso e sul dos estados do Maranhão e Piauí (Klink e Machado, 2005). É o segundo maior domínio morfoclimático brasileiro, superado em área apenas pela Amazônia. Ocupa cerca de 21% do território nacional e é por muitos estudiosos, considerado a fronteira agrícola mundial a ser desbravada (Borlaug, 2002), no entanto, o avanço de monoculturas como é o caso da cana-de-açúcar e da soja, principalmente nas regiões Nordeste e Centro Oeste, estão banindo com este ecossistema tão peculiar e rico em plantas frutíferas, algumas medicinais, com alto potencial nutricional, e com sabores intrínsecos e inconfundíveis.

Segundo Myers et al. (2000), trata-se de um dos principais ecossistemas tropicais da Terra, sendo um dos centros prioritários hotspots para a preservação da biodiversidade do planeta. Diversas formas de aproveitamento de frutos do Cerrado fazem parte de costumes e atividades culturais de algumas comunidades, entretanto, se limitam a produção de conservas, doces, sorvetes e alguns petiscos (Avidos e Ferreira, 2000).

Nos últimos quarenta anos, o Cerrado tem sofrido um aumento demográfico expressivo e a vegetação nativa vem sendo substituída por monoculturas como a soja e a cana-de-açúcar, assim como pastagens. A ocupação humana e a rápida expansão das atividades agropecuárias transformaram o Cerrado em um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo (Myers et al., 2000). Desse modo, o cerrado transformou-se, havendo compactação do solo, erosão, assoreamento de rios, contaminação da água subterrânea, e perda de biodiversidade, com reflexos sobre todo o ecossistema. As espécies de plantas e animais nativos sobreviventes e que ainda persistem na região

antropizada tendem a desaparecer por falta de preocupação com sua preservação (Cunha, 2008).

As principais ameaças à biodiversidade no Cerrado nos últimos tempos estão centradas na expansão da agricultura e da pecuária. A agropecuária expandiu-se com uso intensivo de agrotóxicos e fertilizantes, irrigação sem controle, pisoteio excessivo de animais, monocultura e cultura em grande escala (Cunha et al., 2008).

A mineração também é outra atividade predominante do bioma cerrado com inúmeras consequências.

Comparado com outros poluentes atmosféricos, o flúor é o composto de maior fitotoxicidade, pois pode causar injúrias em espécies suscetíveis em concentrações atmosféricas 10 a 1.000 vezes menor (menos que 1mg l^{-1}) que outros poluentes, como o ozônio, o dióxido de enxofre e os óxidos de nitrogênio (Weinstein, 1977), em solução o flúor é absorvido pela superfície foliar, sendo acumulado e provocando injúrias. Entretanto, algumas espécies vegetais são capazes de acumular grandes quantidades de flúor em suas folhas sem apresentar injúrias visuais (Arndt; Flores; Weinstein, 1995).

O Cerrado apresenta um grande potencial a ser estudado, tendo em vista plantas hiperacumuladoras. As plantas do Cerrado possuem características comuns tais como: elevada acidez, toxidez de alumínio, alta deficiência de nutrientes, alta capacidade de fixação de fósforo e baixa capacidade de troca de cátions (Chaves, 2001). Essas características diferenciadas apontam para o potencial de fitorremediação de plantas nativas do cerrado, constituído de plantas rústicas que tem uma biologia diferenciada, adaptada a condições edáfico-climáticas em que outras plantas não sobreviveriam assim um dos maiores problemas da fitorremediação atualmente é a falta de estudos que apresentem plantas nativas que poderiam ser utilizadas nesse processo (Haridasan, 1994).

Segundo Lamego e Vidal (2007), características favoráveis para a utilização de plantas como fitorremediação incluem crescimento rápido, elevada produção de biomassa, competitividade, vigor e tolerância à poluição. Devido à grande diversidade das formas vegetais existentes no Cerrado e as estratégias ecofisiológicas adotadas por algumas espécies nesse bioma, é de se esperar que o uso das plantas desse domínio morfoclimático como potencial fitorremediadoras esteja sendo subestimado.

O muricizeiro (*Byrsonima basiloba*) é uma espécie arbustiva, nativa dos Cerrados do Brasil Central, sendo particularmente frequente na região sul de Goiás. Pode chegar a dez metros de altura, pertence à família Malpighiaceae, sendo esta

representada por 60 gêneros e 1.200 espécies, com distribuição tropical e subtropical (Souza e Lorenzi, 2008). Sua floração acontece por quase todo o ano, predominantemente, porém, durante o verão. Em consequência, a maturação dos frutos também acontece por quase todo o ano, porém, com maior intensidade em abril-junho. Quando os frutos começam a cair espontaneamente é feita a colheita manual diretamente da árvore, ou recolhe-se no chão (Lorenzi, 2008).

Byrsonima basiloba é útil para arborização urbana e pode ser empregada em plantios destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente. Seus frutos são avidamente consumidos por várias espécies da fauna (Lorenzi, 2008). Por possuírem flores vistosas, frutos que atraem aves e pelo seu rápido crescimento, espécies de *Byrsonima* têm grande potencial ornamental e na recuperação de áreas degradadas (Anderson, 1981).

O conhecimento dos aspectos ecológicos, sociais e econômicos permite um melhor entendimento da vegetação, indicando o seu papel nas cadeias alimentares. Muitos pesquisadores a consideram como de grande importância silvicultural. É importante saber como as plantas nativas respondem a heterogeneidade ambiental por meio de ajuste morfológico e/ou fisiológico ao ambiente sendo de fundamental importância para que programas de manejo, gestão e conservação de reservas ecológicas possam ser elaborados (Rocha Filho e Lomônaco, 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, W.R. Malpighiaceae. Mem. New York Botan. G. 32:21-306, 1981.
- ARNDT, U.; FLORES, F. & WEINSTEIN, L. **Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.
- AVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. Frutos do cerrado: preservação gera muitos frutos. **Biotecnologia ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 15, p. 36-41, 2000.
- BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). Global warming and other eco-myths. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. p. 29-60, 2002.
- CHAVES, L. J. Melhoramento e conservação de espécies frutíferas do cerrado. Disponível em: <<http://www.sbmp.org.br/cbmp.2001/palestras/palestra.htm>>. Acesso em: out. 2016.
- CUNHA, N. R. S.; LIMA, J. E.; GOMES, M. F. M.; BRAGA, M. J. A intensidade da exploração agropecuária como indicador da degradação ambiental na região dos Cerrados, Brasil. Piracicaba/SP. RER, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 291-323, 2008.
- HARIDASAN, M. Solos do Distrito Federal. In: PINTO, M. N. (Org.). Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. Brasília: Ed. da UnB/SEMATEC. 321-344p, 1994.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* 19(3): 707- 713, 2005.
- LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente*, 17: 9-18, 2007.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. v.1. 384p, 2008.
- ROCHA FILHO, L.C. da.; LOMONACO, C. Variações fenotípicas em subpopulações de *Davilla elliptica* A. St.-Hil. (Dilleniaceae) e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. **Acta Botânica Brasílica**. v. 20, n. 3, p.719-725, 2006.

SOUZA, V. C. & H. LORENZI. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II: 1-704. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008.

WEINSTEIN, L. H. **Fluoride and plant life.** Journal of Occupational and Environmental Medicine, v. 19, n. 1, p. 49-78, 1977.

OBJETIVO

Objetivou-se é avaliar as alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas de *Byrsonima basiloba* exposta a chuva simulada de solução líquida de fluoreto de potássio (KF).

1. Introdução

A poluição ambiental, antes mais restrita à países industrializados, atualmente possui um caráter global. As consequências para a saúde e meio ambiente associadas à exposição a poluição do ar são numerosas, observadas em todo o mundo, mesmo em áreas com baixos níveis de exposição (World Health Organization, 2016). Dentre os poluentes atmosféricos, o flúor apresenta alta toxidez, sendo considerado um dos mais importantes contaminantes em todo o mundo (Panda, 2015), e é comumente lançado na atmosfera na forma de fluoreto de potássio (KF), como resultado da atividade de fábricas de tijolos, cerâmicas, minerais fosfatados e alumínio (Divan Junior et al., 2008; Agalakova e Gusev, 2012). O KF é liberado na atmosfera tanto na forma gasosa quanto na forma líquida, podendo desencadear uma série de danos para seres humanos, como dores abdominais e comprometimento dos rins, e também para a biodiversidade local. No caso das plantas, por exemplo, esse poluente pode ser absorvido facilmente via estômatos e cutícula ou por toda superfície foliar, se acumulando nas folhas ou em outros órgãos vegetais (Chaves et al., 2002; Sant'Anna-Santos et al., 2014).

Apesar de diferentes países apresentarem legislações sobre a liberação de KF na atmosfera, a emissão desses compostos continua a ser um problema que coloca em risco tanto a saúde humana quanto a conservação da biodiversidade (Walna et al., 2014). Nesse sentido, existe uma crescente necessidade de monitorar a poluição atmosférica, seja por meio de metodologias tradicionais, como o uso de amostras de ar passiva e ativa, ou pelo emprego de bioindicadores (Areington et al., 2017).

De fato, a utilização de espécies suscetíveis aos poluentes atmosféricos é comprovadamente uma metodologia adequada e de baixo custo para detecção de poluentes atmosféricos, além de apresentar uma série de vantagens em relação a outras metodologias de monitoramento, como o fato de fornecer informações sobre a biodisponibilidade do poluente (Klumpp et al., 2001). Dentre os vários organismos que podem ser utilizadas como bioindicadores, as plantas são particularmente interessantes, devido a sua natureza sésil, alta sensibilidade e fácil amostragem e interpretação dos dados (Nouchi, 2002).

A fim de aumentar a confiabilidade no emprego de espécies bioindicadoras, bem como para padronizar as metodologias utilizadas e ampliar o número de espécies que podem ser utilizadas com esse objetivo, é essencial o desenvolvimento de estudos com o intuito de avaliar os efeitos dos poluentes em espécies suscetíveis (Weinstein et al.,

2003). De fato, compreender as respostas das plantas aos poluentes atmosféricos é fundamental para o desenvolvimento de bioindicadores que possam ser usados como parte de programas de conservação (Areington et al., 2017).

A principal forma de absorção do flúor pelas plantas ocorre através das folhas, em estado gasoso na atmosfera, é absorvido principalmente através dos estômatos e cutícula (Sant'Anna-Santos et al., 2014) e, em solução aquosa o flúor é incorporado por toda a superfície foliar (Miller, 1993; Chaves et al., 2002). A exposição das plantas nas concentrações de 10, 20 e 30 mg L⁻¹ de KF resulta em alterações que se manifestam nos níveis morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos. Uma vez que tenha penetrado nos tecidos, o KF é acumulado principalmente no mesófilo, provocando deformações nas células seguido do colapso dos tecidos parenquimáticos (Sant'Anna-Santos et al., 2006; Sant'Anna-Santos et al., 2012; Rodrigues et al., 2017) e posterior efeito visual com produção de manchas avermelhadas na superfície foliar (Paula et al., 2005) ou formação de necroses apicais e marginais (Zouari et al., 2014). Esse contaminante pode, ainda, alterar a composição de pigmentos fotossintéticos (Rodriguez et al., 2015), a eficiência quântica do fotossistema II (Rodrigues et al., 2017) e gerar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Yang et al., 2015).

O Brasil é reconhecido como sendo um dos países com a maior biodiversidade vegetal em todo o mundo (BFG, 2015), apresentando plantas nativas com grande potencial para utilização em processos de bioindicação. A espécie *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae), por exemplo, possui ampla distribuição no Cerrado brasileiro (Medeiros, 2011; Lorenzi, 2008) e, além de ser utilizada na arborização urbana, produz frutos economicamente importantes, os quais podem ser consumidos *in natura* ou a polpa pode ser utilizada na preparação de sucos, sorvetes, vinhos e licores (Lorenzi, 2008). Na família Malpighiaceae outras espécies, como *Byrsonima crassifolia*, já são utilizadas em programas de biomonitoramento ambiental em resposta ao flúor em regiões industriais (Paula et al., 2005). Em relação a *B. basiloba*, no entanto, ainda não existem estudos sobre o efeito do flúor sobre a morfologia, anatomia e fisiologia da planta, o que impossibilita a sua utilização como espécie bioindicadora, apesar do seu potencial para indicar a qualidade do ar tanto em áreas urbanas como em áreas de conservação. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do flúor, via chuva simulada com fluoreto de potássio, nas respostas morfoanatômicas e fisiológicas em folhas de *B. basiloba*, a fim de avaliar o potencial bioindicador da espécie ao KF.

2. Material e Métodos

2.1. Material Vegetal, Condições de Cultivo e Aplicação dos Tratamentos

Sementes de *Byrsonima basiloba* foram obtidas a partir de frutos coletados de 10 plantas adultas em plena produção, localizadas em Montes Claros, Goiás, Brasil (latitude 16° 06' 20'' S – longitude 51° 17' 11'' W, e altitude de 592 m). Os espécimes foram depositados no Herbário do Instituto Federal de Goiano (IF Goiano), Campus Rio Verde (n° 630/2017). As sementes foram inicialmente tratadas com fungicida Vitavax®-Thiram (30%), escarificadas para quebra de dormência e posteriormente semeadas em canteiros contendo areia lavada como substrato. Aproximadamente 60 dias após a emergência as plântulas foram selecionadas a partir da padronização da altura (~25 cm) e transplantadas individualmente para vasos de 5 L contendo substrato composto por vermiculita, areia lavada e Bioplant® (1:1:1) contendo 8,6 N; 0,2 P; 0,3 K; 1,3 Ca e 2,9 Mg em g Kg⁻¹. O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizado no IFGoiano (latitude 17° 48' 16'' S, longitude 50° 54' 19'' W e altitude de 753 m).

Após 10 dias de aclimação, as plantas foram expostas à aplicação de solução líquida de fluoreto de potássio (KF, pH 6,0) nas concentrações de 0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹ durante 30 dias consecutivos, simulando a concentração de fluoreto em áreas poluídas (Smith e Hodge 1979; Chaves et al., 2002). Os valores de pH das soluções foram ajustados com solução de HCl (2,0 M) e NaOH (2,0 M). A aplicação do flúor ocorreu mediante chuva simulada realizada com borrifadores manuais, com aplicação de 60 mL diários por planta, volume baseado na evapotranspiração média de plantas. As plantas controle foram irrigadas com água ultrapura. No final do período de aplicação, as avaliações visuais, morfoanatômicas e fisiológicas foram realizadas.

O experimento seguiu em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (concentrações de KF) e 4 repetições, cada repetição composta de um vaso contendo 1 planta (4 plantas por tratamento).

2.2. Sintomas foliares visíveis

Durante o experimento, as folhas completamente expandidas foram fotografadas com câmera semiprofissional (Cyber-Shot SONY HX100V) para registrar os sintomas visíveis na superfície foliar. Para a confecção da prancha foi utilizado a folha que

melhor representasse o tratamento com KF.

2.3. Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

As variáveis de fluorescência da clorofila foram avaliadas com um fluorômetro de câmara foliar (modelo 6400-40, Li-cor, Nebraska, EUA) acoplado ao analisador portátil de gases infravermelhos (IRGA, modelo Li-6400xt, Li-cor, Nebraska, EUA). A análise da fluorescência mínima (F_0) foi realizada antes do amanhecer através da excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade ($0,03 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para obter a fluorescência m\u00e1xima (F_m) foram aplicados pulsos de saturação de aproximadamente $8.000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 0,8s. A partir desses valores foi poss\u00edvel determinar o rendimento qu\u00e2ntico fotoqu\u00edmico potencial do fotossistema II (PSII: $F_v/F_m = [F_m - F_0]/F_m$) (Kitajima e Butler, 1975). Ap\u00f3s exposi\u00e7\u00e3o das folhas \u00e0 luz, foram obtidas a fluoresc\u00eancia m\u00ednima (F_0') calculada pela forma $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0/F_m) + (F_0/F_m)']$ (Oxborough e Baker 1997). Posteriormente foi calculado o quenching n\u00e3o fotoqu\u00edmico ($q_N = [F_m - F_m'] / [F_m - F_0]$) (Lichtenthaler et al., 2005) o coeficiente de extin\u00e7\u00e3o n\u00e3o-fotoqu\u00edmico ($NPQ = [F_m - F_m'] / F_m'$) (Bilger et al., 1995), em que PAR representa a radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nas folhas, 0,5 \u00e9 a fra\u00e7\u00e3o de energia de excita\u00e7\u00e3o direcionada ao PSII (Laisk e Loreto, 1996) e 0,84 a absorv\u00eancia foliar. O rendimento qu\u00e2ntico da assimila\u00e7\u00e3o de CO_2 (ΦCO_2) e a rela\u00e7\u00e3o da efici\u00eancia de opera\u00e7\u00e3o do fotossistema II (ΦPSII) foram calculados conforme metodologia proposta por (Maxwell e Johnson, 2000).

2.4. Trocas gasosas

As trocas de g\u00e1s das plantas de *B. basiloba* foram medidas usando o analisador de g\u00e1s infravermelho (IRGA, modelo Li-6400xt, Li-cor, Nebraska, EUA) na mesma folha utilizada para medi\u00e7\u00f5es de fluoresc\u00eancia. Foram registradas as taxas fotossint\u00e9ticas (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e rela\u00e7\u00e3o entre a concentra\u00e7\u00e3o interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) determinadas em folhas totalmente expandidas em sistema aberto, sob luz saturante ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e $400 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar. As avalia\u00e7\u00f5es foram realizadas entre 9:00 e 11:00 da manh\u00e3, sob radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa constante (PAR, $1000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e

concentração de CO₂ (~ 415 μmol mol⁻¹), temperatura (~ 25,5 ° C) e umidade relativa (~ 74%) ambientes.

2.5. *Respiração noturna e respiração mitocondrial*

A respiração noturna (R_N) foi avaliada antes do amanhecer utilizando-se analisador de gases infravermelho mencionado acima. A respiração mitocondrial durante o dia (R_D), foi estimada a partir da R_N (Bai et al., 2008). R_D foi estimada à diferentes temperaturas usando o Q₁₀ (Larcher, 1983). Da seguinte forma: $RD = RN Q_{10}^{(T_d - T_n)/10}$ (Q₁₀ = 2,2), onde T_n é a temperatura da folha em que a RN foi medida e T_d é a temperatura da folha em que RD foi calculado.

2.6. *Determinação da taxa fotorrespiratória*

A taxa de fotorrespiração (R_p), o fluxo de elétrons utilizado para carboxilação (ETR_c), oxigenação (ETR_o) pela Rubisco (ribulose-1 5-bisphosphate carboxilase/oxigenase) e razão ETR_c/ETR_o foram estimados a partir dos dados combinados de troca gasosa e fluorescência da clorofila *a* de acordo com Epron et al. (1993) e Valentini et al. (1995). Do seguinte modo: $R_p = 1/12[ETR_T - 4(A + R_D)]$; $ETR_c = 1/3[ETR_T + 8(A + R_D)]$; $ETR_o = 2/3[ETR_T + 4(A + R_D)]$.

2.7. *Caracterização morfoanatômica foliar*

Para as análises morfoanatômicas e de micromorfometria, foram coletadas amostras da região do meio da última folha totalmente expandida das plantas de todos os tratamentos (n = 6) de *B. basiloba*. Inicialmente as amostras foram fixadas em Karnovsky (1965), por 24 horas. Após o período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato e desidratado em série etílica crescente, pré-infiltrado e infiltrado em historesina (Leica, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram seccionadas transversalmente a 5 μm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen scientific, China) e os cortes corados com azul de toluidina - coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien et al., 1964). As imagens obtidas foram fotografadas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão), acoplado com câmera DP-72 utilizando opção de

campo claro. Foram realizadas observações morfoanatômicas da epiderme das faces adaxial e abaxial, dos parênquimas paliçádico e esponjoso e do mesofilo. As medidas de micromorfometria foram obtidas a partir das imagens capturadas usando o software ImageJ (Processamento e Análise de Imagem em Java, v. 1.47, EUA). Foram realizadas medições em dez observações por repetição para cada estrutura avaliada.

2.8. Identificação de compostos fenólicos

A detecção histoquímica de compostos fenólicos foi realizada na região mediana da última folha totalmente expandida de *B. basiloba*. Para a análise, fragmentos foliares foram fixados em solução de sulfato ferroso em formalina (Johansen, 1940; Jensen, 1962) e as imagens capturadas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão). Através das imagens obtidas foi realizado o cálculo da área marcada com compostos fenólicos através do teste histoquímico através da diferença de contraste, utilizando o software ImageJ (Processamento e Análise de Imagem em Java, v. 1.47, EUA).

2.9. Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos à análise de homogeneidade (Teste Levene) e normalidade dos erros (Teste Shapiro-Wilk), seguido da ANOVA e teste Dunnett ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo software ASSISTAT v. 7.7. (Silva et al., 2016).

3. Resultados

3.1. Sintomas morfológicos/visíveis

As folhas de *Byrsonima basiloba* não apresentaram danos durante o período experimental no tratamento de controle (Fig. 1A). Após a chuva simulada com fluoreto de potássio, observou-se que a partir da menor concentração de KF aplicada (10 mg L^{-1}) pequenas áreas manchadas entre as nervuras na coloração avermelhada sentido ápice foliar a região mediana da folha foram evidenciadas (Fig. 1B). Além disso, manchas avermelhadas e folhas quebradiças surgiram no ápice e bordas das folhas expostas a 20 e 30 mg L^{-1} KF nas faces adaxial e abaxial (Fig. 1C-D).

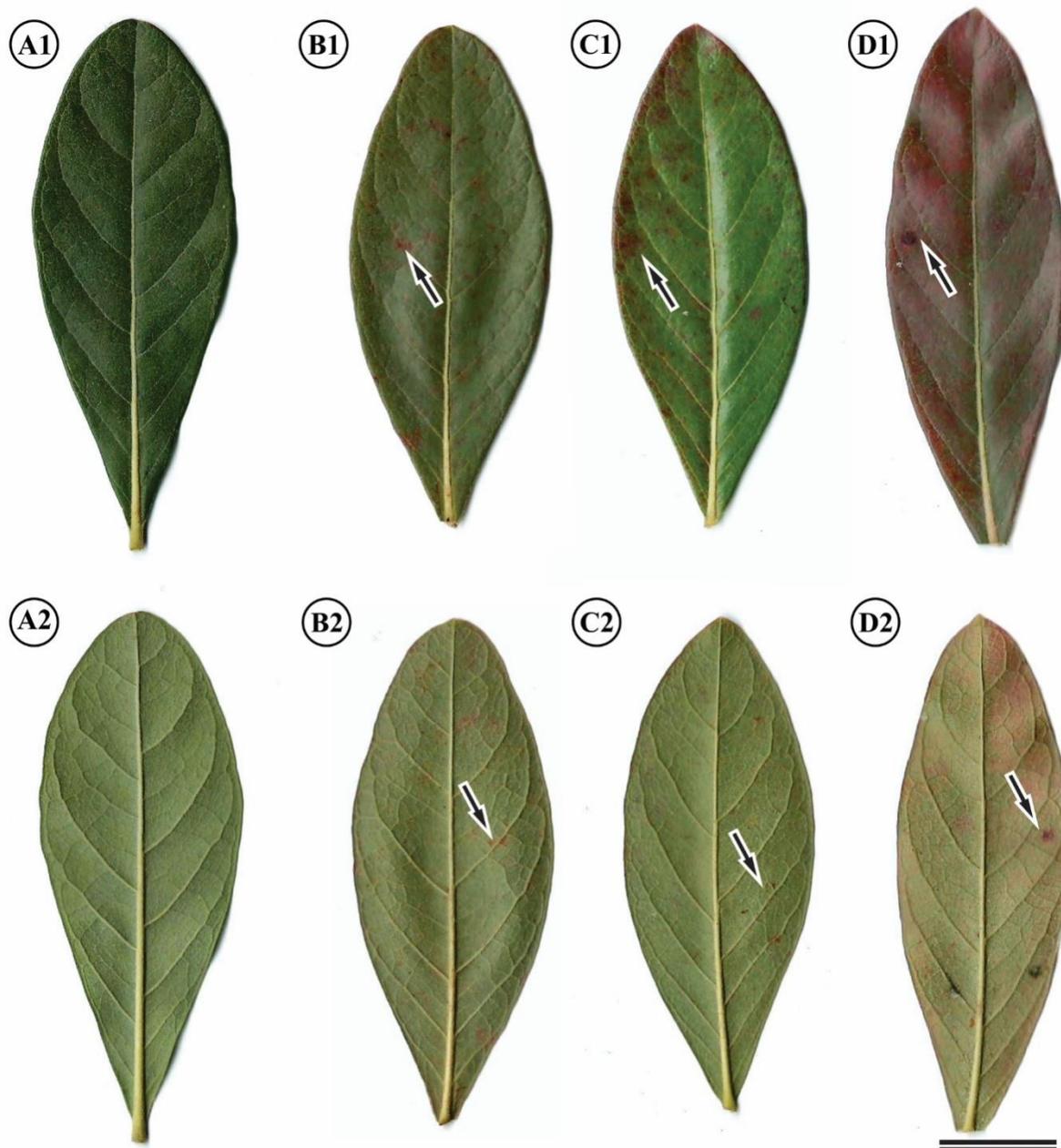


Fig. 1. Sintomas visíveis nas folhas de *Byrsonima basiloba*, destacadas por setas pretas, após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações: (A1-A2) 0 mg L⁻¹ (controle). (B1-B2) 10 mg L⁻¹. (C1-C2) 20 mg L⁻¹. (D1-D2) 30 mg L⁻¹. Barra de escala 2 cm.

3.2. Alterações anatômicas

A epiderme de *Byrsonima basiloba* é uniestratificada, sendo as células da face adaxial maiores que a abaxial de formato circular à retangular. O mesofilo é dorsiventral, formado por 3 camadas de células de parênquima paliçádico. O

parênquima paliçádico ocupa aproximadamente 50% da espessura do mesofilo. O parênquima esponjoso é formado por células compactas com poucos espaços intercelulares (Fig. 2A). A análise anatômica das folhas de *Byrsonima basiloba* nos tratamentos com KF evidenciaram poucas alterações nas células do mesofilo (Fig. 2). O fluoreto de potássio ocasionou expansão da epiderme adaxial e abaxial e aumento nos espaços intracelulares (Fig. 2B, C-D).

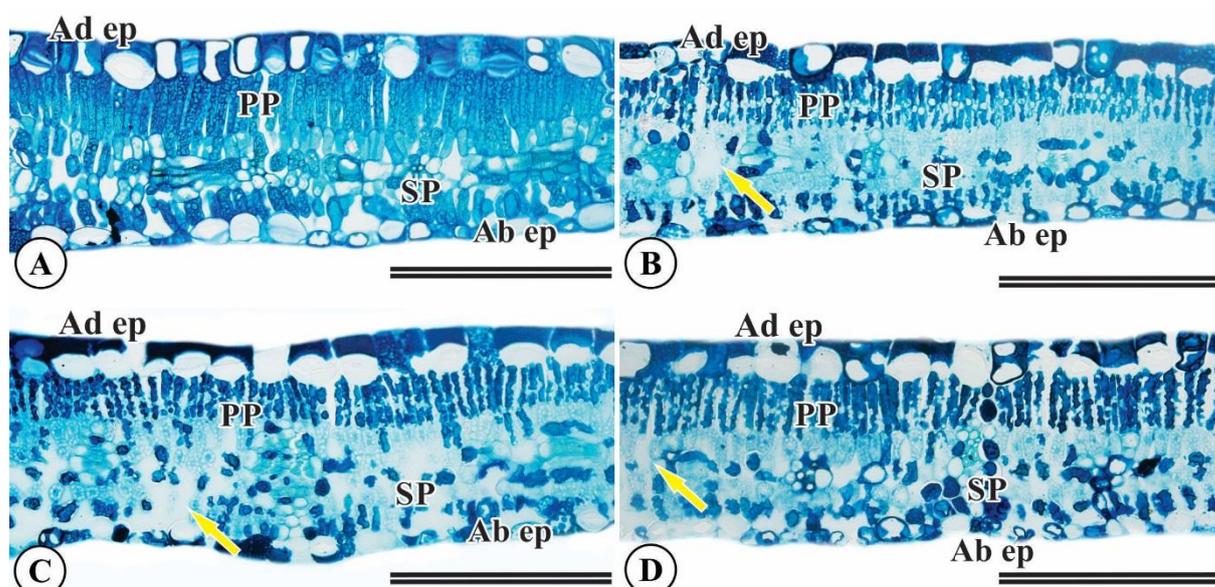


Fig. 2. Alterações anatômicas causadas por fluoreto de potássio (KF) nas folhas de *Byrsonima basiloba*. (A) tratamento controle, (B) 10 mg L⁻¹, (C) 20 mg L⁻¹, (D, E-F) 30 mg L⁻¹. (Ad ep) epiderme adaxial. (Ab ep) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas amarelas indicam aumento de espaços intracelulares. Barra de escala 200 μm.

Nas plantas expostas às maiores concentrações, 20 e 30 mg L⁻¹ de KF, houve aumento na espessura da epiderme adaxial e abaxial em 14,15 e 9,85%, respectivamente, em relação ao controle. O parênquima esponjoso apresentou decréscimo médio de 27,31% na concentração de 30 mg L⁻¹ KF (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do flúor na estrutura foliar de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio (KF) em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹).

KF (mg L ⁻¹)	Epiderme Adaxial (μm)	Epiderme Abaxial (μm)	Parênquima Paliçádico (μm)	Parênquima Esponjoso (μm)
0	12,93±0,09	6,76±0,14	20,61±1,14	33,78±0,83
10	12,63±0,32	6,65±0,09	19,15±2,24	28,31±1,18
20	14,68** ±33	6,65±0,22	21,05±2,05	30,68±1,65
30	14,76** ±39	7,42* ±0,06	14,22±0,51	24,56* ±1,23
F	**	*	NS	*

CV (%)	6,61	5,69	24,37	11,70
Média ± EP (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas à 5% (*) e 1% (**) de probabilidade, em relação ao controle, pelo teste de Dunnett. (NS) não significativo.				

3.3. Identificação de compostos fenólicos

A acumulação de compostos fenólicos pretos em células epidérmicas e parênquima paliçádico e esponjoso coradas com sulfato ferroso foi evidenciada com o aumento das doses de KF (Fig. 3). Após o cálculo da área marcada pelos compostos fenólicos, confirmou-se que os aumentos das doses de KF levaram à maior produção de compostos fenólicos (Fig. 3E).

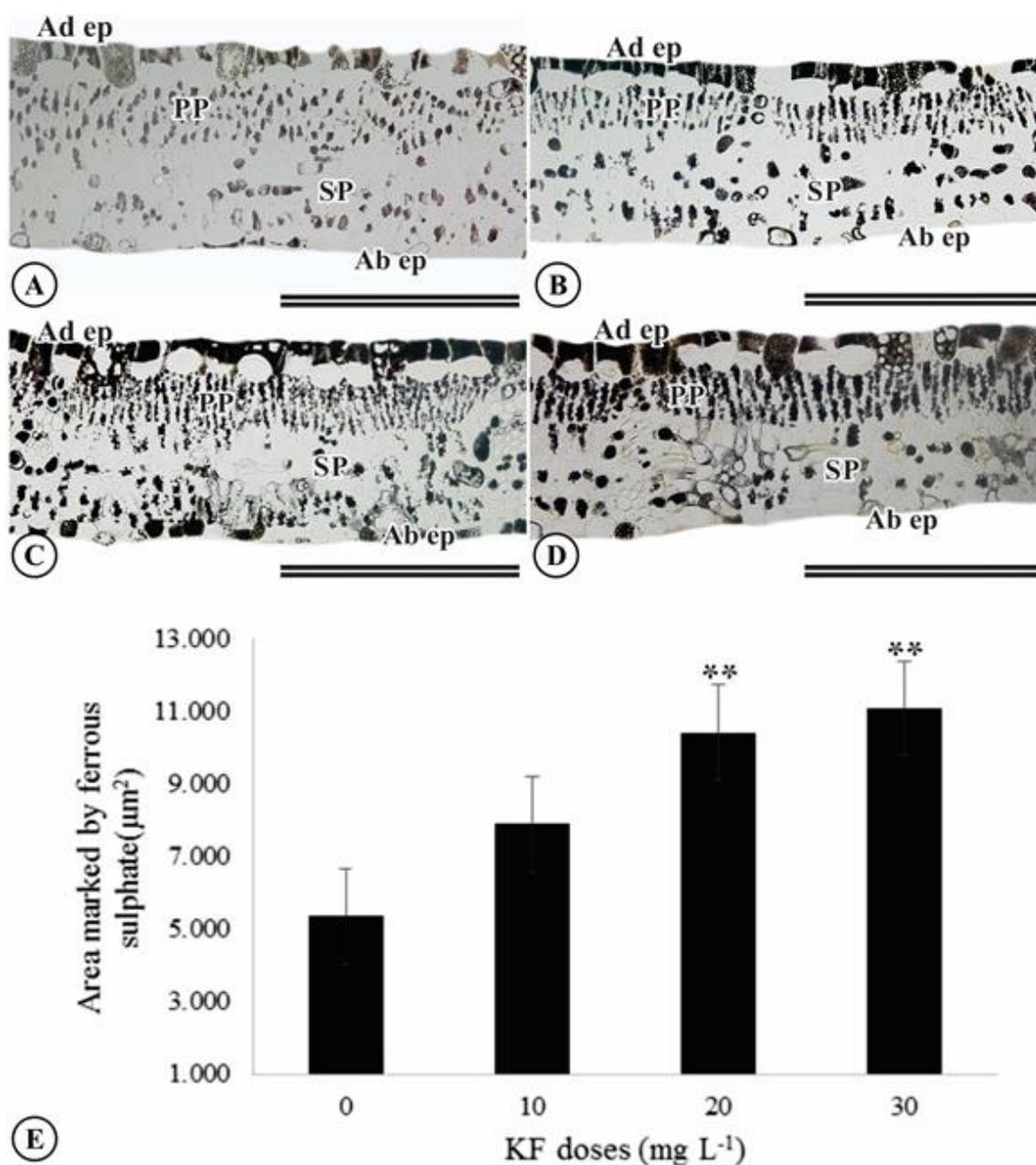


Fig. 3. Acúmulo de compostos fenólicos marcados em preto após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio nas folhas de *Basiloba de Byrsonima*. (A) tratamento de controle, (B) 10 mg L⁻¹, (C) 20 mg L⁻¹, (D) 30 mg L⁻¹ e (E) Área marcada com sulfato ferroso (μm²). (Ad ep) epiderme adaxial. (Ab ep) epiderme abaxial. (PP) parênquima de palisade. (SP) parênquima esponjoso. Barra de escala 200 μm. Os asteriscos indicam uma diferença significativa em 1% (**) de probabilidade. As barras representam a porcentagem de erro.

3.4. Fluorescência da clorofila *a*

O rendimento quântico da assimilação de CO₂ (ΦCO₂) e quenching não fotoquímico (qN) foram drasticamente reduzidos com o incremento da concentração de

KF (Tabela 2). Com a aplicação de 30 mg L⁻¹ de KF houve aumento de 8,14% na fluorescência mínima (F₀) e de 28,16% na dissipação não fotoquímica (NPQ), enquanto o rendimento quântico da assimilação de CO₂ (Φ_{CO2}) diminuiu em 56,23% (Tabela 2). O rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) e a eficiência de operação do fotossistema II (Φ_{PSII}) não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

Tabela 2. Eficiência de operação do fotossistema II (Φ_{PSII}), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), fluorescência mínima (F₀), dissipação não fotoquímica (NPQ), quenching não fotoquímico (qN), rendimento quântico da assimilação de CO₂ (Φ_{CO2}) e relação da eficiência de operação do fotossistema II (Φ_{PSII}) e rendimento quântico da assimilação de CO₂ (Φ_{CO2}) em plantas de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹).

KF (mg L ⁻¹)	Φ _{PSII}	F _v /F _m	F ₀	NPQ
0	0,20±0,004	0,78±0,01	514,65±9,64	0,71±0,04
10	0,19±0,016	0,77±0,01	527,16±8,07	0,92*±0,03
20	0,0,18±0,020	0,74±0,02	561,52*±8,79	0,90*±0,01
30	0,16±0,021	0,76±0,01	556,56*±0,84	0,91*±0,01
F	NS	NS	*	*
CV (%)	19,49	4,02	4,02	9,15
KF (mg L ⁻¹)	qN	Φ _{CO2}	Φ _{PSII} /Φ _{CO2}	
0	2,60±0,06	0,021±0,000	6,10±0,13	
10	2,34±0,01	0,018±0,001	7,04±0,27	
20	2,22*±0,04	0,017±0,001	5,37±0,30	
30	2,24*±0,10	0,013**±0,000	9,53**±0,35	
F	*	**	**	
CV (%)	7,50	8,57	11,75	

Média ± EP (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas à 5% (*) e 1% (**) de probabilidade, em relação ao controle, pelo teste de Dunnett. (NS) não significativo.

3.5. Trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas apresentaram danos significativos do KF nas plantas de *B. basiloba* (Fig. 5). Com o incremento das doses de KF houve queda na assimilação líquida de carbono com redução de até 62% na maior dose (Fig. 5A). A redução fotossintética foi acompanhada pela diminuição na eficiência instantânea de carboxilação e condutância estomática com o incremento das doses de KF (Fig. 5B e D). A relação C_i/C_a não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 5C). (mg L⁻¹)

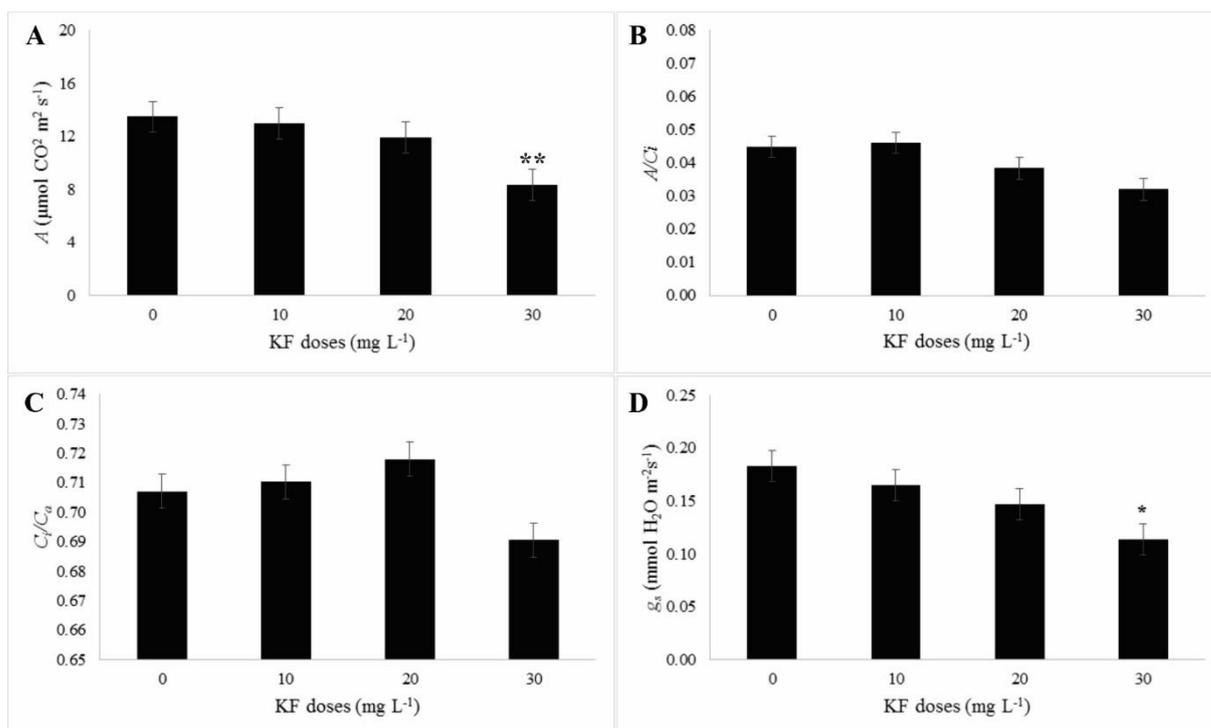


Fig. 4. Trocas gasosas em plantas de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹). (A) - Taxa fotossintética líquida (A), (B) - relação da taxa fotossintética entre a concentração interna de CO₂ (A/C_i), (C) - relação entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a) e (D) - condutância estomática (g_s). Barras corresponde à média ± EP (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas à 5% (*) e 1% (**) de probabilidade, em relação ao controle, pelo teste de Dunnett

3.6. Respiração e fotorrespiração

Os tratamentos com KF inibiram a fração de elétrons utilizados para a carboxilação (ETR_c) e para a oxigenação (ETR_o), indicando queda tanto na fotossíntese quanto no processo fotorrespiratório (Fig. 6B-C). De fato, assim como já foi relatado para a assimilação líquida de carbono, a taxa fotorrespiratória (R_p) também diminuiu com a exposição ao poluente. A taxa de respiração noturna (R_N) e mitocondrial (R_D) das folhas de *B. basiloba*, por sua vez, aumentaram em resposta ao KF (Fig. 6E-F). A razão ETR_c/ETR_o não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 6D).

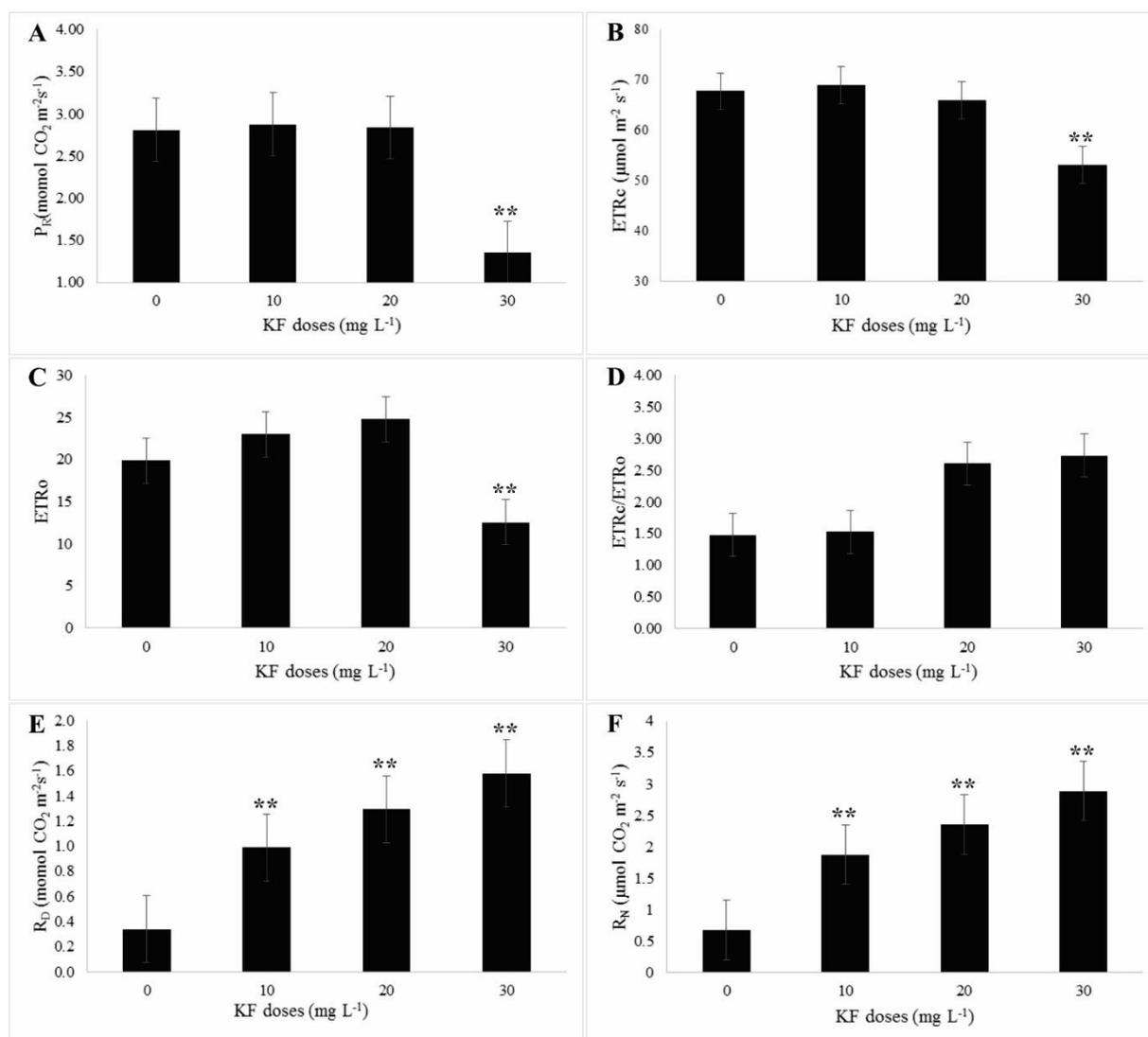


Fig. 5. Respiração e fotorrespiração de plantas de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹). (A) – Taxa de fotorrespiração (R_p), (B) - Fluxo de elétrons utilizado para carboxilação (ETRc) e (C) - oxigenação (ETRo) pela rubisco, (D) - Razão ETRc/ETRo, (E) - respiração mitocondrial (R_D) e (F) - respiração noturna (R_N) em plantas de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de exposição ao fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹). Barras corresponde à média \pm EP (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas à 5% (*) e 1% (**) de probabilidade, em relação ao controle, pelo teste de Dunnett.

4. Discussão

A exposição de *Byrsonima basiloba* ao fluoreto de potássio (KF) por chuva simulada afetou a morfologia e fisiologia das plantas. Em espécies sensíveis o KF absorvido através dos estômatos é translocado e imobilizado em porções apicais e marginais das folhas, podendo ser acumulado no mesofilo, onde altera a formação das células da epiderme, parênquima paliçádico e lacunoso (Fornasiero, 2001; Sant'Anna-Santos et al., 2006), promovendo danos fisiológicos e bioquímicos (Divan Junior et al., 2007). Em contato com o flúor, os primeiros sintomas visíveis de injúrias observados nas plantas têm sido a muito tempo reconhecidos por formações de clorose e necrose (Arndt et al., 1995), no entanto, em *B. basiloba* o flúor, ao ser absorvido pelas folhas, promoveu acúmulo de pigmentos avermelhados na superfície foliar. Esses pigmentos indicam o acúmulo de antocianinas, descritos como indicativo do acúmulo de flúor pelas plantas (Doley, 1986) e já foi observado também em *Byrsonima crassifolia* (Paula et al., 2005). Em estudo, Rezende e Furlan (2009) utilizando as mesmas amostras de plantas analisadas por Furlan et al. (2007), observaram que as concentrações de antocianinas foram positivamente correlacionadas aos sintomas de lesão foliar, sugerindo que os compostos fenólicos são importantes para estabelecer lesões vermelhas na superfície da folha. As antocianinas são pigmentos antioxidantes que atuam na manutenção das funções fisiológicas e prevenção de danos oxidativos nas células e representam uma resposta de tolerância da planta ao poluente (Gould et al., 2002; Daí et al., 2012). As alterações foliares visíveis precedem os sintomas anatômicos, o que indica o valor prognóstico da utilização das análises microscópicas (Sant'Anna-Santos et al., 2014). Dessa forma, a associação entre os efeitos visuais, anatômicos e fisiológicos podem ser excelentes marcadores dos efeitos do KF nas plantas.

O contato do flúor com a superfície da folha através da chuva simulada promove colapso dos tecidos parenquimáticos em espécies susceptíveis através da absorção e acúmulo do KF no mesofilo (Sant'Anna-Santos et al., 2014; Rodrigues et al., 2017). Em *Byrsonima basiloba* o contato do KF com as células epidérmicas através da chuva simulada proporcionou aumento na espessura da epiderme adaxial. Essa expansão celular possivelmente está relacionada ao acúmulo de exsudato de pectinas, como já foi descrito em plantas tratadas com ozônio (Günthardt-Goerg et al., 1997), indicando a formação de um mecanismo de desintoxicação em plantas expostas a poluentes

atmosféricos. Long e Naidu (2002) constataram que o aumento da matriz aquosa da parede celular está relacionado com o acúmulo de compostos como o ascorbato, as poliaminas, as glutaminas e enzimas que ajudam na eliminação de poluentes, bem como espécies reativas de oxigênio.

Em resposta ao incremento das doses de fluoreto de potássio, *B. basiloba* apresentou acúmulo de compostos fenólicos, que são indicativos de estresse oxidativo na planta (Vaughn e Duke, 1984; Chaves et al., 2002; Louback et al., 2016). Em trabalho similar, Rodrigues (2017) relatou aumento de fenóis em resposta a chuva simulada com fluoreto de potássio nas concentrações de 20 e 30 mg L⁻¹ em *Eugenia dysenterica*. Em geral, os polifenóis possuem uma estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, uma vez que são doadores de prótons (Degáspari and Waszczynskyj, 2004; Barreiros et al., 2006), representando assim uma proteção contra o estresse oxidativo que ocorre associado à exposição ao flúor (Craft et al., 2012; Louback et al., 2016). Assim, as características adaptativas da espécie como folhas grossas, células da epiderme espessa e, acúmulo de antocianinas e fenóis são importantes mecanismos que atuam na desintoxicação do KF, contribuindo para a manutenção dos tecidos.

O processo fotossintético também foi impactado nas plantas submetidas ao KF, tanto em relação às reações luminosas quanto na etapa de fixação de carbono. Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* são amplamente utilizados em estudos sobre os efeitos do estresse ambiental em plantas e comumente citados como bons parâmetros para a bioindicação, já que são fáceis e rápidos de serem obtidos, além de refletirem a saúde da planta (Areington et al., 2017; Lima et al., 2017). Em experimento com flúor, em plantas de gladiolo, Mesquita et al. (2013) observaram diminuição na eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m), indicando que o flúor pode causar fotoinibição (Singh e Verma, 2013; Rodrigues et al., 2017). Em *B. basiloba*, no entanto, o KF não alterou F_v/F_m , indicando que o decréscimo observado em Φ_{PSII} esteve relacionado à redução na proporção de centros do PSII abertos (qP), o que pode ser ocasionado, por exemplo, por uma queda na concentração de pigmentos fotossintéticos (Farnese et al., 2017). O incremento da fluorescência mínima (F_0) em resposta ao fator estressante, por sua vez, é indicativo de lesões do PSII ou de limitações na transferência de energia de excitação do complexo antena para os centros de reação (Lima et al., 2017). As avaliações de (F_0) e da eficiência de operação do fotossistema II (Φ_{PSII}), são dois dos parâmetros de fluorescência mais representativos para se avaliar o efeito biológico de estressores ambientais nas plantas (Wen et al., 2011), de forma que as alterações

observadas em *B. basiloba* poderiam ser eficientemente utilizadas na bioindicação da qualidade do ambiente.

O incremento na dissipação não fotoquímica (NPQ) é comumente observado em plantas expostas a estressores e representa um importante mecanismo adaptativo, como relatado por Neves et al. (2009) em *Eugenia uniflora* após chuva ácida simulada. De fato, altos valores de NPQ indicam aumentos na dissipação termal no PSII, evitando que energia que não está sendo utilizada no evento fotoquímico possa comprometer o aparato fotossintético. Assim como relatado para F_0 e Φ_{PSII} , o NPQ também é um parâmetro indicativo da presença de estressores ambientais. Nesse sentido, as avaliações da fluorescência da clorofila *a* constituem bom indicador das modificações do fotosistema II e da sua operação em resposta ao KF (Rodrigues et al., 2017), porque os agentes estressores, como o flúor, podem influenciar o estado funcional (Baker e Rosenqvist, 2004) e a taxa de transporte de elétrons (Baunthiyal e Sharma, 2014) na membrana do tilacóide.

Alterações também foram observadas nos parâmetros relacionados às trocas gasosas, sendo que a chuva simulada com fluoreto de potássio desencadeou redução na condutância estomática e na assimilação líquida de carbono (A), danos semelhantes aos observados por Oliva e Figueiredo (2005) em plantas de *Panicum maximun* submetidas à chuva simulada com flúor. O fechamento estomático é uma das primeiras respostas das plantas aos poluentes atmosféricos e representa um mecanismo para diminuir a entrada dos poluentes nos tecidos vegetais podendo, no entanto, resultar em menores taxas fotossintéticas (Cai et al., 2016). Contudo, embora o KF também tenha desencadeado o fechamento estomático em *B. basiloba*, a redução na condutância estomática não parece ter sido o principal responsável pela queda nas taxas fotossintéticas, já que C_i/C_a se manteve constante. A eficiência de carboxilação (A/C_i), por sua vez, diminuiu significativamente, indicando que o flúor desencadeou danos na atividade da Rubisco, principal enzima envolvida na fixação do carbono. A Rubisco é particularmente sensível ao estresse oxidativo (Mehta et al., 1992; Ishida et al., 1997), dando origem a formação de espécies reativas de oxigênio que atuam na sua degradação (Leitao et al., 2003).

Apesar de processos respiratórios e fotorrespiratórios serem determinantes para o balanço de carbono nas plantas e, portanto, para seu crescimento e sobrevivência, alterações desencadeadas por poluentes atmosféricos na respiração e na fotorrespiração ainda são pouco documentadas (Gupta et al., 2016). Em *B. basiloba* a razão Φ_{PSII}/Φ_{CO_2}

aumentou a medida que a dose de KF também aumentou, demonstrando que, sob estresse, a planta desencadeou o redirecionamento dos elétrons para outras vias metabólicas, no caso a respiração. Esse incremento na respiração pode ser, em parte, devido à elevação da atividade da ATPase mitocondrial pelo flúor, conforme relatado por Miller e Miller (1974) em *Glycine max* submetida ao flúor. A diminuição da fotossíntese e o aumento da respiração são relatados em estudos com plantas sob estresse por ozônio e por outros poluentes (Mereu et al., 2011; Dumont et al., 2013; Farnese et al., 2017), sendo que o aumento nos processos catabólicos (respiração) é importante para mobilizar ATP e esqueletos de carbono para suprir a alta demanda energética envolvida em processos de defesa (Farnese et al., 2017). O incremento da respiração pode estar relacionado com o aumento dos espaços intracelulares em *B. basiloba*, facilitando a maior difusão de CO₂ na folha. Gonzalez-Meler et al. (2004) relataram que níveis elevados de CO₂ aumenta a taxa de respiração. A fotorrespiração, por sua vez, diminuiu após a exposição ao flúor. A regulação desse processo é importante para contrabalançar a redução na eficiência de carboxilação, como indicado pelo aumento na razão ETRc/ETRo, e para reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio, já que em plantas expostas a poluentes a fotorrespiração pode ser responsável pela produção de até 70% de todo o H₂O₂ presente na célula (Gupta et al., 2013). Essa reprogramação dos processos metabólicos é essencial para que as plantas consigam, ao menos parcialmente, manter sua homeostase e funções celulares (Farnese et al., 2017).

5. Conclusão

Com base nos dados apresentados, é possível concluir que *B. basiloba* apresenta alto potencial para a bioindicação de ambientes contaminados com KF, uma vez que a exposição ao poluente desencadeou diversas alterações nos diferentes níveis avaliados. As alterações observadas incluem desde sintomas visuais, como o aparecimento de manchas avermelhadas, até alterações metabólicas, as quais podem ser analisadas de forma não destrutiva, o que permite a associação de programas de biomonitoramento com a arborização urbana ou com a recuperação de áreas degradadas. É importante observar, ainda, que embora *B. basiloba* seja susceptível aos danos desencadeados pelo KF, apresentando alterações visuais e danos na fotossíntese, a planta foi capaz de reprogramar seu metabolismo em resposta ao flúor, alterando a respiração, fotorrespiração e a síntese de moléculas antioxidantes, como antocianinas e compostos

fenólicos que contribuíram na integridade dos tecidos. Essas alterações representam importantes mecanismos de defesa em resposta a agentes estressores e podem ser determinantes para a sobrevivência da planta, o que seria importante para permitir o desenvolvimento de programas de bioindicação em longo prazo.

Agradecimento

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFGoiano-RV, concessão nº DPPG 105/2016) por fornecer apoio financeiro. DA Rodrigues, C Müller e AA Rodrigues agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e EMG Teles ao IFGoiano pela bolsa de estudo.

Referências

- Agalakova, N. I., Gusev, G. P., 2012. Molecular mechanism of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. *ISRN. Cell. Biol.* 16. Doi.org/10.5402/2012/403835.
- Areington, C. A., Varghese, B., Sershen., 2017. The utility of biochemical, physiological and morphological biomarkers of leaf sulfate levels in establishing *Brachylaena discolor* leaves as a bioindicator of SO₂ pollution. *Plant Physiol Biochem.* 118, 295-305. Doi. 10.1016/j.plaphy.2017.06.025.
- Arndt, U., Flores, F., Weinstein, L. H., 1995. Efeito do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil. Porto Alegre. Ed. Da UFRGS. 155p.
- Bai, J., Xu, D. H., Kang, H. M., Chen, K., Wang, G., 2008. Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. *Photosynthetica.* 46, 232-237. Doi: 10.1007/s11099-008-0037-5.
- Baker, N. R., Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 403, 1607–1621. Doi.org/10.1093/jxb/erh196.

- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., David, J. P., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova.* 29, 113–123. Doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021.
- Baunthiyal, M., Ranghar, S., 2014. Physiological and biochemical responses of plants under fluoride stress: An overview. *Res Review Fluor.* 47, 287–293.
- BFG., 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66, 1085-1113. Doi.org/10.1590/2175-7860201566411.
- Bilger, W., Schreiber, U., Bock, M., 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia.* 102, 425–432.
- Cai, H., Dong, Y., Li, Y., Li, D., Peng, C., Zhang, Z., Wan, X., 2016. Physiological and cellular responses to fluoride stress in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Acta Physiol Plant.* 38, 144. Doi. 10.1007/s11738-016-2156-0.
- Chaves, A. L. F., Silva, E. A. M., Azevedo, A. A., Cano, M. A. O., Matsuoka, K., 2002. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* jacq. (Colonião) e *Chloris gayana* kunth. (Capim-rhodes) – Poaceae. *Acta bot. bras.* 16, 395-406. Doi.org/10.1590/S0102-33062002000400003.
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., Pegg, R. B., 2012. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 11, 148–173. Doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x.
- Daí, L. P., Dong, X. J., Ma, H. H., 2012. Antioxidative and chelating properties of anthocyanins in *Azolla imbricata* by cadmium. *Pol. J. Environ. Stud.* 21, 837-844.
- Degáspari, C.H., Waszczynskyj, N., 2004. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acad.* 5, 33–40.
- Divan Junior, A. M., Oliva, M. A., Ferreira, F. A., 2008. Dispersal pattern of airborne emissions from an aluminium smelter in Ouro Preto, Brazil, as expressed by foliar fluoride accumulation in eight plant species. *Ecol. Indic.* 8, 454–461. Doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.04.008.
- Divan Junior, A. M., Oliva, M. A., Martinez, C. A., Cambraia, J., 2007. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv.

Colonião. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 247–253.
Doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.06.002.

Doley, D., 1986. Plant fluoride relationships in analysis with particular reference to Australian vegetation. Melbourne: Inkata Press. 128.

Dumont, J., Spicher, F., Montpied, P., Dizengremel, P., Jolivet, Y., Thiec, D, L., 2013., Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO₂ and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* x *Populus nigra* genotypes. Environ Pollut. 173, 85-96. Doi.org/10.1016/j.envpol.2012.09.026.

Epron, D., Dreyer, E., 1993. Long-term effects of drought on photosynthesis of adult oak trees [*Quercuspetraea* (Matt.) Liebl. and *Quercusrobur* L.] in a natural stand. New Phytol. 125, 381-389. Doi 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03890.x.

Farnese, F. S., Oliveira, J. A., Saiva, E. A. S., Menezes-Silva, P. E., Silva, A. A., Campos, F. V., Ribeiro, C., 2017. The Involvement of Nitric Oxide in Integration of Plant Physiological and Ultrastructural Adjustments in Response to Arsenic. Front. Plant Sci. 8, 516. Doi: 10.3389/fpls.2017.00516.

Fornasiero, R. B., 2001. Phytotoxic effects of fluorides. Plant Sci. 161, 979-985. Doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00499-X.

Furlan, C. M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Salatino, A., Sanz, M. J., 2007 *Psidium guajava* ‘Paluma’ (the guava plant) as a new bio-indicator of ozone in the tropics. Environ Pollut 147, 691–695.

Gonzalez-Meler, M. A., Taneva, L., Trueman, R. J., 2004. Plant Respiration and Elevated Atmospheric CO₂ Concentration: Cellular Responses and Global Significance. Ann Bot. 94, 647–656. Doi:10.1093/aob/mch189.

Gould, K.S., McKelvie, J., Markham, K. R., 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. Plant Cell Environ. 25, 1261-1269. Doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00905.x.

Günthardt-Goerg, M. S., McQuattie, C. J., Scheidegger, C., Rhiner, C., Matyssek, R., 1997. Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls. Can. Res. 27, 453-463.

- Gupta, A., 2016. Effect of air pollutants on plant gaseous exchange process: effect on stomata and respiration. *Plant Res Air Poll.* 85-92.
- Gupta, D. K., Inouhe, M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Sandalio, L. M., 2013. Oxidative stress and arsenic toxicity: role of NADPH oxidases. *Chemosphere.* 90, 1987–1996. Doi. 10.1016 / j.chemosphere.2012.10.066.
- Ishida, H., Nishimori, Y., Sugisawa, M., Makino, A., Mae, T., 1997. The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat, *Plant Cell Physiol.* 38, 471-479.
- Jensen, W. A., 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice.* San Francisco: W. H. Freeman e Co. 408.
- Johansen, D. A., 1940. *Plant microtechnique.* New York: McGraw-Hill Book Co. 523.
- Karnovsky, M. J. A., 1965. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137-138.
- Kitajima, M., Butler, W. L., 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys Acta.* 376, 105-115.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Fomin, A., 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede europeia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). *Rev. bras. Bot.* 24, 511-518. Doi.org/10.1590/S0100-84042001000500005.
- Laisk, A., Loreto, F., 1996. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence, *Plant Physiol.* 110. 903–912.
- Larcher, W., 1983. *Physiological Plant Ecology.* Springer-Verlag, Berlin.
- Leitao, L., Goulas, P., Jean-Philippe, B., 2003. Time-course of Rubisco oxidation in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) subjected to a long-term ozone stress. *Plant Scienc.* 165, 613-620.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Knapp, M., 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43, 379–393.

- Lima, D. A., Müller, C., Costa, A. C., Batista, P. F., Dalvi, V. C., Domingos, M., 2017. Morphoanatomical and physiological changes in *Bauhinia variegata* L. as indicators of herbicide diuron action. *Ecotox Environ Safe.* 14, 242–250. Doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.038.
- Long, S. P., Naidu, S. L., 2002. Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone. In: Bell, J.N.B., Treshow, M., eds. *Air pollution and plant life*. Chichester: John Wiley & Sons. 69–88.
- Lorenzi, H., 2008. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 238 p.
- Louback, E., Pereira, T. A. R., Souza, S. R., Oliveira, J. A., Silva, L. C., 2016. Vegetation damage in the vicinity of an aluminum smelter in Brazil. *Ecol. Indic.* 64, 193-203. Doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.044.
- Maxwell, K., Johnson, G. N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 345, 659-668. Doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659.
- Medeiros, J. D., 2011. *Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies*. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 532 p. (Série Biodiversidade, 43). Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_df/_publicacao/148_publicacao14022012101832>. Acesso em: 29 jul. 2017.
- Mehta, R. A., Fawcett, T. W., Porath, D., Mattoo, A. K., 1992. Oxidative stress causes rapid membrane translocation and in vivo degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *J. Biol. Chem.* 267, 2810-2816.
- Mereu, S., Gerosa, G., Marzuoli, R., Fusaro, L., Salvatori, E., Finco, A., Spano, D., Manes, F., 2011. Gas exchange and JIP-test parameters of two Mediterranean maquis species are affected by sea spray and ozone interaction. *Environ Exp Bot.* 73, 80–88. Doi:10.1016/j.envexpbot.2011.02.004.
- Mesquita, G. L., Machado, E. C., Machado, R., Cantarella, H., Mattos, D. Jr., 2013. Fluoride exposure compromises gas exchange of plants. *Am. J. Plant. Sci.* 4, 16-20. Doi: 10.4236/ajps.2013.412A3003.
- Miller, G.W., 1993. *The effect of fluoride on higher plants: with special emphasis on early physiological and biochemical disorders*. Fluoride, Detroit. 26, 3-22.

- Miller, J. E., Miller, G. W., 1974. Effects of fluoride on mitochondrial activity in higher plants. *Physiol. Plant* 32, 115–121. Doi: 10.1111 / j.1399-3054.1974.tb03737.x.
- Neves, N. R., Oliva, M. A., Centeno, D. C., Costa, A. C., Ribas, R. F., Pereira, E. G., 2009. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. *Sci Total Environ.* 407, 3740–3745. Doi:10.1016/j.scitotenv.2009.02.035.
- Nouchi, I., 2002. Plants as bioindicators of air pollution. *Air Pollut Plant Biotechnol.* 11, 41–60.
- O'Brien, T.P., Feder, N., Mccully, M. E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma.* 59, 368-373. Doi:10.1007/BF01248568.
- Oliva, M. A., Figueiredo, J. G., 2005. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. *Rev. Bras. Bot.* 28, 389–397. Doi.org/10.1590/S0100-84042005000200017.
- Oxborough, K., Baker, N. R., 1997. An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and sub-cellular levels of organization, *Plant Cell Environ.* 20, 1473–1483. Doi: 10.1046 / j.1365-3040.1997.d01-42.x.
- Panda, D., 2015. Fluoride toxicity stress: physiological and biochemical consequences on plants. *Int. J. Bioresource, Environ. Agric. Sci.* 1, 70–84.
- Paula, M. T., Santos Filho, B. G., Santos, D. S. B., Vieira, I. M. S., Conceição, H. E. O., 2005. Influência do flúor sobre parâmetros químicos e bioquímicos de folhas de murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). *Rev. Ciênc. Agrár., Belém.* 43,137-148.
- Rezende, F. M., Furlan, C. M., 2009. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. *Chemosphere,* 76, 1445–1450.
- Rodrigues, A. A., Vasconcelos-Filho, S. C., Mendes, G. C., Rehn, L. S., Rodrigues, D. A., Rodrigues, C. L., Müller, C., 2017. Fluoride in simulated rain affects the morphoanatomy and physiology of *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC. *Ecol. Indic.* 82, 189–195. Doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.07.005.

- Rodriguez, J. H., Wannaz, E. D., Franzaring, J., Klumpp, A., Fangmeler, A., Pignata, M. L., 2015. Biomonitoring of airborne fluoride and polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial areas of Cordoba, Argentina, using standardized grass cultures of *Lolium multiflorum*. *Atmos Pollut Res.* 6, 444-453. Doi.org/10.5094/APR.2015.049.
- Sant'Anna-Santos, B. F., Azevedo, A. A., Alves, T. G., Campos, N. V., Oliva, M. A., Valente, V. M. M., 2014. Effects of emissions from an aluminium smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. *Water Air Soil Pollut.* 225, 1817. Doi: 10.1007/s11270-013-1817-5.
- Sant'Anna-Santos, B. F., Azevedo, A. A., Silva, L. C., Oliva, M. A., 2012. Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *An Acad Bras Cienc.* 84, 689-702. Doi.org/10.1590/S0001-37652012005000048.
- Sant'Anna-Santos, B. F., Silva, C. S., Azevedo, A. A., Araújo, J. M., Alves, E. F., Silva, E. A. M., Aguiar, R., 2006. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. *Environ Exp Bot.* 58, 158-168. Doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.07.005.
- Silva, F. A. S., Azevedo, C. A. V., 2016. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res.* 39, 3733-3740. Doi: 10.5897 / AJAR2016.11522.
- Singh, M., Verma, K. K. I., 2013. Influence of fluoride-contaminated irrigation water on physiological responses of poplar seedlings (*Populus deltoides* L. clone-S₇C₁₅). *Res Rep Fluor.* 46, 83–89. Doi. 10.1007/s11738-013-1368-9.
- Smith, F.A., Hodge, H.C., 1979. Airborne fluorides and man: Part I. *Crit Rev Environ Control.* 8, 293-372.
- Valentini, R., Epron, D., De Angelis, P., Matteucci, G., Dreyer, E., 1995. In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant. Cell. Environ.* 18, 631 -640. Doi: 10.1111/j.1365-3040.1995.tb00564.x.
- Vaughn, K. C., Duke, S. O., 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plan.* 60, 106-112. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1984.tb04258.x.

Walna, B., Kurzyca, I., Bednorz, E., Kolendowicz, L., 2014. Fluoride pollution of atmospheric precipitation and its relationship with air circulation and weather patterns (Wielkopolski National Park, Poland). *Environ Monit Assess.* 185, 5497-5514. Doi, 10.1007 / s10661-012-2962-9.

Weinstein, L. H., Davison, A. W., Skelly, J. M., 2003. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. *Environ Pollut.* 125, 3-11. Doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00090-3.

Wen, K., Liang, C., Wang, L., Hu, G., Zhou, Q., 2011. Combined effects of lanthanum ion and acid rain on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in soybean seedlings. *Chemosphere.* 84, 601–608. Doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.054.

World Health Organization, 2016. World Health Organization Ambient Air Pollution: A Global Assessment of Exposure and Burden of Disease. ISBN: 9789241511353. (Access in 14 in August in 2017). <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250141/1/9789241511353-eng.pdf?ua=1>.

Yang, X., Ye, C., Liu, Y., Zhao, F. J., 2015. Accumulation and phytotoxicity of perfluorooctanoic acid in the model plant species *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Pollut.* 206, 560–566. Doi.org/10.1016/j.envpol.2015.07.050.

Zouari, M., Ahmed Ben, C., Fourati, R., Delmail, D., Rouina Ben, B., Labrousse, P., Abdallah Ben, F., 2014. Soil fluoride spiking effects on olive trees (*Olea europaea* L. cv. Chemlali). *Ecotox Environ Saf.* 108, 78–83. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.06.022.