

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

EFEITO DA CHUVA SIMULADA DE FLUORETO DE POTÁSSIO EM  
DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS

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

RIO VERDE - GO  
Julho – 2018

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

EFEITO DA CHUVA SIMULADA DE FLUORETO DE POTÁSSIO EM  
DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS

Autor: Arthur Almeida Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR 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  
Julho – 2018

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

R696e Rodrigues, Arthur Almeida  
EFEITO DA CHUVA SIMULADA DE FLUORETO DE POTÁSSIO  
EM DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS / Arthur Almeida  
Rodrigues; orientador Sebastião Carvalho Vasconcelos  
Filho; co-orientadora Giselle Camargo Mendes. -- Rio  
Verde, 2018.  
67 p.

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

1. flúor. 2. plantas bioindicadoras. 3.  
toxicidade. I. Vasconcelos Filho, Sebastião Carvalho  
, orient. II. Mendes, Giselle Camargo, co-orient.  
III. Título.

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

**EFEITO DA CHUVA SIMULADA DE FLUORETO DE POTÁSSIO EM  
DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS**

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

TITULAÇÃO: Doutor em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de Concentração em  
Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 31 de Julho de 2018.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Andrea Nascimento dos Reis Magalhães  
Avaliadora externa  
UniRV – Rio Verde/GO

Prof. Dr. Leandro Carlos  
Avaliador interno  
IF Goiano – Rio Verde/GO

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Nascimento Siqueira  
Avaliadora externa  
UniRV – Rio Verde/GO

Prof. Dr. Wilker Alves Moraes  
Avaliador interno  
IF Goiano – Rio Verde/GO

Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho  
Presidente da banca  
IF Goiano – Rio Verde/GO

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por serem os pilares fundamentais na minha vida. Aos meus pais, Odailton e Vilma, pelo amor incondicional, por terem contribuído imensamente em todos os momentos da minha vida para que eu pudesse chegar aqui.

Ao meu irmão Douglas Almeida Rodrigues, pela amizade e dedicação na realização desse projeto.

À minha namorada Cássia Lino Rodrigues, pelo apoio nos momentos difíceis e contribuições na realização desse projeto.

Ao professor e orientador Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho, pelas orientações e dedicação durante toda a execução desse projeto. Sou imensamente grato por todos esses anos de orientação e oportunidade de trabalho em equipe.

À Caroline Muller, por todos os ensinamentos e incansável dedicação na execução desse projeto. Muito obrigado pela oportunidade de aprender com você.

À Coorientadora, Professora Giselle Camargo Mendes, pela parceria e empenho durante a execução desse projeto.

Aos colegas Eduardo Matheus, Larissa Saeki, Karine, Roberto Vital, Luciana Minervina, dos laboratórios de anatomia vegetal, sementes e fisiologia vegetal.

Ao laboratório de Sementes em nome da Professora Juliana de Fátima Sales, pelo apoio e dedicação na execução desse projeto.

Ao laboratório de Fisiologia Vegetal em nome do professor Alan Carlos Costa, pelo apoio e dedicação na execução desse projeto.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, e ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, pela oportunidade deste trabalho.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Arthur Almeida Rodrigues, filho de Odailton Rodrigues Ferreira e Vilma de Almeida Couto Rodrigues, nasceu em Rio Verde, Estado de Goiás, em 29 de agosto de 1991.

Em agosto de 2009, iniciou Graduação de Engenharia Ambiental na UniRV- Universidade de Rio Verde-GO, graduando-se em agosto de 2013.

Em agosto de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia, a nível de Mestrado, na área de tolerância de espécies nativas do cerrado ao alumínio, em cultivo hidropônico, concluiu o mestrado acadêmico em 29 de julho de 2015, com a defesa da Dissertação intitulada: Toxidez do alumínio em *Eugenia dysenterica* DC. e *Hancornia speciosa* Gomes.

Em agosto de 2015, ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Agrárias – Agronomia a nível de Doutorado do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, defendendo em 31 de julho de 2018, a tese intitulada: Efeito da chuva simulada de fluoreto de potássio em duas espécies arbóreas.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
OBJETIVO GERAL.....	6
<b>Capítulo 1: EFEITO DA CHUVA SIMULADA COM FLUORETO DE POTÁSSIO NA MORFOANATOMIA E FISIOLOGIA DE <i>Eugenia dysenterica</i> (Mart.) DC.....</b>	<b>7</b>
1.Introdução.....	8
2.Material e Métodos.....	9
2.1.Material Vegetal, Condições de Cultivo e Tratamentos.....	9
2.2.Avaliação dos sintomas foliares visíveis.....	10
2.3.Avaliações da fluorescência da clorofila a.....	11
2.4.Determinação de clorofilas.....	11
2.5.Caracterização morfoanatômica foliar.....	11
2.6.Análise estatística.....	12
3.Resultados.....	12
3.1.Avaliações dos sintomas morfológicas.....	12
3.2.Avaliação das alterações anatômicas.....	13
3.3.Alterações fotoquímicas.....	17
4.Discussão.....	18
5.Conclusão.....	20
6.Agradecimento.....	21
7.Referências.....	21
<b>Capítulo 2: POTENCIAL BIOINDICADOR DE <i>Sapindus saponaria</i> A CHUVA SIMULADA DE FLUORETO DE POTÁSSIO: TRAÇOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS.....</b>	<b>28</b>
1.Introdução.....	29
2.Material e Métodos.....	30
2.1. Material Vegetal, Condições de Cultivo e Aplicação dos Tratamentos.....	30
2.2.Avaliação dos sintomas foliares visíveis.....	31
2.3.Avaliações da caracterização morfoanatômica foliar.....	31

2.4.Histolocalização de compostos fenólicos.....	32
2.5.Avaliação da fluorescência da clorofila a.....	32
2.6.Trocas gasosas.....	33
2.7.Análise estatística.....	33
3.Resultados.....	33
3.1.Avaliação dos sintomas morfológicos.....	33
3.2.Avaliação das alterações anatômicas.....	34
3.3.Identificação de compostos fenólicos.....	35
3.4.Fluorescência da clorofila a.....	37
3.5.Trocas gasosas.....	39
4.Discussão.....	41
5.Conclusão.....	44
6.Agradecimento.....	44
7.Referências.....	44
Conclusão Geral.....	52

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

### **CAPÍTULO 1. Efeito da chuva simulada com fluoreto de potássio na morfoanatomia e fisiologia de *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC.**

**Tabela 1.** Efeito do flúor na estrutura foliar de *Eugenia dysenterica* após 27 dias de exposição ao fluoreto de potássio (KF) em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>).....16

**Tabela 2.** Clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais em plantas de *Eugenia dysenterica* após 27 dias de exposição ao fluoreto de potássio (KF) em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>).....17

**Tabela 3.** Rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo do FSII quando os centros de reação estão reduzidos (FSII) ( $\Delta F/F_m'$ ), quenching não fotoquímico (*qN*) e dissipação não fotoquímica (NPQ) em *Eugenia dysenterica* após 27 dias de exposição ao fluoreto de potássio (KF) em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>).....17

### **CAPÍTULO 2. Potencial bioindicador de *Sapindus saponaria* a chuva simulada de fluoreto de potássio: traços anatômicos e fisiológicos.**

**Tabela 1.** Fluorescência mínima ( $F_0$ ), rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), rendimento quântico efetivo do FSII quando os centros de reação estão reduzidos ( $\Delta F/F_m'$ ), taxa de transporte de elétrons (ETR), quenching não fotoquímico (*qN*), dissipação não fotoquímica (NPQ), em plantas de *Sapindus saponaria* após 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20, 30 e 40 mg L<sup>-1</sup>).....38

**Tabela 2.** Taxa fotossintética líquida (*A*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), Taxa de transpiração (*E*), relação entre concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>*), relação da taxa fotossintética entre a concentração interna de CO<sub>2</sub> (*A/C<sub>i</sub>*) e relação entre a taxa aparente de transporte de elétrons e a assimilação de CO<sub>2</sub> (*ETR/A*) em plantas de *Sapindus saponaria* após 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20, 30 e 40 mg L<sup>-1</sup>).....40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

### **CAPÍTULO 1. Efeito da chuva simulada com fluoreto de potássio na morfoanatomia e fisiologia de *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC.**

**Figura 1.** Sintomas visíveis nas folhas de *Eugenia dysenterica*, destacadas por setas pretas, após 27 dias de exposição a chuva simulada de fluoreto de potássio em diferentes concentrações: (A) controle. (B) 10 mg L<sup>-1</sup> KF. (C) 20 mg L<sup>-1</sup> KF. (D) 30 mg L<sup>-1</sup> KF. Barra de escala 2 cm.....13

**Figura 2.** Alterações anatômicas nas folhas de *Eugenia dysenterica* após 27 dias de exposição a chuva simulada de fluoreto de potássio em diferentes concentrações. (A-B) controle, (C-D) 10 mg L<sup>-1</sup> KF, (E-F) 20 mg L<sup>-1</sup> KF, (G-H) 30 mg L<sup>-1</sup> KF. AdEp, epiderme adaxial. AbEp, epiderme abaxial; PP, parênquima paliçádico; SP, parênquima esponjoso; Fi, fibra; Xy, xilema; Ph, Floema; FP, parênquima fundamental. Setas brancas indicam compostos fenólicos. Setas pretas indicam colapso de células parenquimáticas. Setas pretas na região da nervura indicam retração de nervura. Barra de escala (A, C, E, G) 50 µm; (B, D, F, H) 500 µm.....14

**Figura 3.** Alterações anatômicas nas folhas de *Eugenia dysenterica* após 27 dias de exposição a chuva simulada de fluoreto de potássio. (A, F, H) controle; (B-E, G, I) 30 mg L<sup>-1</sup> KF. PP, parênquima paliçádico; SP, parênquima esponjoso. (B) acúmulo de compostos fenólicos. (C-D) colapso das células do parênquima clorofiliano. (E) plasmólise das células. (G-I) acúmulo de amido. Barras de escala 20 µm.....15

### **CAPÍTULO 2. Potencial bioindicador de *Sapindus saponaria* a chuva simulada de fluoreto de potássio: traços anatômicos e fisiológicos**

**Figura 1.** Sintomas visíveis nas folhas de *Sapindus saponaria*, destacados por setas pretas, após 4 e 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações: (A) controle, (B) 10 mg L<sup>-1</sup> KF, (C) 20 mg L<sup>-1</sup> KF, (D) 30 mg L<sup>-1</sup> KF e (E) 40 mg L<sup>-1</sup> KF. Barra de escala 2 cm.....34

**Figura 2.** Alterações anatômicas nas folhas de *Sapindus saponaria* após 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações. (A) controle, (B) 10 mg L<sup>-1</sup> KF, (C) 20 mg L<sup>-1</sup> KF, (D) 30 mg L<sup>-1</sup> KF, (E-F) 40 mg L<sup>-1</sup> KF. (Adep) epiderme adaxial. (Abep) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas pretas indicam hipertrofia e colapso das células e setas amarelas acúmulo de compostos fenólicos. Barra de escala 100 µm.....35

**Figura 3.** Acúmulo de compostos fenólicos marcado na cor preta nas folhas de *Sapindus saponaria* após 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações. (A) controle, (B) 10 mg L<sup>-1</sup> KF, (C) 20 mg L<sup>-1</sup>

KF, (D) 30 mg L<sup>-1</sup> KF e (E-F) 40 mg L<sup>-1</sup> KF. (Adep) epiderme adaxial. (Abep) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas amarelas indicam acúmulo de compostos fenólicos. (A-D) Barra de escala 100 µm. (E-F) Barra de escala 50 µm.....36

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

SÍMBOLO	SIGNIFICADO	UNIDADE DE MEDIDA
%	Porcentagem	
A	Taxa fotossintética	( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
$A/C_i$	Relação da taxa fotossintética entre a concentração interna de $\text{CO}_2$	
Abep	Epiderme abaxial	$\mu\text{m}$
Adep	Epiderme adaxial	$\mu\text{m}$
Ca	Cálcio	
$\text{CaF}_2$	Fluoreto de Cálcio	
$C_i/C_a$	Razão entre a concentração interna e externa de $\text{CO}_2$	
cm	Centímetro	
CV	Coefficiente de Variação	%
E	Taxa de transpiração	( $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
ETR	Taxa de transporte de elétrons	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
$ETR/A$	Relação entre a taxa aparente de transporte de elétrons e a assimilação de $\text{CO}_2$	
$F_0$	Fluorescência mínima	
$F_i$	Fibra	$\mu\text{m}$
$F_m$	Fluorescência máxima	
FP	Parênquima fundamental	$\mu\text{m}$
FSII	Fotossistema II	
FSII	Fotossistema II	
gs	Condutância estomática	( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
HCl	Ácido clorídrico	
IRGA	Analizador de gases no infravermelho	
K	Potássio	
KF	Fluoreto de potássio	$\text{mg L}^{-1}$
L	Litro	
m	Metro	
M	Molar	
Mg	Magnésio	
N	Nitrogênio	
NaOH	Hidróxido de Sódio	
NPQ	Coefficiente de extinção não-fotoquímico	
$^{\circ}\text{C}$	Temperatura em graus Celsius	Graus Celsius
P	Fósforo	

PAR	Radiação fotossinteticamente ativa	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
pH	Potencial Hidrogeniônico	
Ph	Floema	$\mu\text{m}$
PP	Parênquima paliçádico	$\mu\text{m}$
qN	Quenching não fotoquímico	
ROS	Espécie reativa de oxigênio	
S	Sul	
s	Segundo	
SP	Parênquima esponjoso	$\mu\text{m}$
W	Oeste	
Xy	Xilema	$\mu\text{m}$
$\Delta F/F_m'$	Rendimento quântico efetivo do FSII quando os centros de reação estão	
$\mu\text{m}$	Micrômetro	
$\Phi\text{CO}_2$	Rendimento quântico de assimilação de dióxido de carbono	
$\Phi\text{FSII}$	Eficiência de operação do fotossistema II	

---

## RESUMO

RODRIGUES, ARTHUR ALMEIDA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, julho de 2018. **Efeito da chuva simulada de fluoreto de potássio em duas espécies arbóreas.** Orientador: Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho. Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Giselle Camargo Mendes.

O flúor é um dos principais poluentes fitotóxicos lançados na atmosfera. Pode ser liberado por fábricas de tijolos, cerâmicas, minerais fosfatados e fundições de alumínio, provocando danos em diferentes espécies de plantas. *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) e *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) são espécies com ampla distribuição no Brasil e tem sido utilizadas na recuperação de áreas degradadas e arborização urbana. Desta forma, objetivou-se determinar o potencial bioindicador de *E. dysenterica* e *S. saponaria* através de respostas morfoanatômicas e fisiológicas após chuva simulada com fluoreto de potássio (KF). Plantas jovens de *E. dysenterica* e *S. saponaria*, foram submetidas diariamente a chuva simulada de KF nas concentrações de 0, 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup> para *E. dysenterica* e 0, 10, 20, 30 e 40 mg L<sup>-1</sup> de KF para *S. saponaria*. A formação de necrose e clorose foram evidenciadas em ambas as espécies, no entanto *S. saponaria* apresentou maior sensibilidade, com aparecimento de danos a partir do 4º dia de aplicação do KF em todos os tratamentos testados, seguido de alterações dos tecidos parenquimáticos com colapso das células, acúmulo de compostos fenólicos, danos nas etapas fotoquímicas e bioquímicas da fotossíntese de acordo com o incremento das doses de KF. Os sintomas visíveis associados as variáveis fisiológicas não invasivas demonstraram ser importantes biomarcadores da ação do flúor. Além disso, as características avaliadas demonstraram que *E. dysenterica* e *S. saponaria* são susceptíveis ao fluoreto de potássio, apresentando alto potencial de bioindicação a esse poluente.

**Palavras-chave:** flúor; plantas bioindicadoras; toxicidade

## ABSTRACT

RODRIGUES, ARTHUR ALMEIDA. Goiano Federal Institute of Education, Science, and Technology - Rio Verde Campus, July 2018. **Effect of simulated rainfall of potassium fluoride on two plant species**. Advisor: Dr. Vasconcelos Filho, Sebastião Carvalho. Co-advisor: Dr. Mendes, Giselle Camargo.

Fluoride is one of the main phytotoxic pollutants released into the atmosphere. It is usually produced by brickworks, ceramic plants, phosphate minerals manufacturing, and aluminum smelters, causing damages in different plant species. *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) and *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) are species growing widely in Brazil and have been used for recovering degraded areas and urban afforestation. This study aimed to determine the bioindicator potential of *E. dysenterica* and *S. saponaria* through morpho-anatomical and physiological responses after simulated rainfall with potassium fluoride (KF). *E. dysenterica* and *S. saponaria* seedlings were submitted daily to simulated KF rain at concentrations of 0, 10, 20, and 30 mg L<sup>-1</sup> for *E. dysenterica*, and 0, 10, 20, 30, and 40 mg L<sup>-1</sup> from KF to *S. saponaria*. The necrosis and chlorosis formation were shown in both species; however *S. saponaria* presented greater sensitivity with damage occurring as the 4<sup>th</sup> day after KF application in every tested treatment, followed by alterations in the parenchyma tissues with cells collapsing, phenolic compounds accumulation, damages in the photochemical and biochemical stages of photosynthesis according to the increment in KF doses. The visible symptoms associated with the non-invasive physiological variables showed to be important biomarkers in the fluoride action. In addition, the evaluated characteristics showed that *E. dysenterica* and *S. saponaria* are susceptible to potassium fluoride, presenting high potential of bioindication to this pollutant.

**Key-words:** Fluoride; Bioindicator plants; Toxicity.

## INTRODUÇÃO

O flúor (F) é um elemento eletronegativo halogênio que apresenta alta distribuição no meio ambiente e se destaca pela forte toxicidade (Fordyce et al., 2007). Vários riscos para a saúde estão associados quando a concentração de flúor no meio ambiente excede ou ultrapassa o limite prescrito pela OMS organização mundial da saúde ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Mukherjee e Halderd, 2016). As principais fontes de F podem ser naturais, como rocha mineral, fluorite, fosfato de rocha, criolite, apatita, mica (Murray, 1986). No entanto, grandes quantidades desse elemento são lançadas através de operações industriais, como por exemplo, mineração de fertilizantes fosfatados, fundições de zinco e alumínio, fábricas de cerâmicas e tijolos (Bhatnagar et al., 2011).

O flúor é 3 vezes mais fitotóxico do que outros poluentes comuns (por exemplo, dióxido de enxofre, nitrato de peroxiacetila e o gás de cloro), sendo que quantidades relativamente pequenas liberadas na atmosfera podem resultar em dano extensivo à vida vegetal (Weinstein e Davison, 2004). Quando lançado na atmosfera em estado gasoso o flúor penetra nos tecidos da planta, principalmente através dos estômatos (Sant'Anna-Santos et al., 2014). Em solução aquosa pode ser absorvido por toda a superfície foliar (Chaves et al., 2002), podendo ser acumulado no mesófilo alterando a integridade das células (Oliva e Figueiredo, 2005). A clorose é o primeiro sintoma da folha visível em resposta ao fluoreto (Zouari et al., 2014) e um aumento na concentração e no tempo de exposição pode ocasionar danos na estrutura anatômica e processo respiratório (Rodrigues et al., 2018) com formação de espécies reativas de oxigênio (Zouari et al., 2017).

Em regiões tropicais há muito são sentidos os problemas da poluição do ar, especialmente em cidades do Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela (Klumpp et al., 2001; Domingos et al., 2002). Desta forma, programas de biomonitoramento devem ser incentivados nestes países pelos órgãos governamentais, uma vez que representam uma

alternativa viável com custo de aplicação reduzido quando comparado com outras metodologias. Assim, fornece informações sobre a qualidade do ar em locais que não contam com onerosas redes de monitoramento (De Temmerman et al., 2004; Gurgatz et al., 2016). Assim, o biomonitoramento é importante para determinar as condições do ar e elucidar os danos na vegetação (Maré et al., 2015). Podendo ser empregado através de técnicas de relações dose-resposta com a implantação de experimentos instalados em condições controladas ou estudos de campo que priorizam a validação de metodologias e criação de marcadores da ação do poluente nas espécies de plantas estudadas (Vike, 1999; Weinstein e Davison, 2004). Para isso, pode ser utilizado o biomonitoramento de forma passiva, com o uso da vegetação no próprio local de estudo, ou ativa com plantas expostas no campo durante um tempo bem especificado. Esses dois métodos de biomonitoramento é possível utilizar a bioindicação de acumulação baseando na determinação analítica das concentrações de poluentes nas plantas, e bioindicadores de resposta, que demonstram efeitos foliares, que podem ser atribuídos a poluentes atmosféricos específicos (Vike, 2005).

A compreensão dos efeitos do flúor nas características anatômicas e fisiológicas das espécies sensíveis, permite a seleção de biomarcadores para a poluição por flúor, os quais são de fundamental importância na identificação dos danos no meio ambiente em programas de biomonitoramento (Klumpp et al., 2001; Sant'Anna-Santos et al., 2012). Muitas empresas usaram plantas como bioindicadores, através de sistemas de monitoramento da qualidade do ar em rede implementado na Europa, para coletar dados sistemáticos em certas cidades da Europa (Rodriguez et al., 2015). Assim, criar um inventário de resposta padronizado com as espécies bioindicadoras selecionadas para os diferentes poluentes (Klumpp et al., 2001; Anjos et al., 2018). No Brasil, existe uma lacuna de estudos sobre o efeito do flúor nas espécies nativas, principalmente do cerrado brasileiro, dificultando a implantação de estações de monitoramento ambiental nessa região.

Diante disso, torna-se essencial o estudo de bioindicadores da poluição do ar com flúor. Para isso, a seleção de espécies com potencial para bioindicação é primordial. Assim, as espécies *Eugenia dysenterica* e *Sapindus saponaria* L., são indivíduos amplamente distribuídas no Brasil, de fácil e rápida identificação e com representantes da mesma família já citados como bioindicadores de poluentes (Lorenzi, 2002; ITIS, 2018). No entanto, não há, até o presente momento, estudos sobre o efeito do flúor na morfologia, anatomia e fisiologia de *E. dysenterica* e *S. saponaria*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anjos, T.B.O., Louback, E., Azevedo, A.A., Silva, L.C., 2018. Sensibility of *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) exposed to fluoride-simulated fog. *Ecol. Indic.* 90, 154-163.
- Bhatnagar, A., Kumar, E., Sillanpaa, M., 2011. Fluoride removal from water by adsorption. A review, *Chem. Eng. J.* 171, 811– 840.
- 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. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062002000400003>.
- De Temmerman, L., Bell, J.N.B., Garrec, J.P., Klumpp, A., Krause, G.H.M., Tonneijck, A. E. G., 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. 337-73.
- Fordyce, F.M., Vrana, K., Zhovinsky, E., Povoroznuk, V., Toth, G., Hope, B.C., Iljinsky, U., Baker, J., 2007. A health risk assessment for fluoride in Central Europe. *Environ. Geochem. Health.* 29. 83-102.
- Gurgatz, B.M., Carvalho-Oliveira, R., Oliveira, D.C., Jouscoski, E., Antoniaconi, G., Saldiva, P.H.N., Reis, R.A., 2016. Atmospheric metal pollutants and environmental injustice: A methodological approach to environmental risk analysis using fuzzy logic and tree bark. *Ecol. Indic.* 71, 428–437.
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System), 2018 “*Sapindus saponaria* L.” <http://www.itis.gov> (accessed 18 january 2018).
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Fomin, A., 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede europeia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). *Brazil. J. Bot.* 24, 511–518.
- Lorenzi, H., 2002. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2 ed. São Paulo: Nova Odessa. 368.

- Marcó, M., Tobiszewski, M., Zabiegała, B., Guardia, M., De, L., Namiesnik, J., 2015. Current air quality analytics and monitoring: a review. *Anal. Chim. Acta* 853, 16–126, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.018>.
- Mukherjee, S., Halder, G., 2016. Assessment of fluoride uptake performance of raw biomass and activated biochar of *Colocasia esculenta* stem: optimization through response surface methodology, *Environ. Prog. Sustain. Energy*. 35,1305-1316.
- Murray, J.J., 1986. Appropriate use of fluorides for human health. Geneva World Health Organ. Available at: [www.who.int/iris/handle/10665/39103](http://www.who.int/iris/handle/10665/39103).
- Oliva, M.A., Figueiredo, J.G., 2005. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. *Rev. Bras. Bot.* 28, 389–397. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000200017>.
- Rodrigues, D.A., Vasconcelos-Filho, S.C., Rodrigues, A.A., Müller, C., Farnese, F. S., Costa, A.C., Teles, E.M.G., Rodrigues, C.L., 2018. *Byrsonima basiloba* como bioindicador de poluentes atmosféricos simulados: Alterações morfo-anatômicas e fisiológicas em resposta ao potássio fluoride. *Ecol. Indic.* 89, 301-308.
- Rodriguez, J.H., Wannaz, E.D., Franzaring, J., Klumpp, A., Fangmeier, 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.
- 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. Ciênc.* 84, 689–702. [Doi.org/10.1590/S0001-37652012005000048](https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000048).
- 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 aluminum smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. *Water Air Soil Pollut.* 225, 1817. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1817-5>.
- Vike, E., 1999. Air-pollutant dispersal patterns and vegetation damage in the vicinity of three aluminium smelters in Norway. *Science of the Total Environment* 236, 75–90.
- Vike, E., 2005. Uptake, deposition and wash off of fluoride and aluminium in plant foliage in the vicinity of an aluminium smelter. *Water, Air and Soil Pollution* 160, 145–159.
- Weinstein, L.H., Davison, A., 2004. Fluorides in the Environment: Effects on Plants and Animals. CABI Publishing, Oxford, pp. 287.

Zouari, M., Ben Ahmed, Ch., Labrousse, P., Ben Rouina, B., Ben Abdallah, F., 2014. Soil fluoride contamination effects on olive tree (*Olea europaea* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.022>

Zouari, M., Elloumi, N., Bellassoued, K., Ahmed, C.B., Krayen, M., Delmail, D., Elfeki, A., Rouina, B.B., Abdallah, F.B., Labrousse, P., 2017. Enzymatic antioxidant responses and mineral status in roots and leaves of olive plants subjected to fluoride stress. *South African J. Bot.* 111, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.039>.

## OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da toxicidade da chuva simulada com fluoreto de potássio, através de respostas morfoanatômicas e fisiológicas nas folhas de *Eugenia dysenterica* e *Sapindus saponaria*, para caracterizar as espécies como um bioindicador potencial do poluente e aumentar o conhecimento das respostas das plantas ao flúor.

## **CAPÍTULO I: EFEITO DA CHUVA SIMULADA COM FLUORETO DE POTÁSSIO NA MORFOANATOMIA E FISIOLOGIA DE *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC**

**(Artigo Aceito na Revista Ecological Indicators)**

### **Resumo**

O flúor é encontrado na atmosfera principalmente na forma de ácido fluorídrico, liberado por indústrias ligadas à produção de alumínio, vidros e cerâmicas, além de fertilizantes fosfatados. É um elemento de elevada toxicidade, bastante prejudicial ao crescimento das plantas. A espécie *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC. (Myrtaceae) é uma árvore frutífera nativa do Cerrado brasileiro, com grande distribuição em regiões antropizadas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de bioindicação de *E. dysenterica* a chuva simulada de fluoreto de potássio (KF). Os danos causados pela toxidez do KF foram analisados via alterações morfoanatômicas e fisiológicas nas folhas. Plantas jovens com aproximadamente 40 dias de idade, foram selecionadas a partir da padronização da altura (~14 cm) e transplantadas individualmente para vasos contendo 5 kg de substrato composto por areia lavada, vermiculita e bioplant<sup>®</sup> (1:1:1). As plantas foram submetidas diariamente ao KF, em chuva simulada nas concentrações de 0, 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup> de KF, por um período de 27 dias. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, cada repetição composta por 1 planta cada, ou seja, 4 plantas por tratamento. Após o período de exposição ao KF, as folhas de *E. dysenterica* foram avaliadas visualmente, fisiologicamente e fragmentos foliares foram coletados para análise anatômica. *E. dysenterica* apresentou formação de necroses na face adaxial, a partir da borda para o centro, e degradação dos tecidos com formação de plasmólise e alongamento celular, intensificados com o aumento da dose de KF. Os teores de

clorofila e os parâmetros fotoquímicos obtidos através da fluorescência da clorofila *a*, indicaram danos severos no fotossistema II com o incremento das doses de KF. Os resultados obtidos com a exposição de *E. dysenterica* ao fluoreto, permite caracterizar a espécie como potencial bioindicadora de reação ao poluente podendo ser empregada posteriormente em programas de biomonitoramento ambiental.

**Palavras-chave:** Bioindicador; Cerrado; Flúor; Poluição.

## 1. Introdução

A poluição atmosférica causada pelo rápido avanço da industrialização tornou-se uma preocupação global (Du et al., 2018). A atividade, principalmente de fábricas de tijolos, cerâmicas e fertilizantes fosfatados localizadas em áreas próximas a reservas permanentes do Cerrado, contribui para a emissão de flúor para atmosfera nessas regiões (Fortes et al., 2003). A contaminação do ar pela produção de fertilizantes fosfatados, deve-se às impurezas das rochas fosfatadas utilizadas como matéria-prima, que liberam flúor (F), arsênio e cádmio, entre outros (Sauerbeck, 1992). Na produção desses fertilizantes, parte do F é perdida na atmosfera durante o processo de acidificação, de modo que a concentração de F no fertilizante é reduzida, além de ser diluída com outros componentes, tais como superfosfato e fosfato amoníaco (McLaughlin et al., 1996). No entanto, pouco se sabe sobre os danos causados pelo flúor nas plantas nativas do Cerrado.

O fluoreto liberado na atmosfera pode ser depositado nas plantas na forma gasosa o qual é absorvido através dos estômatos e, por toda a superfície foliar quando exposto em solução aquosa, como através da chuva (Miller, 1993; Chaves et al., 2002). Ao penetrar no tecido, o flúor tem sido descrito por provocar descoloração do limbo foliar até a formação de necrose na faixa apical das folhas (Fortes et al., 2003; Sant'Anna-Santos et al., 2012), acarretando deformações ou colapso nas células (Singh-Rawal et al., 2010). Assim, processos vitais na planta como fotossíntese e respiração são alterados em decorrência a exposição ao flúor (Miller e Miller, 1974; Divan Junior et al., 2007).

O flúor é considerado um dos poluentes mais fitotóxicos para o ambiente, mesmo quando presente em baixa dosagem, pois persiste por muito tempo no ar, no solo e na água, afetando negativamente todos os níveis do ecossistema (Oliva e

Figueiredo, 2005; Jha et al., 2009; Brougham et al., 2013; Baunthiyal e Sharma, 2014). No entanto, os efeitos deste poluente nas plantas dependem de vários fatores, como concentração, tempo de exposição, estágio de desenvolvimento, temperatura e intensidade luminosa (Greenwood, 1956).

O Brasil tem uma ampla biodiversidade de espécies de plantas com alto potencial de bioindicação de poluentes atmosféricos, principalmente para fluoreto, conforme relatado em *Joannesia princeps* e *Peltophorum dubium* (Silva et al., 2000), *Magnolia ovata* St. Hill (Sant'Anna-Santos, 2007), *Calopogonium mucunoides* e *Erigeron bonariensis* (Divan Junior et al., 2008).

*Eugenia dysenterica* (Mart.) DC. pertence à família Myrtaceae, popularmente conhecida como "cagaita", é uma árvore frutífera nativa do Cerrado brasileiro e possui características adaptativas para solos ácidos e pobres em nutrientes (Vieira Neto et al., 2009). É amplamente distribuída em regiões tropicais (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 2002), e ocorre naturalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Maranhão, Piauí e Goiás (Brito et al., 2003; Martinotto et al., 2008). Outras espécies da família Myrtaceae, como *Eugenia uniflora* L., já foi descrita como potencial bioindicador de poluentes atmosféricos por sua alta sensibilidade à exposição combinada de material particulado e chuva ácida (Neves et al., 2009).

No entanto, os efeitos tóxicos do fluoreto ainda não são bem conhecidos, bem como a resposta da planta ao flúor. Existem poucos estudos sobre as respostas anatômicas e fisiológicas das espécies arbóreas tropicais nativas expostas ao fluoreto (Tresmondi e Alves, 2011; Moura et al., 2014). O estudo das lesões de folhas de *Eugenia dysenterica* provocadas pelo flúor é importante para elucidar aspectos do seu possível uso em programas de biomonitoramento da qualidade ambiental do Cerrado. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da toxicidade do fluoreto, via chuva simulada, através de respostas morfoanatômicas e fisiológicas nas folhas de *Eugenia dysenterica*.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Material Vegetal, Condições de Cultivo e Tratamentos*

Sementes de *Eugenia dysenterica* foram obtidas a partir de 10 plantas adultas em plena produção, localizadas no município de Montes Claros, Goiás, Brasil (latitude 16° 06'20"S - longitude 51°17'11" W e altitude de 592 m). O espécime foi depositado no Herbário do Instituto Federal de Goiano (IF Goiano, Campus Rio Verde), sob número nº 630/2017. As sementes foram inicialmente tratadas com fungicida Vitavax®-Thiram (30%), sendo posteriormente semeadas em canteiros contendo areia lavada como substrato. O experimento foi conduzido em condições controladas, em casa de vegetação localizada no IF Goiano (latitude 17° 48' 16" S, longitude 50° 54' 19" W e altitude de 753 m).

Aproximadamente 40 dias após emergência, 16 plântulas foram selecionadas a partir da padronização da altura (~14 cm) e transplantadas individualmente para vasos de 5 L contendo substrato composto por vermiculita, areia lavada e Bioplant® (1:1:1). 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 (controle), 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup> adaptado de Silva et al. (2000) e Sant'Anna-Santos et al. (2007) por 27 dias consecutivos, com o intuito de simular a concentração de flúor observada nas adjacências de áreas poluídas (Smith e Hodge 1979). 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 pulverizadores manuais, com aplicação de 60 mL dia<sup>-1</sup> por planta, volume baseado na evapotranspiração média de plantas. Após 27 dias de exposição aos tratamentos, foram realizadas as avaliações visuais e fisiológicas, além da coleta de material vegetal para análises morfoanatômicas.

Utilizou-se 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. Avaliação dos sintomas foliares visíveis

Os sintomas visíveis foram caracterizados por fotografias de toda a superfície foliar de folhas completamente expandidas de *Eugenia dysenterica*, tiradas com câmera digital (Cyber-Shot HX100V, SONY, Japão), monitorados ao longo de todo período experimental. Para a confecção da prancha foi utilizado a folha que melhor representasse o efeito do tratamento com KF.

### 2.3. Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

As variáveis da fluorescência da clorofila *a* foram mensuradas utilizando fluorômetro (6400-40, Li-cor, Nebraska, EUA) acoplado ao IRGA (IRGA, LI-6400xt, Li-Cor, Nebraska, EUA) na última folha totalmente expandida. Inicialmente, as folhas foram adaptadas ao escuro (quando os centros de reação do fotossistema II (FSII) estão abertos) para obtenção da fluorescência mínima ( $F_0$ ) e máxima ( $F_m$ ), com a aplicação da luz de medição ( $\sim 0.03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e de um pulso de saturação ( $> 3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), respectivamente. O rendimento quântico potencial do fotossistema II foi determinado como  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  (Kitajima e Butler, 1975). Após iluminação com luz actínia contínua ( $\sim 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 40 s, um pulso de saturação foi aplicado para determinar a fluorescência máxima ( $F_m'$ ) e *steady-state* ( $F_s$ ) nas folhas adaptadas à luz. A partir dos dados obtidos, foi possível calcular o rendimento quântico efetivo do FSII ( $\Delta F/F_m' = [F_m' - F_s]/F_m'$ ). A partir dos dados obtidos foi possível calcular a dissipação não fotoquímica não regulada ( $q_N = [F_m - F_m']/[F_m - F_0]$ ) (Lichtenthaler et al., 2005), e regulada ( $NPQ = [F_m - F_m']/F_m'$ ), que estima a dissipação térmica pelo FSII (Maxwell e Johnson, 2000).

### 2.4. Determinação de clorofilas

A determinação dos teores de clorofilas *a*, *b* e totais foram realizadas em folhas completamente expandidas, utilizando clorofilômetro portátil (clorofiLOG, modelo CFL1030, Falker, Brasil).

### 2.5. Caracterização morfoanatômica foliar

Para as análises morfoanatômicas foram coletadas amostras foliares de  $3 \text{ cm}^2$  da região central da última folha totalmente expandida de todas as repetições ( $n=4$ ) de cada tratamento ( $n=4$ ) das plantas de *Eugenia dysenterica*. Inicialmente as amostras foram fixadas em Karnovsky (1965), por 24 horas. Após este período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e desidratado em série etílica crescente (30% a 100%), pré-infiltrado e infiltrado em historesina (Leica, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram seccionadas transversalmente a  $5 \mu\text{m}$  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 foram obtidas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão) acoplado com câmera DP-72 utilizando opção de campo claro. Posteriormente, foram realizadas observações morfoanatômicas da epiderme nas faces adaxial e abaxial, parênquima paliçádico, esponjoso e mesofilo. As medidas de micromorfometria foram obtidas a partir das imagens anteriores usando o software ImageJ (Processamento e Análise de Imagem em Java, v. 1.47, EUA) e dez observações por repetição foram medidas para cada estrutura avaliada. A localização do amido também foi realizada por coloração histoquímica com solução de lugol a 10 g L<sup>-1</sup> (Jensen, 1962).

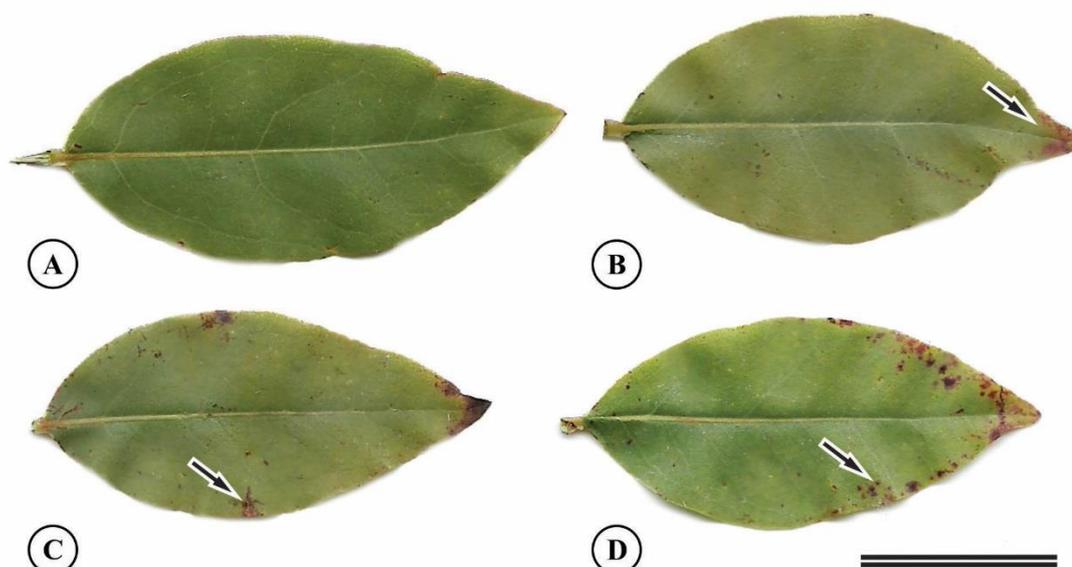
### *2.6. Análise estatística*

Os dados quantitativos foram submetidos a análises anteriores de homogeneidade de variância (teste Levene) e normalidade dos erros (teste Shapiro-Wilk). Com a normalidade dos dados confirmadas, foi realizado ANOVA, seguido pelo teste Dunnett, pelo software ASSISTAT v. 7.7.

## **3. Resultados**

### *3.1. Avaliação dos sintomas morfológicos*

O tratamento controle não apresentou danos na estrutura da folha (Figura 1A). Por outro lado, o fluoreto de potássio (KF), aplicado através de chuva simulada, causou pequenas áreas cloróticas no ápice da folha, começando pela menor concentração aplicada (10 mg L<sup>-1</sup> KF) (Figura 1B). Além disso, manchas amarelas, com aparência necrótica foram evidentes no ápice e nas bordas das folhas expostas a doses acima de 20 mg L<sup>-1</sup> KF (Figura 1C). Na concentração mais alta (30 mg L<sup>-1</sup> KF), foi possível observar o avanço da clorose na lâmina da folha e necrose ao longo de toda a borda da folha (Figura 1D).



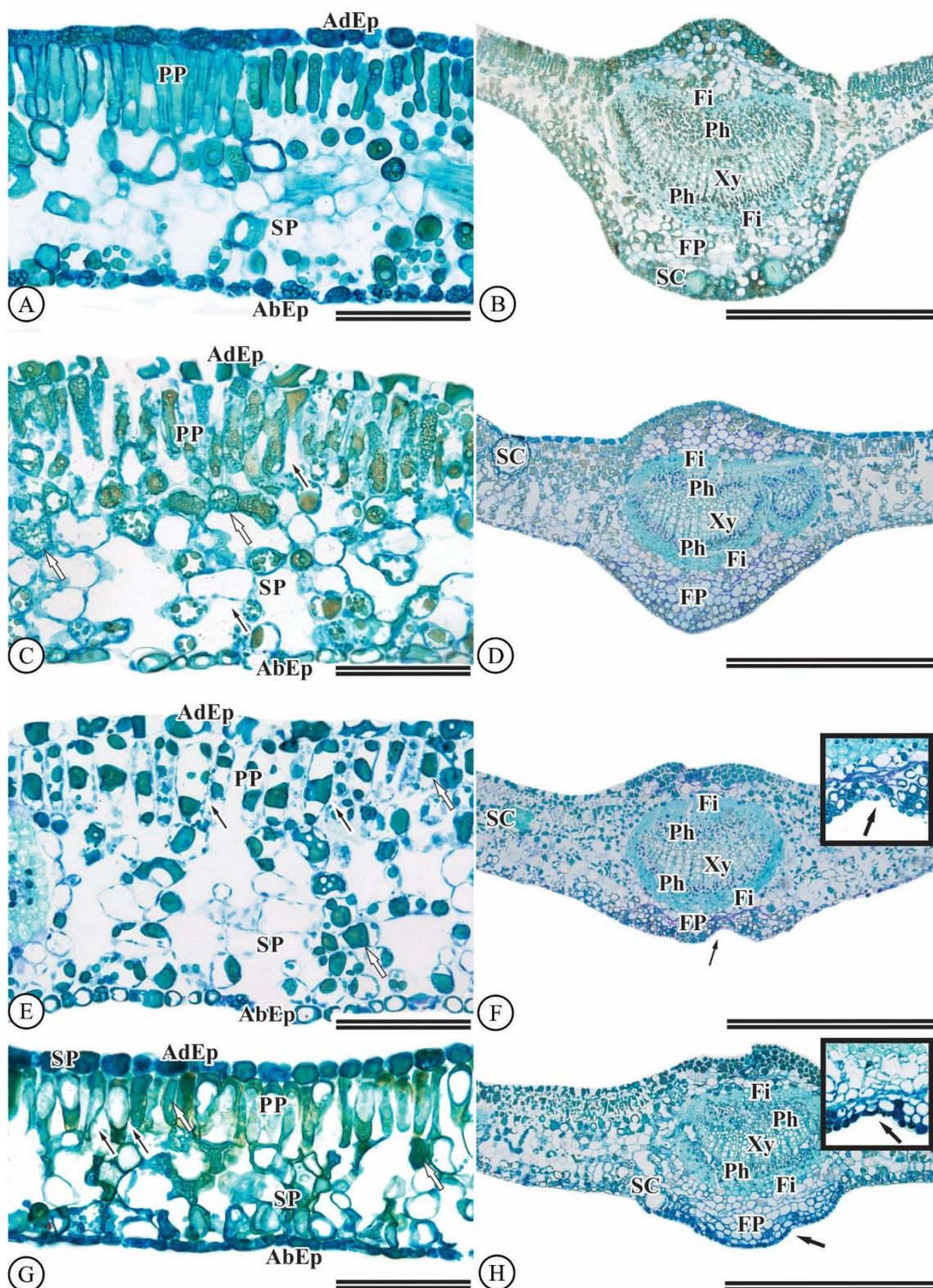
**Figura 1.** Sintomas visíveis nas folhas de *Eugenia dysenterica*, destacadas por setas pretas, após 27 dias de exposição a chuva simulada de fluoreto de potássio em diferentes concentrações: (A) controle. (B) 10 mg L<sup>-1</sup> KF. (C) 20 mg L<sup>-1</sup> KF. (D) 30 mg L<sup>-1</sup> KF. Barra de escala 2 cm.

### 3.2. Avaliação das alterações anatômicas

Em secção transversal da lâmina foliar, observou-se que a epiderme de *E. dysenterica* é uniestratificada em ambas as faces, sendo as células epidérmicas da face adaxial maiores que as da face abaxial (Figura 2A). Os estômatos ocorrem apenas na face abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática; além disso, mostram-se situados no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 2A-B). O parênquima clorofiliano é dorsiventral, sendo o parênquima paliçádico constituído por apenas uma estrato celular e o esponjoso por cerca de seis camadas de células (Figura 2A). Cavidades secretoras ocorrem geralmente logo abaixo da epiderme em ambas as faces e também na nervura mediana. A região da nervura mediana, em secção transversal, apresenta-se biconvexa, com sistema vascular bicolateral envolvido por fibras esclerenquimáticas (Figura 2B).

Os tratamentos com flúor causaram danos anatômicos em *E. dysenterica* (Figura 2C-H). No parênquima paliçádico e esponjoso foi observado colapso celular e acúmulo mais pronunciado de compostos fenólicos no parênquima esponjoso para o tratamento com 20 e 30 mg L<sup>-1</sup> KF, indicado pela coloração esverdeada do azul de toluidina

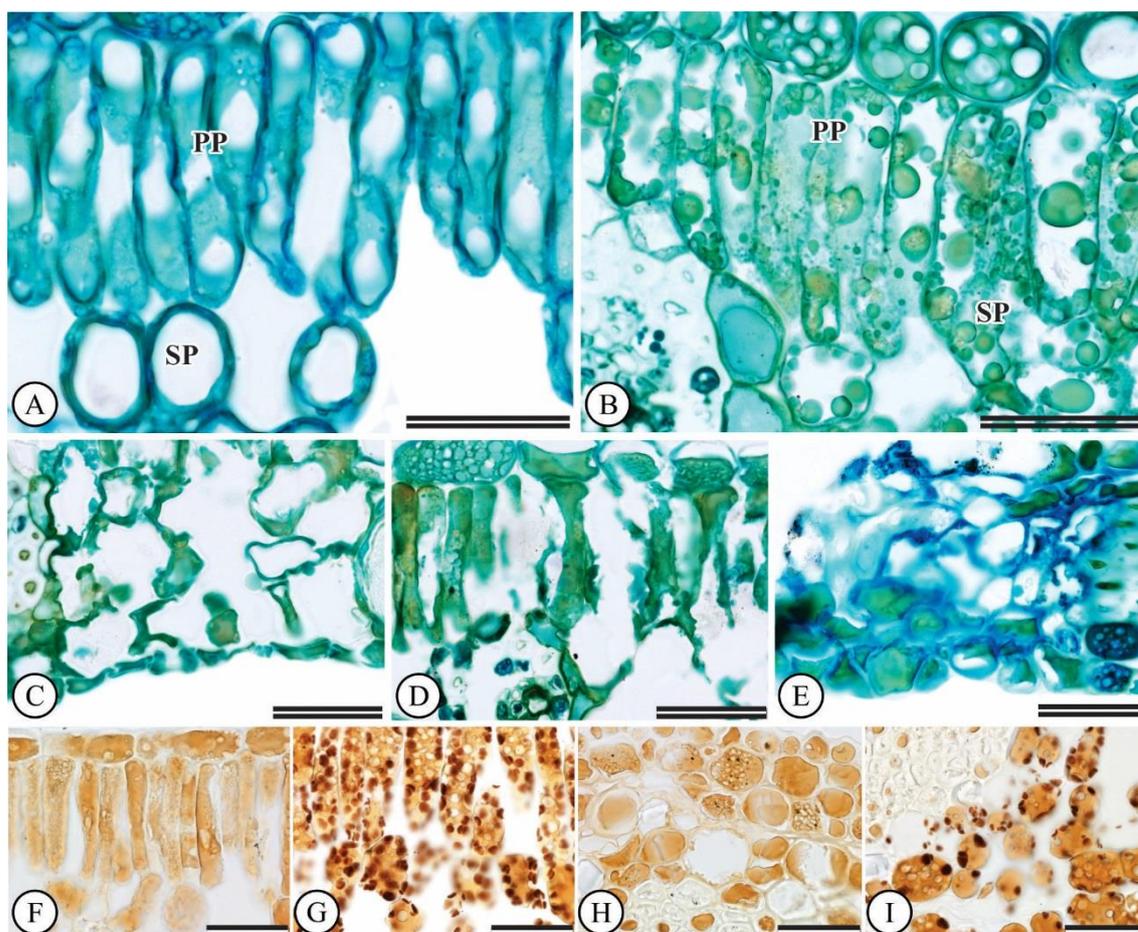
(Figura 2C, E, G), com retração da nervura (Figura 2D, F-H) quando comparado ao controle (Figura 2A, B).



**Figura 2.** Alterações anatômicas nas folhas de *Eugenia dysenterica*, após 27 dias de exposição à chuva simulada de fluoreto de potássio em diferentes concentrações. (A-B)

Controle, (C-D) 10 mg L<sup>-1</sup> KF, (E-F) 20 mg L<sup>-1</sup> KF, (G-H) 30 mg L<sup>-1</sup> KF. AdEp, epiderme adaxial. AbEp, epiderme abaxial; PP, parênquima paliçádico; SP, parênquima esponjoso; Fi, fibra; Xy, xilema; Ph, Floema; FP, parênquima fundamental. Setas brancas indicam compostos fenólicos. Setas pretas indicam colapso de células parenquimáticas. Setas pretas na região da nervura indicam retração de nervura. Barra de escala (A, C, E, G) 50 µm; (B, D, F, H) 500 µm.

Foram observados danos significativos na margem foliar de *E. dysenterica* com acumulação de compostos fenólicos (Figura 3B), colapso celular do parênquima clorofiliano (Figura 3C e D), plasmólise celular (Figura 3 D, E) na aplicação com 30 mg L<sup>-1</sup> de fluoreto, quando comparado ao controle (Figura 3A). No controle, células do parênquima clorofiliano e de preenchimento na região da nervura não continham grãos de amido (Figura 3F, H). Contudo, os grãos de amido foram acumulados abundantemente nas células com aplicação de 30 mg L<sup>-1</sup> KF (Figura 3G, I).



**Figura 3.** Alterações anatômicas nas folhas de *Eugenia dysenterica*, após 27 dias de exposição à chuva simulada de fluoreto de potássio. (A, F, H) controle; (B-E, G, I) 30

mg L<sup>-1</sup> KF. PP, parênquima paliçádico; SP, parênquima esponjoso. (B) acúmulo de compostos fenólicos. (C-D) colapso das células do parênquima clorofiliano. (E) plasmólise das células. (G-I) acúmulo de amido. Barras de escala 20 µm.

A exposição das plantas à chuva simulada de KF, em concentrações de 10, 20 mg L<sup>-1</sup>, apresentou efeitos negativos significativos sobre os parâmetros quantitativos avaliados na anatomia da folha, exceto para epiderme adaxial e abaxial (Tabela 1). Em plantas expostas às concentrações mais baixas, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup> KF, houve aumento na espessura do mesofilo em 36,9 e 76,7%, respectivamente, e redução (8,9%) para a maior concentração 30 mg L<sup>-1</sup> KF, em relação ao controle. Os parênquimas paliçádico e esponjoso também apresentaram aumento médio de 75,1 e 67,6% na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> KF e redução de 8,7 e 10,4% em plantas tratadas com 30 mg L<sup>-1</sup> KF (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito do flúor na estrutura foliar de *Eugenia dysenterica*, após 27 dias de exposição ao fluoreto de potássio (KF) em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>).

KF	Ep. adaxial (µm)	Ep. abaxial (µm)	P. paliçádico (µm)	P. esponjoso (µm)	Mesofilo (µm)
0 mg L <sup>-1</sup>	12,32±1,60	8,43±0,88	40,52±8,35	69,45±0,48	108,61±4,72
10 mg L <sup>-1</sup>	14,14±0,42	8,97±0,56	49,40±6,66	96,34** ±17,57	148,66** ±7,58
20 mg L <sup>-1</sup>	12,51±0,86	8,19±0,17	70,48** ±2,99	116,40** ±10,43	191,93** ±8,04
30 mg L <sup>-1</sup>	12,99±0,66	7,36±0,87	37,00±4,37	62,53±6,93	98,91±4,77
F	ns	*	**	**	**
CV (%)	7,62	8,32	12,07	12,52	4,72

Média ± DP (n = 4), os asteriscos na mesma coluna indicaram diferenças significativas (\* p<0,05) e significativas (\*\* p<0,01) em relação ao controle de acordo com o teste de Dunnett. (ns) não significativo.

O teor de clorofila foi reduzido com o aumento das concentrações de KF (Tabela 2). Em média, houve redução de 17% na clorofila *a* e clorofila total no tratamento com 30 mg L<sup>-1</sup> de KF (Tabela 2).

**Tabela 2.** Clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais em plantas de *Eugenia. Dysenterica*, após 27 dias de exposição ao fluoreto de potássio (KF) em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>).

KF	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofilas totais
0 mg L <sup>-1</sup>	24,89±0,45	6,5±0,44	31,40±0,78
10 mg L <sup>-1</sup>	23,73±1,92	5,72±0,85	30,14±3,00
20 mg L <sup>-1</sup>	24,35±1,16	5,95±0,66	30,69±2,11
30 mg L <sup>-1</sup>	21,18*±2,07	5,04±1,25	26,22*±3,12
F	*	ns	*
CV (%)	6,56	14,75	8,23

Média ± DP (n = 4), os asteriscos na mesma coluna indicam diferenças significativas (\* p≤0,05) e significativas (\*\* p≤0,01) em relação ao controle de acordo com o teste de Dunnett. (ns) não significativo.

### 3.3. Alterações fotoquímicas

O rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm) e o rendimento quântico efetivo do FSII ( $\Delta F/F_m'$ ) foram drasticamente reduzidos com o aumento das concentrações de KF (Tabela 3). O quenching não fotoquímico (qN) mostrou aumento de 37% nas plantas expostas ao tratamento de 30 mg L<sup>-1</sup>, em relação ao controle (Tabela 3). Com a aplicação de doses de KF houve aumento de (98%) na dissipação não fotoquímica, que estima a constante de taxa de perda de calor do FSII (NPQ), na maior concentração aplicada (Tabela 3).

**Tabela 3.** Rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo do FSII quando os centros de reação estão reduzidos (FSII) ( $\Delta F/F_m'$ ), quenching não fotoquímico (qN) e dissipação não fotoquímica (NPQ) em *Eugenia dysenterica*, após 27 dias de exposição ao fluoreto de potássio (KF) em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>).

KF	Fv/Fm	$\Delta F/F_m'$	qN	NPQ
0 mg L <sup>-1</sup>	0,80 ± 0,01	0,24 ± 0,05	0,63 ± 0,07	1,00 ± 0,36
10 mg L <sup>-1</sup>	0,77 ± 0,01**	0,19 ± 0,04	0,65 ± 0,18	1,15 ± 0,67
20 mg L <sup>-1</sup>	0,76 ± 0,01**	0,16 ± 0,05*	0,68 ± 0,08	1,12 ± 0,28
30 mg L <sup>-1</sup>	0,76 ± 0,02**	0,13 ± 0,01*	0,86 ± 0,04*	1,98 ± 0,16*
F	**	*	*	*
CV (%)	1,73	23,28	13,43	31,59

Média ± DP (n = 4), os asteriscos na mesma coluna indicaram diferenças significativas (\* p≤0,05) e significativas (\*\* p≤0,01) em relação ao controle de acordo com o teste de Dunnett.

#### 4. Discussão

A chuva simulada com solução de fluoreto de potássio (KF) ocasionou danos severos na anatomia, fisiologia e morfologia das plantas de *Eugenia dysenterica*. Acredita-se que o KF ao entrar em contato direto com a cutícula, é absorvido pelas células da epiderme, podendo ser acumulado no mesofilo, acarretando em danos nas estruturas parenquimáticas (Oliva e Figueiredo, 2005). No entanto, os mecanismos precisos de absorção de F nas células ainda não foram totalmente explorados (Yadu et al., 2016). Na planta, por ser eletronegativo, o F pode se ligar ao  $Mg^{2+}$  reduzindo a atividade de enzimas originando complexos denominados “metal-fluorine”, responsáveis pelo aparecimento de zonas sem coloração em algumas porções das folhas (Heath, 1989; Saleh e Abdel-Kader, 2003). O primeiro sítio de ação de injúria do fluoreto é o tonoplasto, atuando na remoção do Ca e Mg da membrana, alterando sua permeabilidade, levando a desintegração do citoplasma e organelas (Wei, 1972). Além disso acredita-se que ao afetar a função Ca na planta o KF impossibilita o crescimento celular danificando a regulação estomática e a percepção de luz.

O KF via chuva simulada tem sido descrito por promover alterações epidérmicas como erosão de ceras epicuticular e danos estomáticos em *Spondias dulcis* (Sant’Anna-Santos et al., 2007), favorecendo a absorção do F por todo limbo foliar; ou ainda, absorvido como rota preferencial via tricomas, como observado em *Brachiaria decumens* (Pita-Barbosa et al., 2009). Uma vez no mesofilo, o F altera a conformação dos parênquimas paliçádico e esponjoso. O aumento da espessura do mesofilo em baixas doses foi associado ao acúmulo de exsudato de pectinas observado em um estudo com ozônio (Günthardt-Goerg et al., 1997), podendo indicar um mecanismo de desintoxicação em plantas expostas a poluentes atmosféricos. Long e Naidu (2002) descobriram que o aumento da matriz aquosa da parede celular parece conter compostos como o ascorbato, poliaminas, as glutationas e as enzimas que ajudam na eliminação de poluentes, bem como as espécies reativas de oxigênio. Na dose mais elevada ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ), a lesão induzida por F aumentou a ruptura marcada da epiderme e o colapso celular, e pode ser em virtude dos efeitos de F na composição da membrana, como observado em *Pinus banksiana* (Zwiazek e Shay, 1988). Assim, a espessura do mesofilo é reduzida e os danos na estrutura das células parenquimáticas podem implicar em menos superfície apoplástica disponível para reações de defesa (Dizengremel et al., 2013). Essas alterações anatômicas têm sido frequentemente utilizadas como subsídio para

comparação da susceptibilidade entre espécies expostas a simulação de chuva ácida (Sant'Anna-Santos et al., 2006; 2007; 2014)

A aplicação de KF via chuva simulada, aumenta a atividade de enzimas do sistema antioxidante, a partir de 48 horas (Peixoto et al., 2005). O tempo de exposição e a severidade do estresse, no entanto, ocasionam redução no sistema antioxidante pela desintoxicação não eficiente (Fornasiero, 2001), levando ao surgimento de sintomas como clorose e necrose. Assim, os sintomas foliares clorose e necrose são reconhecidos como os primeiros a serem diagnosticados na planta exposta ao fluoreto (Baunthiyal et al., 2014; Zouari et al., 2014). Isso leva a formação de necrose no lado adaxial das folhas de *E. dysenterica*, evidenciadas por deformações na estrutura anatômica e acumulação de compostos fenólicos. Assim, o acúmulo de fenólicos em resposta a doses de KF em *E. dysenterica* pode ser indicativo de estresse oxidativo (Louback et al., 2016), aumentando a formação de necrose e alterando a fisiologia e anatomia das folhas com aplicação de 20 e 30 mg L<sup>-1</sup> de KF.

A absorção de fluoreto em *E. dysenterica* acarretou alterações gradativas, com o incremento das doses de KF, no rendimento quântico do fotossistema II das plantas expostas ao poluente. Alterações fotoquímicas foram relatadas em plantas de *Populus deltoides* (Singh et al., 2013) e *Camellia sinensis* (Cai et al., 2016) sob exposição ao fluoreto. Esses danos comprometem a eficiência de conversão da luz absorvida em energia química e fotossíntese das plantas (Divan Junior et al., 2007; Singh et al., 2010) e, por conseguinte, crescimento (Fornasiero, 2003; Mesquita et al., 2011). Para evitar o estresse, as plantas utilizam mecanismos alternativos para dissipar o excesso de energia, dentre os quais destacam-se a dissipação de elétrons pela fotorrespiração (Genty et al., 1989; Arena et al., 2016) e dissipação térmica (Pinnola et al., 2013). Este último observado pelo aumento do NPQ, descrito como mecanismo protetor do FSII contra fotoinibição (Liu et al., 2007). Dessa forma, a análise da fluorescência da clorofila *a* constitui bom indicador do estado do fotossistema II e de sua operação (Luttge, 2008), pois agentes estressores como o flúor podem influenciar o estado funcional (Baker e Rosenqvist, 2004) e taxa de transporte de elétrons (Baunthiyal e Sharma, 2014) na membrana dos tilacoides.

Apesar da ativação de mecanismos fotoprotetores, dependendo da intensidade e duração do estresse, eles podem não ser efetivos para prevenir danos fisiológicos nas plantas. O excesso de energia não utilizado nos estágios fotoquímicos pode resultar na formação de espécies reativas, promovendo o estresse oxidativo nas plantas (Calatayud

et al., 2003 e 2007), como observado pela redução das clorofilas *a* e *b*, importante na regulação do FSII, através de complexos de clorofila-proteína e interconversões no ciclo da clorofila (Morais et al., 2007). Esse desequilíbrio pode levar ao aumento da energia da luz que é transferida da clorofila para o oxigênio, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e danos nos tecidos (Powles, 1984; Dietz e Pfannschmidt, 2011). Além de comprometer a fotossíntese das plantas, o tratamento com KF promoveu o acúmulo de grãos de amido nas células das folhas de *E. dysenterica*, indicando inibição na translocação de carboidratos, como observado com outros poluentes atmosféricos (Rennenberg et al., 1996). Na resposta ao estresse pelo fluoreto, há redução na atividade da amilase, que limita a hidrólise e a translocação do amido (Karbassi et al., 1971; Rennenberg et al., 1996). Além disso, a inibição da respiração, como já foi descrito pelo tratamento com flúor (Baunthiyal e Ranghar, 2014) também pode estar relacionada ao acúmulo de amido nos cloroplastos.

A formação de necrose foliar como características visíveis associadas a alterações anatômicas e fisiológicas são bons indicadores da ação do flúor em *E. dysenterica*. Essas avaliações podem ser fundamentais para explicar os danos causados na planta exposta ao fluoreto de potássio e para auxiliar nos programas de biomonitoramento deste poluente.

## **Conclusão**

Neste estudo, avaliou-se que o KF via chuva simulada é tóxico para plantas de *Eugenia dysenterica*. Em geral, a viabilidade celular, indicada pelas alterações anatômicas da folha e alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, foram afetadas negativamente pelo fluoreto. Além disso, a presença de compostos fenólicos e a acumulação de amido nas folhas expostas ao KF sugerem a resposta da planta ao estresse oxidativo. Assim, a espécie em estudo tem alto potencial de bioindicação ao KF podendo ser empregada posteriormente em estudos de monitoramento ambiental. No entanto, pesquisas adicionais sobre os efeitos do flúor são necessárias para entender o mecanismo exato da resposta das plantas ao flúor.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiano (IFGoiano-RV, concessão nº DPPG 026/2016) por fornecer apoio financeiro. AA Rodrigues e C Müller agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e LS Rehn ao IFGoiano, para bolsas de estudo.

### Referências

- Almeida, S.P., Proença, C.E.B., Sano, S.M., Ribeiro, J.F., 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. EMBRAPA, editor. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados; Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 464.
- Arena, C., Tsonev, T., Doneva, D., Micco, V. De., Michelozzi, M., Brunetti, C., Centritto, M., Fineschi, S., Velikova, V., Loreto, F., 2016. The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L. Environ. Exp. Bot. 130, 122-132. Doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.014.
- 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:10.1093/jxb/erh196.
- Baunthiyal M., Sharma V., 2014. Response of three semi-arid plant species to fluoride; consequences of chlorophyll Florescence. Int. J. Phytorem. 16, 397-414. Doi: 10.1080/15226514.2013.783790.
- Baunthiyal, M., Ranghar, S., 2014. Physiological and biochemical responses of plants under fluoride stress: an overview. Fluoride 47, 287-293.
- Baunthiyal, M., Bhatt, A., Ranghar, S., 2014. Fluorides and its effects on plant metabolism. J. Agric. Technol. 10, 1-27.
- Brito, M.A., Pereira, E.B.C., Pereira, A.V., Ribeiro, J.F.R., 2003. Cagaita: biologia e manejo. Embrapa Cerrados. 80 p. Brougham, K.M., Roberts, S.R., Davison, A.W., Port, G. R., 2013. The impact of aluminium smelter shut-down on the concentration of fluoride in vegetation and soils. Environ. Pollut. 178, 89-96. Doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.007.
- 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.

- Calatayud, A., Iglesias, D., Talón, M., Barreno, E., 2003. Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant. Physiol. Biochem.* 41, 839–845. Doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00123-2.
- Calatayud, V., Cerveró, J., Sanz, M.J., 2007. Foliar, physiological and growth responses of four maple species exposed to ozone. *Water Air Soil Pollut.* 185, 239–254. Doi: 10.1007/s11270-007-9446-5.
- Chaves, A.L.F., Silva, E.A.M., Azevedo, A.A., Cano, M.A.O., Matsuoka, K., 2002. Ação do Fluorine 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.
- Dietz, K.J., Pfannschmidt T., 2011. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. *Plant physiol.* 155, 1477-1485. Doi.org/10.1104/pp.110.170043.
- 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: 10.1016/j.ecoenv.2006.06.002.
- Dizengremel, P., Jolivet, Y., Tuzet, A., Ranieri, A., Le Thiec, D., 2013. Integrative leaf level ozone phytotoxic ozone dose assessment for forest risk modeling. *Dev. Environ. Sci.* 13, 267. Doi: 10.1016/B978-0-08-098349-3.00013.
- Du, W., Li, X., Chen, Y., Shen, G., 2018. Household air pollution and personal exposure to air pollutants in rural China e A review. *Environ. Pollut.* 237, 625-638.
- Fornasiero, R.B., 2001. Phytotoxic effects of fluorides. *Plant. Sci.* 161, 979-985. Doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00499.
- Fornasiero, R.B., 2003. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. *Plant. Sci.* 165, 507-513. Doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00205.
- Fortes, C., Duarte, A.P., Matsuoka, S., Hoffmann, H.P., Lavorenti, N.A., 2003. Toxicidade de Flúor em cultivares de milho em área próxima a uma indústria de cerâmica, Araras (SP). *Bragantia.* 62, 275-281. Doi.org/10.1590/S0006-87052003000200013.

- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 990, 87–92. Doi:10.1016/S0304-4165(89)80016-9.
- Greenwood, D.A., 1956. Some Effects of Inorganic Fluoride on Plants, Animals, and Man. USU Faculty Honor Lectures. Paper 41. [http://digitalcommons.usu.edu/honor\\_lectures/4](http://digitalcommons.usu.edu/honor_lectures/4).
- 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. J. For. Res.* 27, 453-463.
- Heath, R.L., 1989. Alteration of chlorophyll in plants upon air pollutant exposure. in: *Biological Markers of Air-Pollution Stress and Damage in Forests*, National Academic Press, Washington, DC. 347-356.
- Jensen, W. A., 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: WH Freeman. 408p.
- Jha, S.K., Nayak, A.K., Sharma, Y.K., 2009. Fluoride toxicity effects in onion (*Allium cepa* L.) grown in contaminated soils. *Chemosphere.* 76, 353–356. Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.044.
- Karbassi, P., Garrard, L., West, S., 1971. Reversal of low temperature effects on a tropical plant by gibberellic acid. *Crop. Sci.* 11, 755–757.
- 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.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Knapp, M., 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R<sub>Fd</sub> of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica.* 43, 379-393.
- Liu, J., Zhou, G., Yang, C., Ou, Z., Peng, C., 2007. Responses of chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle in leaves of *Schima superba* Gardn e Champ. And *Pinus massoniana* Lamb, to simulated acid rain at Dinghushan biosphere. China. *Acta Physiol. Plant.* 29, 33-38. Doi: 10.1007/s11738-006-0005-2.
- 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., 2002. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2 ed. São Paulo: Nova Odessa. 368.
- 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 Brasil. Ecol. Indic. 64, 193-203. Doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.044.
- Luttge, U., 2008. Physiological ecology of tropical plants. New York; Springer. 458p.
- Martinotto, C., Paiva, R., Soares, F. P., Santos, B. R., Nogueira, R. C., 2008. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). Lavras: Editora UFLA. 21 p. Boletim Técnico nº 78.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. J. Exp. Bot. 345, 659-668.
- McLaughlin, M.J., Tiller, K.G., Nacdu, R., Stevens, D.P., 1996. Review: the behavior and environmental impact of contaminants in fertilizers. Aust. J. Soil. Res. 34,1-54. Doi: 10.1071/SR9960001.
- Mesquita, G.L., Tanaka, F.A.O., Cantarella, H., Mattos Junior, D., 2011. Atmospheric absorption of fluoride by cultivated species. Leaf structural changes and plants growth. Water, Air Soil Pollut. 219, 143-156. Doi: 10.1007/s11270-010-0694-4.
- 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, 115–21. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1974.tb03737.
- Morais, R.R., Gonçalves, J.F.C., Júnior, U.M.S., Dunisch, O., Santos, A.L.W.S., 2007. Chloroplastid pigment contents and chlorophyll a fluorescence in amazonian tropical three species. Rev. Árvore. 31, 959-966. Doi.org/10.1590/S0100-67622007000500020.
- Moura, B.B., Souza, S.R., Alves, E.S., 2014. Response of Brazilian native trees to acute ozone dose. Environ. Sci. Pollut. Res Int, 21, 4220–4227. Doi: 10.1007/s11356-013-2326-1.
- 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 resting 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.
- 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.
- Peixoto, P.H.P., Pimenta, D.S., Antunes, F., 2005. Efeitos do Flúor de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. *Pesq. Agropec. Bras.* 40, 727-734. Doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800001.
- Pinnola, A., Dall'Osto, L., Gerotto, C., Morosinotto, T., Bassi, R; Alboresi, A., 2013. Zeaxanthin binds to light-harvesting complex stress-related protein to enhance nonphotochemical quenching in *Physcomitrella patens*. *Plant. Cell.* 25, 3519–3534. Doi: 10.1105/tpc.113.114538.
- Pita-Barbosa, A., Sant'anna-Santos, B. F., Silva, K. L.F., Azevedo, A.A., Rocha, D.I., 2009. Efeitos fitotóxicos do flúor na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich) Stapf e *Bhachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). *Acta. Bot. Bras.* 23, 1027-1033. Doi.org/10.1590/S0102-33062009000400012.
- Powles, S.B., 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 35, 15–44. Doi: 10.1146/annurev.pp.35.060184.000311.
- Rennenberg, H., Herschbach, C., Polle, A., 1996. Consequences of air pollution on shoot-root interactions. *J. Plant Physiol.* 148, 269-301.
- Rodrigues, A. A., Vasconcelos Filho, S. C., Rodrigues, D. A., Rodrigues, C. L., Sales, J. F., Vital, R. G., 2016. Influence of aluminum on root growth and of anatomy *Stenocalyx dysentericus* (DC.) O. Berg. *Afr. J. Biotech.* 15, 1193-1200. Doi: 10.5897/AJB2016.15383.
- Saleh A.H., Abdel-Kader Z., 2003. Metabolic responses of two *Helianthus annuus* cultivars to different fluoride concentrations during germination and seedling growth stages. *Egypt. J. Biol.* 5, 43-54.
- 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. Ciênc.* 84, 689–702. Doi.org/10.1590/S0001-37652012005000048.

- Sant'Anna-Santos, B.F., Duque-Brasil R., Azevedo, A.A., Silveira, A.S., Araujo, J.M., Aguiar, R., 2007. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do Flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). Rev. Árvore. 31. (4). 761-771. Doi.org/10.1590/S0100-67622007000400022.
- 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.
- Sauerbeck, D., 1992. Conditions controlling the bioavailability of trace elements and heavy metals derived from phosphate fertilizers in soils. In: Proceedings of International IMPHOS Conference on Phosphorus, Life and Environment. 419-448.
- Silva, L. C., Azevedo, A. A., Silva, E. A. M., Oliva, M. A., 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. Rev. Bras. Bot. 23, 385-393. Doi.org/10.1590/S0100-84042000000400004.
- Singh, M, Verma, K. K., Verna, C. L., 2013. An approach to develop a model for describing the influence of fluoride-contaminated irrigation water on physiological responses on poplar (*Populus deltoids* clone S7C15). Acta Physiol. Plant. 35, 3357-3364. Doi: 10.1007/s11738-013-1368-9.
- Singh-Rawal, P., Jajoo, A., Bharti, S., 2010. Fluoride affects distribution of absorbed excitation energy more in favour of photosystem 1. Biol Plant. 54, 556-560. Doi: 10.1007/s10535-010-0099-7.
- Smith, F.A., Hodge, H.C., 1979. Airborne fluorides and man: Part I. Crit Rev Environ Control. 8, 293-372.
- Tresmondi, T., Alves, E.S., 2011. Structural changes in *Psidium guajava* 'Paluma' leaves exposed to tropospheric ozone. Acta. Bot. Bras. 25, 542-548. Doi.org/10.1590/S0102-33062011000300005.
- Vieira Neto, R.D., Silva Junior, J.F.da., Ledo, A.da.S., Mangaba. In: Santos-Serejo, J.A. dos., Dantas, J.L.L., Coelho, C.V.S. Coelho, Y.da.S. (Org.), 2009. Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 323-338.
- Wei, L.L., 1972. Effects of Hydrogen Fluoride on Ultrastructure of Soybean Leaf Cells. Ph.D. Thesis, Utah State University 166.
- Yadu, B., Chandrakar, V., Keshavkant., 2016. Responses of plants to fluoride: an overview of oxidative stress and defense mechanisms. Res. Rev. Fluor. 49, 293-302.

- Zouari, M., Ahmed, C. D., Fourati, R., Delmail, D., Rouina, B. D., Labrousse, P., Aballah, F. D., 2014. Soil fluoride spiking effects on olive trees (*Olea europaea* L. cv. Chemlali). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 78-83. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.06.022.
- Zwiazek, J.J., Shay, J.M., 1988. The effects of sodium fluoride on cytoplasmic leakage and the lipid and fatty acid composition of jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings. *Can. J. Bot.* 66, 535–541. Doi: 10.1139/b88-076.

## **CAPÍTULO II: Potencial bioindicador de *Sapindus saponaria* a chuva simulada de fluoreto de potássio: traços anatômicos e fisiológicos**

**(Artigo aceito na revista Ecological Indicators)**

### **Resumo**

O flúor é um dos principais poluentes fitotóxicos lançados na atmosfera. Pode ser liberado na forma de fluoreto de potássio por fábricas de tijolos, cerâmicas, minerais fosfatados e alumínio, provocando danos em diferentes espécies de plantas. *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) possui ampla distribuição no Brasil, EUA, Argentina, e tem sido utilizada na recuperação de áreas degradadas e arborização urbana. Desta forma, objetivou-se determinar o potencial bioindicador de *S. saponaria* através de respostas morfoanatômicas e fisiológicas após chuva simulada com fluoreto de potássio. Plantas jovens de *S. saponaria*, com aproximadamente 50 dias foram tratadas com fluoreto de potássio (KF) através de chuva simulada diariamente nas concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40 mg L<sup>-1</sup>, pelo período de 19 dias consecutivos. A formação de necrose e clorose em *S. saponaria* foram evidenciadas a partir do 4º dia de aplicação do KF em todos os tratamentos testados, seguido de alterações dos tecidos parenquimáticos com colapso das células e acúmulo de compostos fenólicos e danos nas etapas fotoquímicas e bioquímicas da fotossíntese com o incremento das doses. Os sintomas visíveis associados às variáveis não invasivas como  $F_v/F_m$ ,  $\Delta F/F_m'$ , ETR,  $A$  e  $A/C_i$  mostraram ser importantes biomarcadores da ação do flúor. Além disso, as características avaliadas demonstraram que *S. saponaria* é altamente susceptível ao fluoreto de potássio, apresentando alto potencial de bioindicação a esse poluente.

**Palavras-chave:** fotossíntese; morfologia da folha; poluição do ar; toxicidade; plantas não alvo.

## 1. Introdução

Com o avanço da industrialização tem aumentado a incidência de contaminação por poluentes atmosféricos nos seres humanos e meio ambiente em todo o mundo (Mondal, 2017; Yepu et al., 2017). Dentre os principais poluentes, o flúor (F) é considerado um dos contaminantes de maior fitotoxicidade para o meio ambiente (Saini et al., 2012; Panda, 2015) e é lançado principalmente por fundições de alumínio, fertilizantes fosfatados e indústrias de tijolos (Cape et al., 2003). Mesmo com as regulamentações governamentais e o uso de filtros, a emissão desses compostos na atmosfera continua a ser um problema ambiental, levando a efeitos tóxicos nas plantas, até mesmo em baixas concentrações (Walna et al., 2013). Isso ocorre pela alta reatividade, biodegradabilidade e acumulação gradativa nas plantas expostas ao poluente F, ocasionando danos severos ao meio ambiente (Fornasiero, 2003).

Em contato com as plantas, a principal forma de absorção do flúor (F) ocorre através das folhas; quando em estado gasoso na atmosfera, é absorvido através dos estômatos (Sant'Anna-Santos et al., 2014) e, em solução aquosa, o flúor pode ser incorporado por toda a superfície foliar (Miller, 1993; Chaves et al., 2002). Ao penetrar na folha, o F move-se por vias apoplásticas, atingindo as margens e o ápice das folhas, e pode, ainda, ser acumulado no mesofilo causando lesões como colapso das células parenquimáticas que irão resultar em clorose e necrose (Pita-Barbosa et al., 2009; Rodrigues et al., 2017). Os efeitos do F incluem ainda alteração no metabolismo primário das plantas, como o processo fotossintético (Kamaluddin e Zwiazek, 2003) e na respiração (Miller e Miller, 1974), além de desencadear o estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zouari et al., 2017).

Para o controle da emissão de gases poluentes, como o F, torna-se importante a instalação de técnicas de monitoramento da poluição do ar em áreas industrializadas, como o uso de amostras de ar ativas ou passivas (Jochner et al., 2015). No entanto, essas técnicas são altamente onerosas, além da impossibilidade de qualquer equipamento estimar o potencial de toxicidade do poluente ao meio ambiente (Kovalchuk e Kovalchuk, 2008). Assim, o uso de bioindicadores da poluição do ar, através de plantas já existentes no entorno das indústrias, ou ainda plantadas para este fim, torna-se um meio eficaz e de baixo custo como estratégia de monitoramento e mitigação da poluição por poluentes atmosféricos (Sant'Anna-Santos et al., 2014; Louback et al., 2016). Para a realização do monitoramento ambiental é necessário

conhecer os efeitos do poluente nas espécies circundantes às áreas potencialmente poluidoras e estimar o potencial de bioindicação dessas espécies.

*Sapindus saponaria* L., pertencente à família Sapindaceae, é uma árvore nativa das Américas (Lorenzi, 2000; ITIS, 2018; USDA, 2018). Tem sido utilizada tanto para o paisagismo urbano quanto em modelos de recuperação de áreas degradadas (Román-Dañobeytia et al., 2011; Ferreira e Santos, 2012; Izquierdo et al., 2015; Horstman et al., 2018). Dentre as espécies dessa família, *Allophylus edulis* já foi descrito como bioremediador de solos contaminados (Nogueira et al., 2011). No entanto, não há, até o presente momento, estudos sobre o efeito do flúor na morfologia, anatomia e fisiologia de *S. saponaria*. Assim, objetivou-se avaliar o efeito do fluoreto de potássio, via chuva simulada, através de respostas morfoanatômicas e fisiológicas nas folhas de *S. saponaria*.

## 2. Material e Métodos

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

Sementes de *Sapindus saponaria* foram obtidas a partir de 10 plantas adultas em plena produção, localizadas no município de Rio Verde, Goiás, Brasil (latitude 17° 46' 30'' S – longitude 50° 57' 59'' W, e altitude de 784 m) em ambiente urbano. Um espécime foi depositado no Herbário do Instituto Federal de Goiano (IF Goiano, Campus Rio Verde), sob número nº 641/2017. As sementes foram inicialmente imersas em ácido sulfúrico concentrado por 90 min para quebra de dormência e tratadas com fungicida Vitavax®-Thiram (30%), sendo posteriormente semeadas em canteiros contendo areia lavada como substrato. O experimento foi conduzido em condições controladas, em casa de vegetação localizada no IF Goiano (latitude 17° 48' 16'' S, longitude 50° 54' 19'' W e altitude de 753 m).

Aproximadamente 50 dias após emergência, as plântulas foram selecionadas a partir da padronização da altura (~20 cm) e transplantadas individualmente para vasos de 5 L contendo substrato composto por vermiculita, areia lavada e Bioplant® (1:1:1). Após 10 dias de aclimatação, as plantas foram expostas à aplicação de solução líquida de fluoreto de potássio (KF, pH 6,0) nas concentrações de 0 (controle), 10, 20, 30 e 40 mg L<sup>-1</sup> adaptado de Silva et al. (2000) e Rodrigues et al. (2017) com o intuito de simular a concentração de flúor observada nas adjacências de áreas poluídas (Smith e Hodge

1979). 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 dia<sup>-1</sup> por planta, volume baseado na evapotranspiração média de plantas. Após 19 dias de exposição aos tratamentos, foram realizadas as avaliações visuais e fisiológicas, além da coleta de material vegetal para análises morfoanatômicas. O experimento foi finalizado ao 19º dia por causa dos danos severos apresentados no último tratamento, com o avanço rápido dos danos as plantas morreriam.

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos (concentrações de KF) e 4 repetições, cada repetição composta de um vaso contendo 1 planta (4 plantas por tratamento).

## 2.2. Avaliação dos sintomas foliares visíveis

Os sintomas foram caracterizados por fotografias de toda a superfície foliar de folhas completamente expandidas de *Sapindus saponaria*, tiradas com câmera digital (Cyber-Shot HX100V, SONY, Japão), monitorados ao longo de todo período experimental. Para a confecção da prancha foi utilizado a folha que melhor representasse o efeito do tratamento com KF.

## 2.3. Avaliação da caracterização morfoanatômica foliar

Para as análises morfoanatômicas foram coletadas amostras foliares de 3 cm<sup>2</sup> da região central da última folha totalmente expandida de todas as repetições (n=4) de cada tratamento (n=5) das plantas de *Sapindus saponaria*. Inicialmente as amostras foram fixadas em Karnovsky (1965), por 24 horas. Após este período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e desidratado em série etílica crescente (30% a 100%), 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 foram obtidas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão) acoplado com câmera DP-72 utilizando opção de campo claro. Posteriormente, foram realizadas observações

morfoanatômicas da epiderme nas faces adaxial e abaxial, parênquima paliçádico, esponjoso e mesofilo.

#### 2.4. Histolocalização de compostos fenólicos

Para descrição histoquímica de compostos fenólicos, amostras foliares da região do meio da última folha totalmente expandida de *S. saponaria* foram fixadas em solução de sulfato ferroso em formalina por 48 horas (Johansen, 1940). Após este período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e desidratado em série etílica crescente (30 a 100%), pré-infiltrado e infiltrado em historesina (Leica, Alemanha). Posteriormente, as amostras foram seccionadas transversalmente a 5  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen Scientific, China) e analisadas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão).

#### 2.5. Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

As variáveis da fluorescência da clorofila *a* foram mensuradas utilizando fluorômetro (6400-40, Li-cor, Nebraska, EUA) acoplado ao IRGA (IRGA, LI-6400xt, Li-Cor, Nebraska, EUA) na última folha totalmente expandida. Inicialmente, as folhas foram adaptadas ao escuro (quando os centros de reação do FSII estão abertos) para obtenção da fluorescência mínima ( $F_0$ ) e máxima ( $F_m$ ), com a aplicação da luz de medição ( $\sim 0.03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e de um pulso de saturação ( $> 3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), respectivamente. O rendimento quântico potencial do fotossistema II foi determinado como  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  (Kitajima e Butler, 1975). Após iluminação com luz actínia contínua ( $\sim 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 40 s, um pulso de saturação foi aplicado para determinar a fluorescência máxima ( $F_m'$ ) e *steady-state* ( $F_s$ ) nas folhas adaptadas à luz. A partir dos dados obtidos, foi possível calcular o rendimento quântico efetivo do FSII ( $\Delta F/F_m' = [F_m' - F_s]/F_m'$ ) e a taxa de transporte de elétrons ( $\text{ETR} = \Delta F/F_m' \times \text{PAR} \times 0,5 \times \text{ABS}_{\text{folha}}$ , em que PAR é o fluxo de fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nas folhas, 0,5 é a fração de energia de excitação direcionada ao FSII (Laisk e Loreto, 1996) e  $\text{ABS}_{\text{folha}}$  é a quantidade correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas. A partir dos dados obtidos foi possível calcular a dissipação não fotoquímica não regulada ( $\text{qN} = [F_m - F_m']/[F_m - F_0]$ ) (Lichtenthaler et al., 2005), e regulada ( $\text{NPQ} = [F_m - F_m']/F_m'$ ), que estima a dissipação térmica pelo FSII (Maxwell e Johnson, 2000; Baker, 2008).

## 2.6. Trocas gasosas

As trocas gasosas foram avaliadas na mesma folha em que os dados da fluorescência da clorofila *a* foram obtidos, para registro da taxa fotossintética ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e relação interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ). A partir desses valores, foi possível calcular a eficiência instantânea da carboxilação ( $A/C_i$ ) e a relação entre a taxa de transporte de elétrons e a assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $\text{ETR}/A$ ) (Ribeiro et al., 2009a; 2009b). As avaliações foram realizadas entre as 9h e 11h utilizando o IRGA, sob radiação fotossinteticamente ativa constante (PAR,  $1000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e concentração atmosf\u00e9rica de  $\text{CO}_2$  ( $C_a$ ,  $\sim 407 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), temperatura ( $\sim 26,7^\circ \text{C}$ ) e umidade relativa ( $\sim 71\%$ ) ambientes.

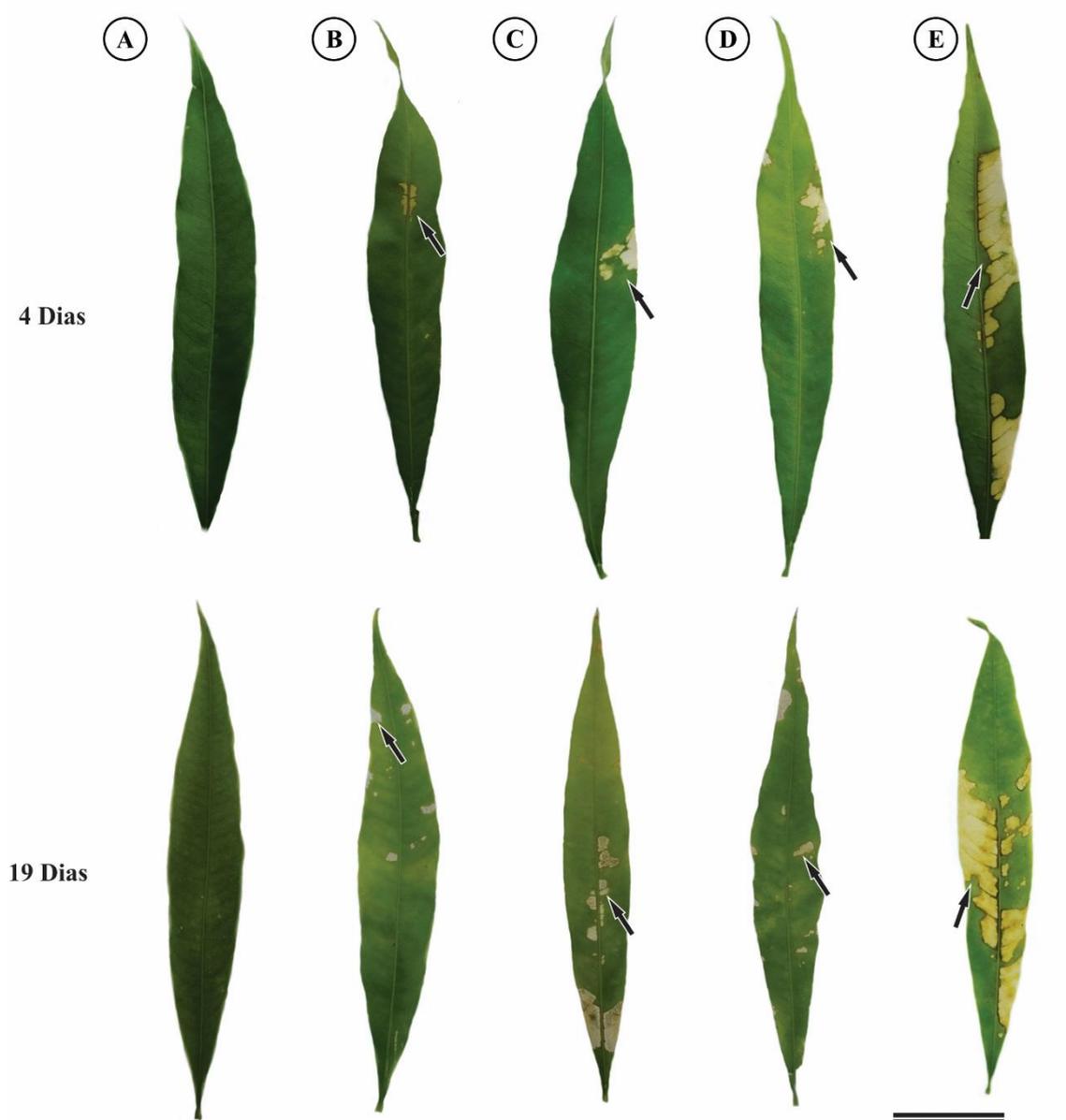
## 2.7. An\u00e1lise estat\u00edstica

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos as an\u00e1lises pr\u00e9vias de homogeneidade (Teste Levene) e normalidade dos erros (Teste Shapiro-Wilk). Com a normalidade dos dados confirmadas, foi realizada ANOVA, seguida do teste Dunnett para determinar diferen\u00e7as entre os tratamentos e o controle ( $p < 0,05$ ).

# 3. Resultados

## 3.1. Avalia\u00e7\u00e3o dos sintomas morfol\u00f3gicos

As folhas de *Sapindus saponaria* n\u00e3o apresentaram sintomas visuais sem a aplica\u00e7\u00e3o de KF (Fig. 1 A). Inj\u00far\u00edas foram observadas nas folhas de *S. saponaria* a partir do quarto dia de aplica\u00e7\u00e3o de chuva simulada com fluoreto de pot\u00e1ssio (Fig. 1B-E), em que se observou forma\u00e7\u00e3o de clorose na lâmina foliar, que expandiu gradativamente com o incremento da dose de KF (Fig. 1B-E). Os sintomas e diagnose de KF nas folhas foram intensificados com o avan\u00e7o do experimento, com forma\u00e7\u00e3o de necrose na tonalidade marrom e despigmenta\u00e7\u00e3o da superf\u00edcie foliar, ap\u00f3s 19 dias de aplica\u00e7\u00e3o de KF por chuva simulada, com danos acentuados principalmente nas maiores doses de KF (Fig. 1C, D-E).

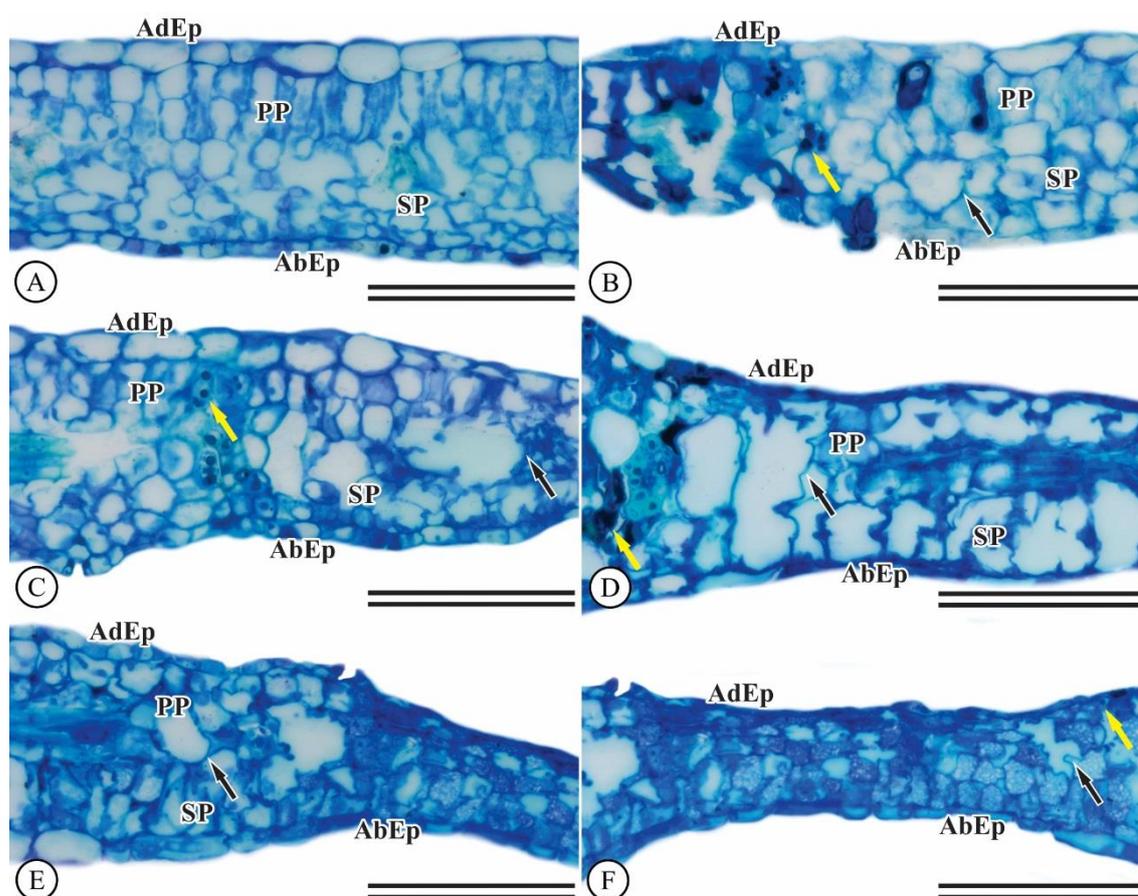


**Fig. 1.** Sintomas visíveis nas folhas de *Sapindus saponaria*, destacados por setas pretas, após 4 e 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações: (A) controle, (B)  $10 \text{ mg L}^{-1}$  KF, (C)  $20 \text{ mg L}^{-1}$  KF, (D)  $30 \text{ mg L}^{-1}$  KF e (E)  $40 \text{ mg L}^{-1}$  KF. Barra de escala 2 cm.

### 3.2. Avaliação das alterações anatômicas

A epiderme foliar de *Sapindus saponaria*, nas faces adaxial e abaxial, é constituída por células isodiamétricas com paredes anticlinais planas ou ligeiramente convexas. O mesofilo é dorsiventral, composto de uma ou duas camadas de parênquima paliádico e três a quatro camadas de parênquima esponjoso. A exposição de KF por chuva simulada ocasionou alterações na superfície e estrutura foliar de *S. saponaria*

(Fig. 2). O KF promoveu hipertrofia das células do parênquima paliçádico e esponjoso com aumento do volume das células em todas as doses aplicadas (Fig. 2 B-D). Danos acentuados, como grandes sinuosidades na parede celular, abaulamento do limbo foliar e completo achatamento das células do mesofilo, foram observados com a aplicação de 30 e 40 mg L<sup>-1</sup> de KF (Fig. 2E-F). Essas alterações demonstram a formação de necrose e plasmólise generalizada nas células mesofílicas, impossibilitando assim, a distinção entre os parênquimas paliçádico e esponjoso.

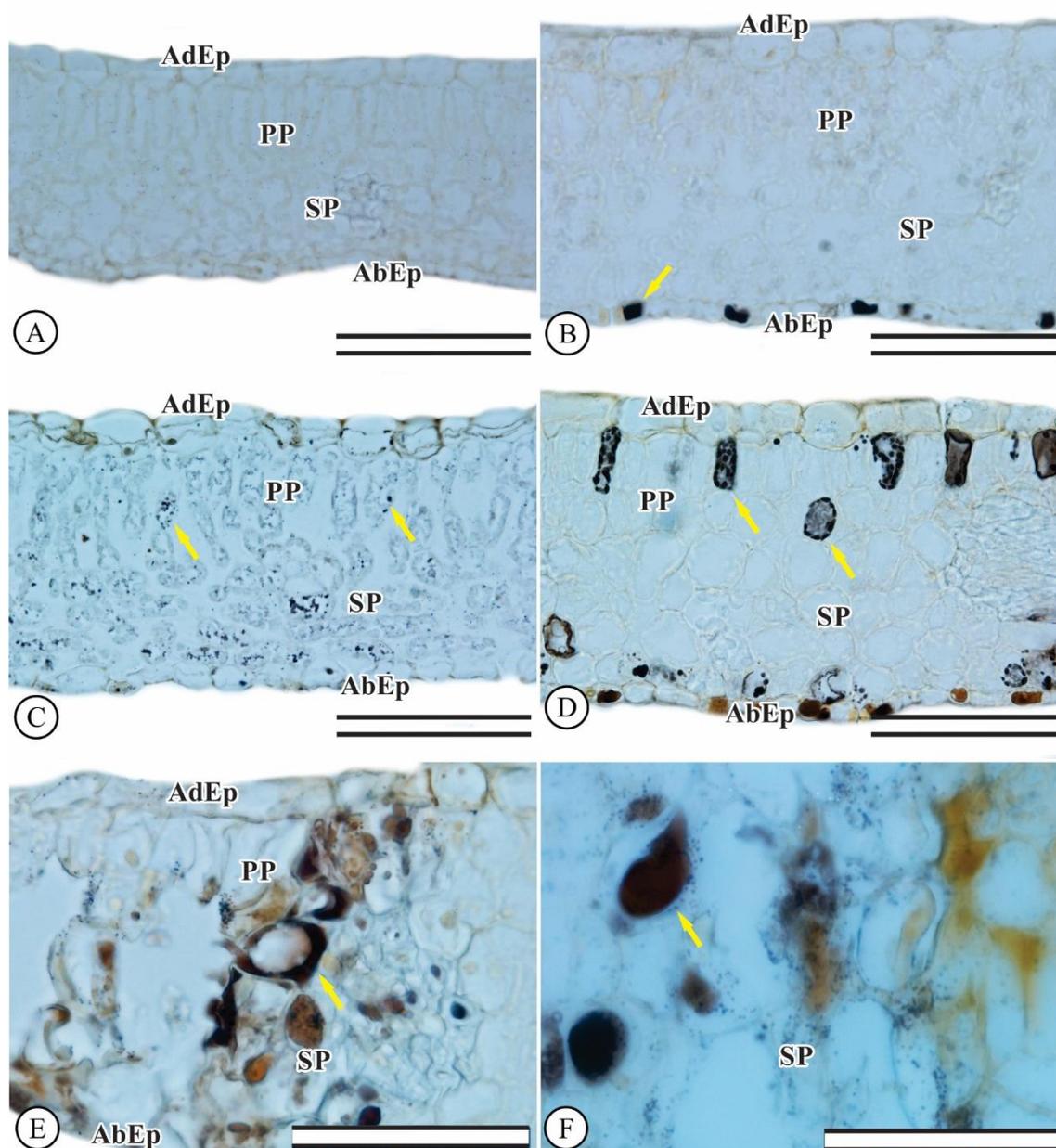


**Fig. 2.** Alterações anatômicas nas folhas de *Sapindus saponaria*, após 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações. (A) controle, (B) 10 mg L<sup>-1</sup> KF, (C) 20 mg L<sup>-1</sup> KF, (D) 30 mg L<sup>-1</sup> KF, (E-F) 40 mg L<sup>-1</sup> KF. (Adep) epiderme adaxial. (Abep) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas pretas indicam hipertrofia e colapso das células e setas amarelas acúmulo de compostos fenólicos. Barra de escala 100 μm.

### 3.3. Identificação de compostos fenólicos

Não foi observado a presença de compostos fenólicos nas células das folhas do tratamento controle de *Sapindus saponaria* (Fig. 3A). Entretanto, nas plantas tratadas

com KF foi evidente o acúmulo de compostos fenólicos, identificado pela coloração preta nas células epidérmicas e parenquimáticas (Fig. 3B-F). O acúmulo de compostos fenólicos aumentou com o incremento das doses de KF.



**Fig. 3.** Acúmulo de compostos fenólicos marcado na cor preta nas folhas de *Sapindus saponaria*, após 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações. (A) controle, (B) 10 mg L<sup>-1</sup> KF, (C) 20 mg L<sup>-1</sup> KF, (D) 30 mg L<sup>-1</sup> KF e (E-F) 40 mg L<sup>-1</sup> KF. (Adep) epiderme adaxial. (Abep) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas amarelas indicam acúmulo de compostos fenólicos. (A-D) Barra de escala 100 μm. (E-F) Barra de escala 50 μm.

### 3.4. *Fluorescência da clorofila a*

A chuva simulada com fluoreto de potássio acarretou no aumento, em relação ao controle, da fluorescência mínima ( $F_0$ ) e quenching não fotoquímico (qN) (Tabela 1), a partir da dose de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de KF. O rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) foi reduzido em 22% e o rendimento quântico efetivo do FSII ( $\Delta F/F_m'$ ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) também foram reduzidos em até 45% na maior dose avaliada ( $40 \text{ mg L}^{-1}$  de KF) (Tabela 1). A dissipação não fotoquímica (NPQ) não apresentou diferenças dos tratamentos em relação ao controle.

**Tabela 1.** Fluorescência mínima ( $F_0$ ), rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), rendimento quântico efetivo do FSII quando os centros de reação estão reduzidos ( $\Delta F/F_m'$ ), taxa de transporte de elétrons (ETR), quenching não fotoquímico ( $qN$ ), dissipação não fotoquímica (NPQ), em plantas de *Sapindus saponaria*, após 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20, 30 e 40 mg L<sup>-1</sup>).

<b>KF (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>F<sub>0</sub></b>	<b>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></b>	<b>ΔF/F<sub>m</sub>'</b>	<b>ETR</b>	<b>qN</b>	<b>NPQ</b>
0	113,25 ± 8,65	0,96 ± 0,004	0,87 ± 0,019	379,15 ± 8,31	0,76 ± 0,02	2,79 ± 0,27
10	382,11 ± 96,86	0,87 ± 0,034	0,65 ± 0,063	286,10 ± 27,37	0,86 ± 0,02	3,09 ± 0,45
20	486,93** ± 80,07	0,81** ± 0,038	0,60** ± 0,078	263,18** ± 33,99	0,85 ± 0,06	1,90 ± 0,33
30	567,38** ± 96,13	0,78** ± 0,040	0,50** ± 0,055	219,11** ± 23,85	0,94* ± 0,06	2,82 ± 0,51
40	584,87** ± 98,53	0,75** ± 0,047	0,48** ± 0,045	208,43** ± 19,68	0,95* ± 0,04	2,46 ± 0,24
<b>F</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>*</b>	<b>NS</b>
<b>CV (%)</b>	<b>39,09</b>	<b>8,59</b>	<b>17,88</b>	<b>17,85</b>	<b>9,70</b>	<b>28,65</b>

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

### 3.5. Trocas gasosas

A taxa fotossintética ( $A$ ) reduziu nas maiores doses avaliadas, em até 34 % em relação ao controle (Tabela 2). A redução em  $A$  foi acompanhada pela diminuição na condutância estomática ( $g_s$ , 53%), transpiração ( $E$ , 43%) e relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ , 12%), nas plantas tratadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de KF. Com o incremento das doses de KF houve queda na razão  $A/C_i$ , em média 33%, nas maiores doses e a relação ( $ETR/A$ ) não apresentou diferenças dos tratamentos em relação ao controle (Tabela 2).

**Tabela 2.** Taxa fotossintética líquida (*A*), condutância estomática (*gs*), Taxa de transpiração (*E*), relação entre concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>*), relação da taxa fotossintética entre a concentração interna de CO<sub>2</sub> (*A/C<sub>i</sub>*) e relação entre a taxa aparente de transporte de elétrons e a assimilação de CO<sub>2</sub> (*ETR/A*) em plantas de *Sapindus saponaria*, após 19 dias de exposição à chuva simulada com fluoreto de potássio em diferentes concentrações (0, 10, 20, 30 e 40 mg L<sup>-1</sup>).

<b>KF</b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>A</b>	<b>gs</b>	<b>E</b>	<b>C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub></b>	<b>A/C<sub>i</sub></b>	<b>ETR/A</b>
0	6,23 ± 0,07	0,142 ± 0,007	1,37 ± 0,07	0,82 ± 0,006	0,0184 ± 0,0005	60,80 ± 0,74
10	5,44 ± 0,65	0,100 ± 0,005	1,05 ± 0,05	0,76** ± 0,004	0,0155 ± 0,0011	55,51 ± 10,28
20	5,39 ± 0,69	0,106 ± 0,015	1,10 ± 0,15	0,78 ± 0,014	0,0157 ± 0,0018	49,33 ± 3,52
30	4,31* ± 0,36	0,099 ± 0,019	1,02 ± 0,18	0,77** ± 0,010	0,0120** ± 0,0001	51,60 ± 6,82
40	4,08* ± 0,32	0,006** ± 0,006	0,78* ± 0,08	0,72** ± 0,017	0,0127** ± 0,0009	53,10 ± 9,09
<b>F</b>	<b>*</b>	<b>**</b>	<b>*</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>NS</b>
<b>CV (%)</b>	<b>18,66</b>	<b>22,96</b>	<b>22,33</b>	<b>2,88</b>	<b>14,05</b>	<b>26,04</b>

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

#### 4. Discussão

O KF afetou a anatomia, fisiologia e morfologia de plantas de *Sapindus saponaria*. Os primeiros sintomas visíveis de injúrias por flúor em plantas tem sido a muito tempo reconhecidos por formações de clorose e necrose (Arndt et al., 1995), como observado após 4 dias de exposição ao KF, a partir da menor dose utilizada. Oliva e Figueiredo (2005) e Pita-Barbosa et al. (2009) relataram resultados semelhantes ao avaliar os efeitos do flúor em *Brachiaria decumbens* uma das principais espécies de forrageiras do Brasil, e relataram que os primeiros sintomas nas espécies sensíveis surgiram a partir do quarto dia de exposição ao poluente na dose de 10 mg L<sup>-1</sup>. Plantas jovens de *Spondias dulcis* apresentaram alta sensibilidade ao flúor, com sintomas de necrose foliar nas primeiras 24 horas após a aplicação do tratamento com 30 mg L<sup>-1</sup> KF (Silva et al., 2000).

O flúor ao ser depositado na superfície da folha via chuva simulada é absorvido e acumulado no mesófilo, promove o colapso dos tecidos parenquimáticos em espécies susceptíveis (Mesquita et al., 2011; Sant'Anna-Santos et al., 2014). O tratamento com chuva simulada de fluoreto de potássio induziu, ainda, o aumento do volume das células parenquimáticas nas folhas de *Sapindus saponaria*, como também já observado em *Libidibia ferrea* (Andrade e Silva 2016) e *Eugenia dysenterica* (Rodrigues et al., 2017). Acredita-se que a expansão das células esteja relacionada com a hipertrofia dos tecidos (Andrade e Silva, 2016), e o aumento do exsudato de pectinas, como relatado em um estudo com ozônio (Günthardt-Goerg et al., 1997). Com o aumento das doses de KF foram evidentes a formação de células colapsadas e retração do mesófilo. Em parte, esses resultados são relacionados à perda de turgescência das células epidérmicas e parenquimáticas, e as conferiu um aspecto achatado e colapsado (Sant'Anna-Santos et al., 2012; Louback et al., 2016). A perda de permeabilidade das células pode facilitar a penetração do KF nos tecidos mais internos, intensificando a fitotoxicidade do fluoreto em *S. saponaria* e desestruturando as células do mesófilo. Essas respostas são frequentemente utilizadas como indicativo de comparação da susceptibilidade entre espécies expostas ao flúor (Silva et al., 2005a; Sant'Anna-Santos et al., 2006 e Divan Junior et al., 2008). Em algumas espécies, foram relatados que as alterações foliares anatômicas precedem o aparecimento de sintomas visuais, indicando o valor prognóstico da utilização das análises microscópicas (Sant'Anna-Santos e Azevedo, 2007).

A exposição das plantas ao fluoreto de potássio afeta, ainda, o gradiente de  $\text{Ca}^{+2}$  que é interrompido e desestruturado (Garrec et al., 1974). O flúor pode se complexar com o  $\text{Ca}^{+2}$  nas células do mesofilo ou removendo Ca das membranas para formar o  $\text{CaF}_2$  (Weinstein e Davison, 2003), e altera a permeabilidade e promove desintegração das organelas (Wei, 1972). Mudanças na disponibilidade de cálcio afetam, ainda, os processos fisiológicos nas plantas por este ser essencial no crescimento de tecidos meristemáticos, percepção da luz, ação dos reguladores de crescimento e regulação estomática (Sanders et al., 2002).

A desestruturação celular ocasionada pelo flúor é intensificada pela ocorrência de estresse oxidativo (Elloumi et al., 2016). Em resposta a esse fator estressante, a planta acumula compostos fenólicos nas células da epiderme, parênquima paliçádico e lacunoso, como foi observado com o incremento das doses de KF (Mesquita et al., 2011; Rodrigues et al., 2017). O acúmulo de fenóis sugere um mecanismo de defesa antioxidante, ativado por fatores que induzem o estresse na planta (Vaughn e Duke, 1984; Chaves et al., 2002). O mecanismo de desintoxicação do KF pela produção de fenóis, no entanto, não foi eficiente em *S. saponaria*. Mesmo com o maior acúmulo de compostos fenólicos, as plantas apresentaram sintomas visíveis de clorose e necrose e, assim, alta susceptibilidade ao fluoreto de potássio a partir da menor dose utilizada.

A exposição das plantas ao KF, associado ao estresse oxidativo tem sido descrito por degradar pigmentos fotossintéticos (Elloumi et al., 2016) e afetar a fluorescência da clorofila *a* em plantas sensíveis (Mesquita et al., 2013). O aumento da fluorescência mínima ( $F_0$ ), em resposta a fatores estressantes, pode ser associado aos danos no complexo antena ou nos centros de reação dos fotossistemas, uma vez que o  $F_0$  é emitido principalmente pelos pigmentos do complexo coletor de luz (Gorbe e Calatayud, 2012). O aumento do  $F_0$  observado em *S. saponaria*, com o incremento das doses de KF, corrobora com os efeitos observados pelo ozônio em folhas de *Lupinus albus* (Guidi et al., 2007), indicando danos fotoinibitórios (Obenland e Neipp, 2005). Os rendimentos quânticos potencial e efetivo do FSII ( $F_v/F_m$  e  $\Delta F/F_m'$ ) foram drasticamente afetados pela exposição ao KF, como já observado em plantas de *Gladiolus spp* (Mesquita et al., 2013) e *Eugenia dysenterica* (Rodrigues et al., 2017) sensíveis ao flúor, indicando que o KF modifica o processo fotoquímico do FSII. A diminuição de  $F_v/F_m$  está relacionada com o aumento na dissipação de energia não radiativa protetora, associada a diminuição regulada não fotoquímica e na taxa fotossintética dos centros FSII ou ambos, como observados em plantas de *Viburnum lantana* em exposição ao

ozônio (Gottardini et al., 2014). Danos no FSII são diretamente relacionados aos danos no transporte de elétrons (ETR) fotossintéticos (Singh-Tomar e Jajoo, 2013), como relatado em plantas de *Liquidambar formosana*, em resposta a chuva ácida com flúor (Chen et al., 2013).

A fim de tentar evitar danos fotoquímicos pelo estresse imposto, as plantas de *S. saponaria*, em resposta ao KF, apresentaram aumento na dissipação de energia não fotoquímica. O quenching não fotoquímico ( $q_N$ ) envolve três constituintes principais: extinção fotoinibitória, correlacionada com danos no FSII (Bruce et al., 1997; Lichtenthaler et al., 2005), por transições do estado, que envolve a fosforilação do complexo de colheita de luz e sua subsequente dissociação do FSII (Allen, 1995) e a remoção de  $\Delta pH$  induzida, correlacionada com o gradiente de prótons em toda a membrana do tilacoide e a formação da zeaxantina carotenoide (Demming-Adams, 1990). A zeaxantina é um componente do ciclo das xantofilas e tem sido descrita por atuar no processo de reparo do FSII, como na degradação de proteínas não funcionais e substituição da D1 (Jin et al., 2003). A ativação do ciclo das xantofilas está diretamente envolvida com a dissipação de energia na forma de calor (NPQ) (Gilmore et al., 1995). Apesar de não ter sido efetivo nas plantas de *S. saponaria*, esse mecanismo de dissipação não fotoquímica tem sido responsivo em plantas expostas a poluentes atmosféricos, como a chuva ácida (Liu et al., 2007).

Danos na etapa fotoquímica das plantas de *S. saponaria* culminaram em redução fotossintética, como previamente observado em plantas sensíveis ao F, como *Gladiolus spp.* (Mesquita et al., 2013) e *Eriobotrya japonica* (Elloumi et al., 2017). A exposição de *S. saponaria* ao fluoreto de potássio ocasionou, ainda, redução na condutância estomática, taxa transpiratória e relação  $C_i/C_a$  indicando limitação estomática, possivelmente no período inicial do estresse. Alterações estomáticas já foram descritas em *Eugenia uniflora* e *Clusia hilariana* sob exposição à chuva ácida, que promoveu rupturas dos estômatos, destruindo a estrutura das células guardas e tornando-as não funcionais (Silva et al., 2005b), indicando perda de capacidade da planta para regular a abertura e o fechamento estomático (Mesquita et al., 2013). Além do mais, a redução significativa na eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ), nas maiores doses, indica possíveis danos causados pelo flúor na atividade da Rubisco, principal enzima envolvida na fixação de carbono. O decréscimo em ETR/A demonstra que os efeitos drásticos no transporte de elétrons e nas taxas fotossintéticas corroboram com os danos bioquímicos observados em *S. saponaria* exposta à altas doses de KF. Dessa forma, a associação

entre os efeitos visuais, anatômicos e fisiológicos permitem caracterizar *S. saponaria* como potencial bioindicadora de flúor.

## 5. Conclusão

*Sapindus saponaria* respondeu como espécie sensível ao fluoreto de potássio em todas as doses testadas. Danos visíveis foram observados após 4 dias de exposição ao poluente, o que, associado às alterações morfoanatômicas e fisiológicas demonstraram alta susceptibilidade ao KF. Os sintomas visíveis e as variáveis não invasivas, como  $F_v/F_m$ ,  $\Delta F/F_m'$ , ETR,  $A$  e  $A/C_i$  são importantes ferramentas que podem ser utilizadas como biomarcadores da ação do flúor. Assim, *S. saponaria* apresenta alto potencial para bioindicação de ambientes contaminados com KF, podendo ser utilizada em programas de monitoramento da arborização urbana ou recuperação de áreas degradadas.

## Agradecimento

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

## Referências

- Allen, J.F., 1995. Thylakoid protein phosphorylation, state 1-state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. *Physiol. Plant.* 93, 196-205. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1995.930128.x>.
- Andrade, G.C., Silva, L.C., 2016. Responses of tropical legumes from the Brazilian Atlantic Rainforest to simulated acid rain. *Protoplasma.* 254, 1639-1649. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1054-z>.
- 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.

- Baker, N.R., 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 59, 89-113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>.
- Bruce, D., Samson, G., Carpenter, C., 1997. The origins of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. Direct quenching by P680<sup>+</sup> in photosystem II enriched membranes at low pH<sup>+</sup>. *Biochemistry.* 36, 749-755. <https://doi.org/10.1021/bi962216c>.
- Cape, J. N., Fowler, D., Davison, A., 2003. Ecological effects of sulfur dioxide, fluorides, and minor air pollutants: recent trends and research needs. *Environ. Int.* 29, 201- 211. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00180-0).
- 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. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062002000400003>.
- Chen, J., Wang, W.H., Liu, T.W., Wu, F.H., Zheng, H.L., 2013. Photosynthetic and antioxidant responses of *Liquidambar formosana* and *Schima superba* seedlings to sulfuric-rich and nitric-rich simulated acid rain. *Plant Physiol. Biochem.* 64, 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.12.012>.
- Demmig-Adams, B., 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, 1020, 1-24. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90088-L](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90088-L).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.04.008>.
- Elloumi, N., Amor, A.B., Zouari, M., Belhaj, D., Abdallah, F.B., Killel, M., 2016. Adaptive biochemical responses of *Punica granatum* to atmospheric fluoride pollution. *Fluoride.* 49, 357-365. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1827-y>.
- Elloumi, N., Zouari, M., Mezghani, I., Abdallah, F.B., Woodward, S., Kallef, M., 2017. Adaptive biochemical and physiological responses of *Eriobotrya japonica* to fluoride air pollution. *Ecotoxicology.* 26, 991-1001. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1827-y>.
- Ferreira, R.A., Santos, P.L., 2012. Direct sowing: an alternative to the restoration of ecosystems of tropical forests, in: Sudarshana, P. (Ed.), *Tropical Forests*. InTech: Rijeka, pp. 333-348. <https://doi.org/10.5772/30771>.

- Fornasiero, R.B., 2003. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. *Plant Sci.* 165, 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00205-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00205-X).
- Garrec, J. P., Oberlin, J. C., Ligeon, C., Bisch, A. M., Fourcy, A., 1974. Fluoride-calcium interaction in polluted fir needles. *Fluoride.* 7, 78–84.
- Gilmore, A.M., Hazlett, T.L., Govindjee., 1995. Xanthophyll cycle-dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 2273-2277. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.6.2273>.
- Gorbe, E., Calatayud, A., 2012. Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: A review. *Sci. Hortic.* 138, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.002>.
- Gottardini, E., Cristofori, A., Cristofolini, F., Nali, C., Pellegrini, E., Bussotti, F., Ferretti, M., 2014. Chlorophyll-related indicators are linked to visible ozone symptoms: Evidence from a field study on native *Viburnum lantana* L. plants in northern Italy. *Ecol. Indic.* 39, 65-74. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.11.02>.
- Guidi, L., Mori, S., Degl'innocenti, E., Pecchia, S., 2007. Effects of ozone exposure or fungal pathogen on white lupin leaves as determined by imaging of chlorophyll a fluorescence. *Plant Physiol Bioch.* 45, 851-857. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.001>.
- 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. J. For. Res.* 27, 453-463. <https://doi.org/10.1139/x96-187>.
- Horstman, E., Ayón, J., Griscom, H., 2018. Growth, survival, carbon rates for some dry tropical forest trees used in enrichment planting in the Cerro Blanco protected forest on the Ecuadorian coast. *J. Sustain. Forest.*, <https://doi.org/10.1080/10549811.2017.1387153>
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System), 2018 “*Sapindus saponaria* L.” <http://www.itis.gov> (accessed 18 january 2018).
- Izquierdo, E.G., Blanco, J.A., López, G.G., Sospedra, R.S., González, M.G., Moeno, B. M., González, A.J., Fonseca, J.S., 2015. Actions for the restoration of the biodiversity of forest ecosystems in Cuba, in: Lo, Y.-H., Blanco, J. A., Roy, S. (Eds.), *Biodiversity in Ecosystems - Linking Structure and Function*, InTech: Rijeka, pp. 511-561. <https://doi.org/10.5772/59333>.

- Jin, E., Yokthongwattana, K., Polle, J.E.W., Melis, A., 2003. Role of the Reversible Xanthophyll Cycle in the Photosystem II Damage and Repair Cycle in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 132, 352-364. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019620>.
- Jochner, S., Markevych, I., Beck, I., Traidl-Hoffmann, C., Heinrich, J. and Menzel, A., 2015. The effects of short-and long-term air pollutants on plant phenology and leaf characteristics. *Environ. Pollut.* 206, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.07.040>.
- Johansen, D. A., 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. 523.
- Kamaluddin, M., Zwiazek, J.J., 2003. Fluoride inhibits root water transport and affects leaf expansion and gas exchange in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. *Physiol. Plant.* 117, 368-375. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00040.x>.
- 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 dibromo thymoquinone. *Biochim. Biophys Acta.* 376, 105-115.
- Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., 2008. Transgenic Plants as Sensors of Environmental Pollution Genotoxicity. *Sensors.* 8, 1539-1558. <https://doi.org/10.3390/s8031539>.
- Laisk, A., Loreto, F., 1996. Determining Photosynthetic Parameters from Leaf CO<sub>2</sub>, leaf expression and gas exchange in aspen (*Populus tremuloides*). *Physiol. Plant.* 117, 368–375. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00040.x>.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Knapp, M., 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio  $R_{Fd}$  of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica.* 43, 379-393. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0062-6>.
- Liu, J., Zhou, G., Yang, C., Ou, Z., Peng, C., 2007. Responses of chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle in leaves of *Schima superba* Gardn e Champ. And *Pinus massoniana* Lamb, to simulated acid rain at Dinghushan biosphere. China. *Acta Physiol. Plant.* 29, 33-38. <https://doi.org/10.1007/s11738-006-0005-2>.
- Lorenzi, H., 2000. *Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum.352p.
- 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.* 67, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.044>.

- Maxwell, K., Johnson, G., 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-68. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>.
- Mesquita, G.L., Tanaka, F.A.O., Cantarella, H., Mattos, D., 2011. Atmospheric absorption of fluoride by cultivated species. Leaf structural changes and plant growth. *Water Air Soil Pollut.* 219, 143-156. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0694-4>.
- Mesquita, G.L., Machado, E.C., Machado, R., Cantarella, H., Mattos, Jr. D., 2013. Fluoride Exposure Compromises Gas Exchange of Plants. *Am. J. Plant Sci.* 4, 16-20. <https://doi.org/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.* 26, 3-22.
- Miller, J.E., Miller, G. W., 1974. Effects of fluoride on mitochondrial activity in higher plants. *Physiol. Plant.* 32, 115-121. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1974.tb03737.x>.
- Mondal, N.K., 2017. Effect of fluoride on photosynthesis, growth and accumulation of four widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in India. *Ecotox. Environ. Safe.* 144, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.009>.
- Nogueira, L., Inckot, R.C., Santos, G.O., Souza, L.A., Bona, C., 2011. Phytotoxicity of petroleum-contaminated soil and bioremediated soil on soil on soil on *Allophylus edulis*. *Rodriguésia.* 62, 459-466. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201162302>.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M. E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma.* 59, 368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>.
- Obenland, D., Neipp, P., 2005. Chlorophyll fluorescence imaging allows early detection and localization of lemon rind injury following hot water treatment. *Hort. Sci.* 40, 1821-1823.
- Oliva, M.A., Figueiredo, J.G., 2005. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. *Rev. Bras. Bot.* 28, 389-397. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000200017>.
- Panda, D., 2015. Fluoride toxicity stress: physiological and biochemical consequences on plants. *Int. J. Bioresour. Environ. Agric. Sci.* 1, 70-84.
- Pita-Barbosa, A., Sant'Anna-Santos, B.F., Silva, K.L.F., Azevedo, A.A., Rocha, D.I., 2009. Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). *Acta Bot. Bras.* 23, 1027-1033. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000400012>.

- Ribeiro, R.V., Machado, E.C., Santos, M.G., Oliveira, R.F., 2009a. Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young sweet orange trees. *Environ. Exp. Bot.* 66, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.011>.
- Ribeiro, R.V., Machado, E.C., Santos, M.G., Oliveira, R.F., 2009b. Photosynthesis and water relations of well-watered orange plants as affected by winter and summer conditions. *Photosynthetica*. 47, 215-222. <https://doi.org/10.1007/s11099-009-0035-2>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.07.005>.
- Román-Dañobeytia, F.J., Levy-Tacher, S.I., Aronson, J., Rodrigues, R.R., Castellanos-Albores, J., 2011. Testing the performance of fourteen native tropical tree species in two abandoned pastures of the lacandon rainforest region of Chiapas, Mexico. *Restoration Ecol.* 30, 378-386. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2011.00779.x>.
- Saini, P., Khan, S., Baunthiyal, M., Sharma, V., 2012. Organ-wise accumulation of fluoride in *Prosopis juliflora* and its potential for phytoremediation of fluoride contaminated soil. *Chemosphere*. 89, 633–635. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.034>.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F., 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*. 14, 401–417. <https://doi.org/10.1105/tpc.002899>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.07.005>.
- Sant'Anna-Santos, B.F., Azevedo, A.A., 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. *Rev. Bras. Biociênc.* 5, 48–50.
- 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. Ciênc.* 84, 689-702. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000048>.
- 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 aluminum smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. *Water Air Soil Pollut.* 225, 1817. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1817-5>.

- Silva, L.C., Azevedo, A.A., Silva, E.A.M., Oliva, M.A., 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Rev. Bras. Bot.* 23, 385-393. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042000000400004>.
- Silva, L.C., Azevedo, A.A., Silva, E.A.M., Oliva, M.A., 2005a. Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Aust. J. Bot.* 53, 789-796. <https://doi.org/10.1071/BT04096>.
- Silva, L.C., Oliva, M.A., Azevedo, A.A., Araújo, J.M., Aguiar, R.M., 2005b. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in Restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. *Water Air Soil Pollut.* 168, 129-143. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-0941-2>.
- Singh-Tomar, R., Jajoo, A., 2013. Alteration in PS II heterogeneity under the influence of polycyclic aromatic hydrocarbon (fluoranthene) in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Plant Sci.* 209, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.04.007>.
- USDA (United States Department of Agriculture), 2018. "Sapindus saponaria". Natural Resources Conservation Service PLANTS. The PLANTS Database. <http://plants.usda.gov> (accessed 18 January 2018).
- Vaughn, K., Duke, S.O., 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol Plant.* 60, 106–112. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb04258>.
- Walna, B., Kurzyca, I., Berdnorz, E., Kolendowicz, L., 2013. Fluoride pollution of atmospheric precipitation and its relationship with air circulation and weather patterns (Wielkopolski National Park, Poland). *Environ. Monit. Assess.* 185, 5497-5514. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2962-9>.
- Wei, L.L., 1972. Effects of hydrogen fluoride on ultrastructure of soybean leaf cells. Ph.D. Thesis, Utah State University 166.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00090-3).
- Yepu, L., Shengli, W., Prete, D., Suyin, X., Zhongren, X., Fei, Z., Qian, Z., 2017. Accumulation and interaction of fluoride and cadmium in the soil-wheat plant system from the wastewater irrigated soil of an oasis region in northwest China. *Sci. Total Environ.* 595, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.288>.

Zouari, M., Ben Ahmed, Ch., Labrousse, P., Ben Rouina, B., Ben Abdallah, F., 2014. Soil

fluoride contamination effects on olive tree (*Olea europaea* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.022>

Zouari, M., Elloumi, N., Bellassoued, K., Ahmed, C.B., Krayen, M., Delmail, D., Elfeki, A., Rouina, B.B., Abdallah, F.B., Labrousse, P., 2017. Enzymatic antioxidant responses and mineral status in roots and leaves of olive plants subjected to fluoride stress. *South African J. Bot.* 111, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.039>.

## CONCLUSÃO GERAL

*Eugenia dysenterica* e *Sapindus saponaria* apresentaram sensibilidade ao fluoreto de potássio em todas as doses testadas. Danos visíveis foram observados após o 4º (*S. saponaria*) e 27º (*E. dysenterica*) dia de exposição ao poluente, o que, associado as alterações morfoanatômicas e fisiológicas demonstraram alta susceptibilidade das espécies ao KF. Os sintomas visíveis e as variáveis não invasivas fisiológicas, são importantes ferramentas que podem ser utilizadas como biomarcadores da ação do flúor. Assim, *E. dysenterica* e *S. saponaria* apresentam alto potencial para bioindicação de ambientes contaminados com KF, podendo ser utilizada em programas de monitoramento da arborização urbana ou recuperação de áreas degradadas.