



**GIUSLAN CARVALHO PEREIRA**

**SELEÇÃO DE CARACTERÍSTICAS  
MORFOFISIOLÓGICAS NO  
BIOMONITORAMENTO DAS CHUVAS ÁCIDA  
OU FLUORETADA EM DUAS ESPÉCIES  
ARBÓREAS**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**GIUSLAN CARVALHO PEREIRA**

**SELEÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS NO  
BIOMONITORAMENTO DAS CHUVAS ÁCIDA OU FLUORETADA  
EM DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS**

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

Orientador

Dr. Evaristo Mauro de Castro

Coorientador

Dr. João Paulo R. A. D. Barbosa

**LAVRAS - MG**

**2013**

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

Pereira, Giuslan Carvalho.

Seleção de características morfofisiológicas no  
biomonitoramento das chuvas ácida ou fluoretada em duas espécies  
arbóreas / Giuslan Carvalho Pereira. – Lavras : UFLA, 2013.  
93 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.  
Orientador: Evaristo Mauro de Castro.  
Bibliografia.

1. Plantas bioindicadoras. 2. *Plinia cauliflora*. 3. *Cupania  
vernalis*. 4. Poluição atmosférica. 5. Espécies arbóreas  
bioindicadoras. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 574.5222

**GIUSLAN CARVALHO PEREIRA**

**SELEÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS NO  
BIOMONITORAMENTO DAS CHUVAS ÁCIDA OU FLUORETADA  
EM DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS**

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

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

|   |                  |
|---|------------------|
| Dra. Cynthia de Oliveira                | UFLA             |
| Dr. Fabrício José Pereira               | UFLA             |
| Dra. Flávia Freitas Coelho              | UFLA             |
| Dr. José Emílio Zanzirolani de Oliveira | IFSEMG/BARBACENA |

Dr. Evaristo Mauro de Castro  
Orientador

**LAVRAS- MG**  
**2013**

*A DEUS, dono do meu ser.*

*À Grazielle, minha esposa, que com seu amor imensurável  
me ajuda a ser uma pessoa melhor.*

*Ao Victor, que mesmo antes de nascer, me inspira a lutar e a vencer.*

*Aos meus pais, Jair e Lúcia, grandes exemplos de vida.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me capacitado e me dado forças em toda a caminhada.

A minha esposa, Grazielle, pelo imenso auxílio na elaboração, execução e conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Jair e Lúcia, por terem se privado de muitos sonhos para que hoje eu estivesse aqui.

Aos meus irmãos, Poliana, Portinari, Gilbert e Jackson pelo apoio, mesmo que a distância.

Aos meus sogros, Toninho e Elen, e ao meu cunhado, Mateus, que me incentivaram nesta jornada.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Zelinha, por ter sido meu braço direito e esquerdo na preparação e execução deste trabalho.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pela orientação, amizade e paciência.

Ao professor João Paulo R. A. D. Barbosa, pela coorientação e pelo auxílio nas análises ecofisiológicas.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e pelas contribuições valiosas.

À professora Flávia Coelho que sempre me apoiou neste árduo trabalho e por ser grande exemplo profissional.

Ao professor Eduardo Alves (DFP), pelo carisma e pela ajuda nas análises de microscopia eletrônica.

À Eloisa (Elô) (DFP), pela amizade e disposição em acompanhar a preparação das amostras no laboratório de microscopia eletrônica.

A todos os professores do Setor de Ecologia, em especial ao Paulo, Eduardo e Rosângela pela amizade, pelo apoio e ensinamentos.

À professora Aristéa da Universidade Federal de Viçosa por permitir a utilização da estrutura do Laboratório de Anatomia Vegetal e à Naiara Campos pelo auxílio na realização das análises de quantificação do flúor.

A todos do laboratório de Anatomia Vegetal pelas horas divertidas e de muito trabalho.

Aos amigos do DBI em especial a Cynthia, Marinês e Marcelo Rodrigues, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

À família que não é de sangue, mas é de coração Vanesca, Rodrigo (Cotonete), Fábio Mineo e Ludmila.

Aos meus “afilhados” Lisiane e Victor pelo carinho e momentos de descontração.

Aos amigos, Fabiano, Tália, Livia, Leopoldo, Érica (Teta), Ana Cristina, Thais, Renan (Calourada), Ruany (Tatau), Ivo, Cléver, Fernanda, e tantos outros mais, pelos ótimos e divertidos momentos que passamos.

Aos amigos do IFSEMG / campus Barbacena, em especial, Dani, Aquiles, Elisa, Hélcio, Cida, Josimar, Leandro, Vanessa, Procópio, Zé Emílio, e outros, porque o sistema é mal, mas nossa turma é legal!

Ao IF Sudeste de Minas Gerais, em especial ao professor José Roberto Ribeiro Lima, pelo apoio durante a realização dos experimentos.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da simulação de chuvas ácida e fluoretada, separadamente, sobre as folhas de *Plinia cauliflora* e *Cupania vernalis*, avaliando alterações na morfologia, na ultraestrutura e na fluorescência da clorofila *a*, além de analisar o teor de flúor na matéria seca das folhas dessas espécies, visando fornecer subsídios para o uso dessas plantas no biomonitoramento em ambiente contaminado por esses poluentes. Para o bioensaio da simulação de chuva ácida, mudas de *P. cauliflora* e *C. vernalis* foram submetidas a chuvas simuladas com pH 6,0 (controle) e pH 3,0 (tratamento) por 15 minutos durante 10 dias consecutivos. De forma semelhante, no bioensaio de simulação de chuva fluoretada mudas de *P. cauliflora* e *C. vernalis* foram submetidas a chuvas simuladas contendo 0, 10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup> de KF por 15 minutos durante 10 dias consecutivos. Durante o experimento, foi avaliada a fluorescência da clorofila *a*, no escuro e no claro e, ao final das simulações foram coletadas folhas para quantificação do teor de F na massa seca, além de folhas e fragmentos foliares para análises em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Não foram detectadas alterações na espessura de nenhum dos tecidos de *P. cauliflora* e *C. vernalis* após os bioensaios. Após o término dos experimentos, apenas *P. cauliflora* apresentou clorose e manchas necróticas na borda de algumas folhas quando expostas à simulação de chuva ácida e apenas *C. vernalis* apresentou clorose na simulação da chuva fluoretada, sendo o dano mais acentuado nas concentrações de 15 e 20 mg L<sup>-1</sup> de KF. A nível ultraestrutural foram detectadas erosão e formação de placas de cera epicuticular, além da colonização da superfície foliar por hifas fúngicas nos dois bioensaios em ambas as espécies. As chuvas ácida e fluoretada, não afetaram significativamente nenhuma das características de fluorescência da clorofila *a* avaliadas em *P. cauliflora*. Já *C. vernalis* apresentou redução no rendimento quântico potencial do FSII (Fv/Fm) para ambos os bioensaios. E ainda na simulação da chuva fluoretada foi observado aumento do coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) nas maiores concentrações de KF. Ambas as espécies acumularam teor de flúor em seus tecidos e todos os tratamentos diferiram entre si. Esses resultados demonstram que *P. cauliflora* e *C. vernalis* apresentam potencial para serem utilizadas como biosensordada presença de chuvas ácida e fluoretada, ou como indicadores ecológicos por bioacumulação da presença de flúor na atmosfera. A espécie *P. cauliflora*, por ser mais resistente ao flúor, é promissora para ser utilizada em áreas impactadas por esse tipo de poluição.

Palavras-chave: *Plinia cauliflora*. *Cupania vernalis*. Chuva ácida. Chuva fluoretada.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of simulated rain, acid and with fluoride, separately, on leaves of *Plinia cauliflora* and *Cupania vernalis*, assessing alterations in morphology, ultrastructure and chlorophyll *a* fluorescence, besides analyzing the content of fluoride in dry leaves of these species, in order to provide subsidies for the use of these plants in the biomonitoring of environments contaminated by these pollutants. For the simulated acid rain bioassay, seedlings of *P. cauliflora* and *C. vernalis* were exposed to simulated rain at pH 6.0 (control) and pH 3.0 (treatment) for 15 minutes during 10 consecutive days. Similarly, for the bioassay of simulated fluoridated rain, seedlings of *P. cauliflora* and *C. vernalis* were exposed to simulated rain containing 0, 10, 15 and 20 mg L<sup>-1</sup> of KF for 15 minutes during 10 consecutive days. During the experiment, it was evaluated the fluorescence of chlorophyll *a*, in the dark and light and, at the end of the simulations, leaves were collected to quantify the content of F in the dry mass; leaves and leaf fragments were also collected for analysis by light microscopy and scanning electron microscopy. No changes were detected in the thickness of any tissues *P. cauliflora* and *C. vernalis* after the simulation of the both bioassays. After the end of experiment, only *P. cauliflora* presented chlorosis and necrotic spots on the edge of some leaves when exposed to simulated acid rain and only the *C. vernalis* presented chlorosis simulation of fluoridated rain, the damage being more accentuate at concentrations 15 and 20 mg L<sup>-1</sup> KF. At the ultrastructural level, erosion and formation of epicuticular wax were detected, as well as leaf surface colonization by fungal hyphae in the two bioassays in both species. After the end of the simulations, it was possible to verify that the both simulated rain, did not significantly affect any of the evaluated characteristics of chlorophyll *a* fluorescence in *P. cauliflora*. Nevertheless, for *C. vernalis*, it was detected a reduction in the potential quantum yield of PSII (Fv/Fm), for both bioassays. For the simulation of fluoridated rain, it was observed increase in the coefficient of non-photochemical quenching (NPQ) in the highest concentrations of KF. Both species accumulated fluoride content in their tissues and all treatments differed from each other. These results demonstrate that *P. cauliflora* and *C. vernalis* present potential to be used as biosensors for monitoring the occurrence of rain, acid and with fluoride or like as ecological indicators by bioaccumulation of fluoride in the atmosphere. The species *P. cauliflora*, which has shown to be more resistant to fluoride is promising to be used in areas impacted by this type of pollution.

Keywords: *Plinia cauliflora*. *Cupania vernalis*. Acid rain. Fluoridated rain.

## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUÇÃO .....  | 10 |
| 2     | REFERENCIAL TEÓRICO .....   | 13 |
| 2.1   | Poluição atmosférica .....  | 13 |
| 2.1.1 | Chuva ácida .....   | 14 |
| 2.1.2 | Poluição atmosférica por fluoreto .....   | 17 |
| 2.2   | Indicador ecológico e biomonitoramento .....  | 21 |
| 2.3   | As espécies .....   | 24 |
| 2.3.1 | <i>Plinia cauliflora</i> .....  | 24 |
| 2.3.2 | <i>Cupania vernalis</i> .....   | 26 |
| 3     | MATERIAL E MÉTODOS .....  | 28 |
| 3.1   | Material vegetal .....  | 28 |
| 3.2   | Descrição dos experimentos .....  | 29 |
| 3.3   | Análises morfológicas, externa e interna .....  | 30 |
| 3.4   | Análise ultraestrutural .....   | 31 |
| 3.5   | Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....   | 32 |
| 3.6   | Quantificação do Flúor .....  | 34 |
| 4     | RESULTADOS .....  | 35 |
| 4.1   | Efeitos da simulação de chuva ácida sobre as características morfológicas e ultraestruturais das espécies estudadas .....                         | 35 |
| 4.2   | Efeitos da simulação de chuva fluoretada sobre as características morfológicas e ultraestruturais das espécies estudadas .....                    | 43 |
| 4.3   | Efeitos da simulação das chuvas, ácida oufluoretada, sobre as características da fluorescência da clorofila <i>a</i> das espécies estudadas ..... | 52 |
| 4.4   | Análise do teor de flúor na massa seca das espécies estudadas .....   | 65 |
| 5     | DISCUSSÃO .....   | 67 |
| 5.1   | Efeitos da simulação de chuva ácida sobre as características morfológicas e ultraestruturais das espécies estudadas .....                         | 67 |
| 5.2   | Efeitos da simulação de chuva fluoretada sobre as características morfológicas e ultraestruturais das espécies estudadas .....                    | 69 |
| 5.3   | Efeitos da simulação das chuvas, ácida oufluoretada, sobre as características da fluorescência da clorofila <i>a</i> das espécies estudadas ..... | 71 |
| 5.4   | Análise do teor de flúor na massa seca das espécies estudadas .....   | 74 |
| 6     | CONCLUSÃO .....   | 78 |
|       | REFERÊNCIAS .....   | 79 |

## 1 INTRODUÇÃO

O avanço da urbanização e industrialização desde a Revolução Industrial no séc. XVIII tem contribuído significativamente com o aumento da poluição atmosférica. A contaminação do ar por poluentes tem sido tema de grande interesse nas conferências mundiais sobre o meio ambiente e no meio científico nas últimas décadas, pois as concentrações elevadas desses poluentes representam risco para a saúde humana e danificam a flora e a fauna (KLUMPP et al., 2001).

Um dos principais poluentes atmosféricos são os óxidos de enxofre e nitrogênio lançados por veículos automotores e diversas indústrias que utilizam o carvão como combustível (SINGH; AGRAWAL, 2008). Esses compostos reagem com a umidade do ar originando ácidos sulfúrico e nítrico, tornando ácida a água da chuva (COWLING; LINTHURST, 1981). A chuva ácida provoca diversos danos às plantas, entre eles destacam-se: redução ou estímulo no crescimento, inibição da germinação de sementes, remoção da cera epicuticular e de constituintes da cutícula, alterações nas trocas gasosas e taxas respiratórias, redução dos teores de clorofilas *a* e *b* bem como da taxa fotossintética, aumento na lixiviação de nutrientes, clorose e necrose foliar, dentre outros (EVANS, 1984; KOZLOWSKI, 1980; PERCY, 1986).

Outro poluente que merece destaque é o flúor, que é encontrado na atmosfera principalmente sob a forma de ácido fluorídrico (HF) e outras formas de fluoretos gasosos. Esse elemento é emitido por indústrias de fertilizantes e na produção de alumínio, tijolo, vidro e aço inoxidável (DOBBS, 1974; FORNASIERO, 2001). O flúor apresenta grande fitotoxicidade (SMITH; HODGE, 1979) e pode causar injúrias em concentrações atmosféricas 10 a 1000 vezes menores que outros poluentes (WEINSTEIN, 1977).

Algumas plantas são particularmente suscetíveis à poluição, enquanto outras podem acumular os poluentes em altas concentrações em seus tecidos sem que sintomas visíveis sejam observados (ARNDT; FLORES; WEINSTEIN, 1995; KOZLOWSKI 1980; MUDD; KOZLOWSKI 1975). As diferentes respostas fisiológicas e anatômicas apresentadas pelas plantas quando expostas aos poluentes atmosféricos, sugerem que algumas espécies vegetais podem ser utilizadas como bioindicadoras da qualidade do ar (SILVA et al., 2000).

Sabe-se que a folha das plantas é o órgão mais sujeito à influência de poluentes atmosféricos e alguns parâmetros podem ser utilizados para qualificar e quantificar esses efeitos, como lesões foliares, percentagem de folhas injuriadas, área foliar necrosada, crescimento, taxa fotossintética e respiração, conteúdo de clorofila no tecido foliar e acúmulo de poluentes (PRADO FILHO, 1993).

Desde a década de 80 tem-se desenvolvido estudos com plantas visando verificar o seu potencial bioindicador ou entender seus mecanismos de tolerância frente à poluição atmosférica por meio da avaliação das alterações morfológicas (externa e interna), fisiológicas e bioquímicas (KOZLOWSKI, 1980). No final da década de 90, a União Europeia lançou um programa de avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet), principalmente espécies herbáceas. Essas eram cultivadas e expostas a diferentes poluentes e após essa exposição, eram avaliadas as respostas morfoanatômicas e quantificado o teor do poluente nos seus tecidos e então eram feitas inferências em relação à qualidade do ar no local (KLUMPP et al., 2001).

Apesar dos esforços, ainda pouco se sabe sobre as respostas de plantas arbóreas tropicais quando expostas a poluentes atmosféricos. Com isso, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial bioindicador das espécies tropicais *Plinia cauliflora* e *Cupania vernalis* mediante a simulação de chuvas

ácida e fluoretada. Dentro desse objetivo geral, o trabalho visou ainda os seguintes objetivos específicos:

- a) verificar as alterações na estrutura morfológica, externa e interna, e ultraestrutural das folhas das espécies estudadas;
- b) avaliar o efeito dos poluentes sobre características da fluorescência da clorofila *a* nas espécies;
- c) determinar a concentração de flúor acumulada nas folhas de *P. cauliflora* e *C. vernalis* após a exposição à chuva fluoretada.

Para alcançar os objetivos, algumas hipóteses foram levantadas. *P. cauliflora* e *C. vernalis* apresentam:

- a) modificações estruturais e ecofisiológicas quando expostas à chuva ácida;
- b) modificações estruturais e ecofisiológicas quando expostas à chuva fluoretada e essas modificações são diretamente proporcionais à concentração de flúor na chuva;
- c) acúmulo significativo de flúor em seus tecidos quando expostas à chuva fluoretada, sendo tolerantes a esses tipos de poluição atmosférica, podendo ser utilizadas em programas de restauração de áreas impactadas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Poluição atmosférica

A poluição do ar é a introdução na atmosfera de compostos químicos (orgânicos ou inorgânicos), materiais particulados, líquido em suspensão, material biológico ou energia que causam prejuízo ao meio ambiente e desconforto à saúde dos seres humanos (ODILARA et al., 2006).

Os poluentes atmosféricos são classificados em poluentes primários, que são aqueles emitidos diretamente de uma fonte poluidora, como por exemplo, os óxidos de enxofre e gás fluorídrico, e poluentes secundários, que são formados a partir de reações dos poluentes primários com constituintes da atmosfera, como a chuva ácida, formada a partir da reação entre os óxidos de enxofre ou nitrogênio com moléculas de água (BAIRD, 2002).

Apesar de muitos compostos potencialmente poluidores serem encontrados na atmosfera naturalmente, é por meio de atividades antrópicas que a concentração dos mesmos vem aumentando e assim tornando prejudicial ao ambiente e aos seres humanos. A poluição do ar é influenciada por quatro fatores principais: expansão da industrialização das cidades, aumento do tráfego de veículos automotores, rápido desenvolvimento econômico e maior consumo de energia (WAGH et al., 2006).

Em termos de saúde pública, os poluentes atmosféricos têm efeitos agudos e crônicos na saúde humana, afetando diferentes sistemas e órgãos. Os efeitos variam desde uma pequena irritação respiratória a doenças cardíacas, câncer de pulmão, infecções respiratórias agudas em crianças e bronquite crônica em adultos. Além disso, exposições de curto e longo prazo também têm sido associadas com a mortalidade prematura e a uma expectativa de vida reduzida (KAMPA; CASTANAS, 2008).

No meio ambiente, a poluição atmosférica traz diversos prejuízos como as alterações climáticas devido ao aquecimento global, a destruição da camada de ozônio, a acidificação de solos e corpos-d'água, a destruição de construções, os danos à flora e fauna, entre outros (KLUMPP et al., 2001; SINGH; AGRAWAL, 2008; WAGH et al., 2006).

### **2.1.1 Chuva ácida**

A chuva ácida é um dos problemas ambientais mais graves oriundos da poluição do ar, pois caracteriza-se como um problema global e não local, afetando imensas áreas devido à dispersão dos poluentes pelas massas de ar (SCHINDLER, 1988).

Chuva ácida é um termo amplo que descreve várias maneiras através das quais o ácido cai na superfície terrestre a partir da atmosfera, incluindo chuva, nevoeiro, granizo e neve. Vários cientistas defendem que “deposição ácida” seria o termo mais apropriado (SINGH; AGRAWAL, 2008).

A acidez da chuva foi observada, pela primeira vez por Robert Boyle no início do século XVII (ROCHA et al., 2003), mas só em 1872 que o químico Robert Angus Smith associou a redução do pH das chuvas com as emissões antrópicas de poluentes na era da Revolução Industrial no Reino Unido (SINGH; AGRAWAL, 2008).

O pH da chuva naturalmente é ácido, ficando em torno de 5,6 devido à dissolução do gás carbônico na água. Porém, a chuva ácida apresenta valores de pH bem abaixo do natural como foi observado no Japão (4,7) (HARA et al., 1990), na Europa e nordeste dos EUA (4,1) (SINGH; AGRAWAL, 2008). No Brasil já foram registradas chuvas com pH médio em torno de 4,7 nas regiões da Amazônia, Rio de Janeiro e São Paulo, sendo que neste último Estado, na

década de 80 foram registradas chuvas com pH de 2,7 na área de Cubatão (JESUS, 1996).

A origem da chuva ácida se dá, principalmente, por meio da reação dos óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ) e óxidos de enxofre ( $\text{SO}_x$ ) com a água presente na atmosfera, transformando-os em seus respectivos ácidos, ácido nítrico e ácido sulfúrico (FORNARO, 2006). Esses óxidos poluentes são decorrentes das atividades humanas, tais como queima de resíduos e de combustíveis fósseis em usinas térmicas e automóveis. As fontes naturais dos compostos de enxofre são oceanos e em menor escala as erupções vulcânicas (SINGH; AGRAWAL, 2008).

Muitas vezes, os danos causados pela chuva ácida passam despercebidos pela população, porém, seus efeitos negativos são diversos. A chuva ácida possui potencial corrosivo, afetando monumentos e construções. Casos de destruição de construções famosas, causados principalmente pela chuva ácida, já foram relatados pelo mundo como: as pedras de Partenon na Grécia, a Catedral de Colônia na Alemanha e o Cristo Redentor no Brasil (JESUS, 1996).

Em diversas regiões da Europa e América do Norte foram relatados danos aos organismos aquáticos devido à acidificação dos corpos-d'água causada pela chuva ácida (MENZ; SEIP, 2004). Várias espécies aquáticas são afetadas pela acidificação das águas, apresentando desequilíbrio no ecossistema. A diminuição do pH das águas de rios e lagos a valores inferiores a 5 (cinco) faz com que haja aumentona taxa de mortalidade de peixes, cause falhas reprodutivas, reduzaa taxa de crescimentodo esqueletoe aumente a absorção de metais pesados (SCHINDLER, 1988).

Nos solos, acredita-se que as principais influências da chuva ácida sejam no pH, na capacidade de troca catiônica e na saturação por bases (McFEE; KELLY; BECK, 1977). A chuva ácida leva à lixiviação e perda de macro e micronutrientes alterando a fertilidade do mesmo (SINGH; AGRAWAL, 2008).

A ciclagem de nutrientes e a taxa de decomposição também são afetadas negativamente pelo aumento da acidez do solo, além de contribuir com a morte de diversos microrganismos responsáveis pela fixação de nitrogênio (DENISON et al., 1977; FRANCIS, 1982). Além disso, a redução do pH dos solos faz com que diversos elementos tóxicos fiquem disponíveis para as plantas (MENON et al., 2007) como mostra o estudo realizado pelos autores Guo e Liao (2005) que verificaram que a chuva ácida foi o principal fator que liberou os metais Cd, Cu e Zn em solos.

A chuva ácida também afeta a vegetação, a folha é o órgão mais sensível ao dano causado pelo poluente, por isso tem sido alvo de muitos estudos. Plantas expostas à deposição ácida apresentam alterações tanto morfológicas, ultraestruturais, fisiológicas quanto fenológicas (SINGH; AGRAWAL, 2008).

Vários autores observaram o aparecimento de injúrias como cloroses e necroses em folhas expostas à chuva ácida (EVANS, 1982; SILVA et al., 2005). Em condições experimentais, Singh e Agrawal (2004) verificaram que diversas variedades de trigo apresentaram redução do crescimento da raiz e na alocação de biomassa ao serem expostas à chuva ácida. Colapso das células da epiderme e do mesofilo, além de deformação das células estomáticas são sintomas comuns apresentados por plantas quando submetidas à chuva ácida (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006a; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006b). Outro dano apresentado pelas folhas é erosão da cera epicuticular, isso faz com que ocorra aumento da afinidade da superfície foliar por água tornando a folha mais úmida, propiciando a colonização por fungos (BARTHLOTT, 1981; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006b).

Deng et al. (2012) estudaram a sensibilidade de 21 espécies arbóreas à chuva ácida, e verificaram que 13 apresentaram taxa de fotossíntese líquida bem inferior ao valor de referência. A chuva ácida afeta a fotossíntese uma vez que

pode reduzir a fixação de CO<sub>2</sub> pelas plantas (NORBY; LUXMOORE, 1983) além de alterar a fluorescência da clorofila *a* (LIU et al., 2007).

Algas e líquens também são muito sensíveis à chuva ácida tendo a taxa fotossintética muitas vezes diminuída (SINGH; AGRAWAL, 2008).

Vale ressaltar que a intensidade dos danos causados pela chuva ácida depende da espécie considerada, das características específicas da planta estudada e das características edafoclimáticas da região. Além disso, o dano também depende de fatores relacionados à chuva propriamente dita, tais como frequência, intensidade, pH, tempo de ação e composição química (COWLING; LINTHURST, 1981; ZOBEL; NIGHSWANDER, 1991).

Devido aos danos apresentados pelas plantas, algas e líquens, muitas espécies desses grupos são utilizados como bioindicadores da qualidade do ar (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006b; SILVA et al., 2005) além de permitirem a utilização de certas espécies na avaliação de risco ambiental (NEVES et al., 2009).

### **2.1.2 Poluição atmosférica por fluoreto**

As fontes de fluoreto incluem fontes naturais, tais como gases vulcânicos e fluoretos solúveis na crosta terrestre (ROSE; MARIER, 1977). Esse composto é encontrado em praticamente todo o globo. A presença de fluoretos na água de chuva coletada em áreas remotas, longe de urbanização, sugere que mesmo sem atividades humanas, o ar apresenta esse composto, porém, em baixas concentrações ( $<0,05 \mu\text{gF}\cdot\text{m}^{-3}$  de ar). Apenas em situações extremas, como erupções vulcânicas, a concentração de fluoreto natural na atmosfera é ultrapassada (MILLER, 1993; ROSE; MARIER, 1977).

No entanto, o problema da poluição tem sido causado, principalmente, por fontes artificiais oriundas de atividades antrópicas fazendo com que essas

concentrações se elevem tornando tóxicas aos seres humanos, flora e fauna (ROSE; MARIER, 1977).

A forma mais tóxica em que o flúor se encontra na atmosfera é sob a forma de fluoretos, como o fluoreto de hidrogênio (HF) e sais solúveis como fluoreto de sódio (NaF) e PSII (KF). Esses compostos são constantemente lançados na atmosfera por meio de fontes antrópicas que compreendem indústrias de alumínio, de aço, de vidro e de fertilizantes fosfatados, além de incineradores de resíduos sólidos e outros (FORNASIERO, 2001).

Um dos primeiros relatos de danos causados pelo fluoreto foi reportado em 1694 pelo farmacêutico Oddur Eiriksson e pelo clérigo Benedikt Pétursson após a erupção do vulcão Hekla na Islândia. Nesse relato foram descritos que o gado, ovelhas e cavalos, que se alimentavam de poáceas da região, apresentaram sintomas de contaminação crônica por fluoreto como lesões e deformações em ossos e dentes, além de danos no metabolismo. Os sintomas desapareceram quando os animais deixaram de comer a grama contaminada. Nesse período já se reconhecia que plantas acumulavam fluoreto proveniente da atmosfera e esse podia ser transferido ao longo da cadeia alimentar (GEORGSSON; PÉTURSSON, 1972; WEINSTEN, 1977).

O fluoreto é um dos mais fitotóxicos poluentes atmosféricos, podendo causar injúrias às plantas em concentrações de 10 a 100 vezes menores que outros poluentes, além de ser acumulativo (WEINSTEN, 1977). A vegetação do dossel é a primeira superfície disponível para a deposição atmosférica dos fluoretos e ao contrário do enxofre e nitrogênio, o flúor não é um elemento essencial às plantas (TRESHOW; ANDERSON, 1989).

O fluoreto pode ser absorvido pela planta via raiz, caso esse esteja no solo, e transferido pelo xilema até as folhas onde se acumulam. Ou então, é absorvido diretamente da atmosfera pelas folhas (FORNASIERO, 2003). Caso haja fluoreto no solo e na atmosfera, a absorção pelas folhas é predominante

(DOMINGOS et al., 2003). Nesse órgão, o fluoreto pode penetrar pela cutícula, pela base do tricoma, e principalmente, pelos estômatos. Uma vez no mesofilo, o fluoreto é dissolvido na solução aquosa do oploplasto e é transportado pelo fluxo da transpiração, acumulando-se nas margens foliares (MILLER, 1993).

A maioria dos estudos relacionados aos efeitos do fluoreto sobre organismos vegetais se concentra nas alterações provocadas nas folhas, devido a esse órgão constituir a principal via de entrada do poluente e onde o mesmo se acumula (DOMINGOS et al., 2003; PITA-BARBOSA et al., 2009).

São diversos os danos causados às folhas das plantas pela ação dos fluoretos. Esses sintomas vão desde danos microscópicos até a redução do crescimento e morte do indivíduo (WEI; MILLER, 1972). Miller (1993) salienta que, para uma dada espécie, quanto maior o tempo de exposição ao poluente, maior é o acúmulo pelas folhas e, conseqüentemente, maiores os danos sofridos por essas.

Geralmente, as alterações visuais em plantas causadas pela exposição ao fluoreto, mais comumente relatados pela literatura, são cloroses e necroses marginais e nos ápices das folhas (FORNASIERO, 2001; FORNASIERO, 2003; MILLER, 1993; WEI; MILLER, 1972). Em espécies de pinheiros, a clorose aparece primeiramente como um amarelecimento das pontas das acículas, que posteriormente se transforma em necrose castanho-avermelhada. Em espécies folhosas, o fluoreto acumula-se nos ápices e nas margens das folhas, tornando essas áreas de coloração avermelhada, podendo aparecer necroses internervais e marginais (LIMA, 1980). Outros sintomas visíveis relatados na literatura incluem murchamento e encarquilhamento de folhas (CHAVES et al., 2002; SILVA et al., 2000).

A nível ultraestrutural, plantas expostas à ação do fluoreto podem apresentar fragmentação do tonoplasto e aparecimento de pequenos vacúolos no citoplasma, deformação dos ribossomos, modificação das mitocôndrias com

dilatação das cristas (WEI; MILLER, 1972), diminuição do número e tamanho dos cloroplastos (CHAVES et al., 2002), perda da cera epicuticular (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007), turgidez, deformação e/ou colapso das células (FORNASIERO, 2003; PITA-BARBOSA et al., 2009), além de desarranjo da organização celular (MILLER, 1993).

Aparentemente, a injúria por fluoreto decorre da ação negativa desse poluente sobre diversas características fisiológicas das plantas. Há inibição no sistema enzimático afetando negativamente tanto o processo de fotossíntese quanto o respiratório (MILLER 1993; WEI; MILLER, 1972), pigmentos fotossintéticos e carotenoides são reduzidos (FORNASIERO, 2003; REDDY; KAUR, 2008), há alteração da fluorescência da clorofila *a* (SINGH-RAWAL; JAJOO; BHARTI, 2010), e ainda o fluoreto pode inibir a absorção e a condutividade hidráulica (KAMALUDDIN; ZWIAZEK, 2003).

O nível dos danos notados nas plantas devido à exposição ao fluoreto vai depender da concentração do poluente, da duração da exposição, da morfologia da planta assim como da maior ou menor sensibilidade da espécie (MILLER, 1993). Por exemplo, existem relatos de que folhas jovens e em expansão são mais sensíveis à ação dos fluoretos, quando comparadas às folhas completamente expandidas (CHAVES et al., 2002; WEINSTEIN; DAVISON, 2003), há plantas que entraram em senescência após apenas três dias de exposição ao poluente por 20 minutos diários (SILVA et al., 2000) e, por outro lado, há relatos de espécies que nem sequer demonstraram sintomas visuais expressivos (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007).

## **2.2 Indicador ecológico e biomonitoramento**

A avaliação da qualidade do ar é comumente realizada a partir de estimativas das emissões, de modelos matemáticos e de medidas das concentrações ambientais dos poluentes obtidos por meio de métodos físico-químicos. Porém, nem sempre os resultados obtidos por esses métodos permitem conclusões imediatas sobre os impactos das concentrações atuais de poluentes em seres vivos. O biomonitoramento é a metodologia mais adequada e mais barata para a detecção de efeitos de poluentes atmosféricos sobre organismos (KLUMPP et al., 2001).

O biomonitoramento é a utilização de organismos vivos como indicadores da qualidade do ambiente e começou a ser explorado em meados do século passado (CARNEIRO; TAKAYANAGUI, 2009). Nos últimos 50 anos, essa técnica ganhou grande interesse científico, devido à necessidade de avaliar, de forma rápida, barata e eficiente, a qualidade ambiental a fim de traçar metas de controle ambiental (NIEMI; McDONALD, 2004). O biomonitoramento permite a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição e para isso utiliza-se dos bioindicadores.

Em geral, indicadores ecológicos, ou simplesmente bioindicadores, são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas, cuja presença, quantidade, distribuição ou outras alterações indicam a magnitude de impactos ambientais em um ecossistema (CALLISTO; GONÇALVES, 2002). A técnica de bioindicação visa avaliar as respostas de um nível biológico qualquer (indivíduo, população, comunidade ou ecossistema) a um determinado agente estressor (NIEMI; McDONALD, 2004).

Os bioindicadores podem ser usados na avaliação da condição do ambiente ou no monitoramento das alterações do mesmo ao longo do tempo. Eles

podem ainda fornecer um “sinal de alerta” às alterações no ambiente ou serem utilizados no diagnóstico da causa de um problema ambiental (DALE; BEYELER, 2001).

A escolha do nível de indicação a ser utilizado depende do objetivo do trabalho e do agente estressor a ser avaliado. Diversos autores apontam que, para avaliar as alterações no ambiente causadas por contaminação de elementos tóxicos (ex.: metais pesados, gases tóxicos, agrotóxicos), o melhor nível de indicação é o indivíduo, uma vez que são mais sensíveis e respondem mais rápido à alteração quando comparados aos níveis maiores como população ou comunidade (MENDELSSOHN; MCKEE; KONG, 2001; NIEMI; McDONALD, 2004). As respostas a nível de indivíduo avaliada frente ao agente estressor podem ser alterações morfológicas, fisiológicas, histológicas, anatômicas e ultraestruturais, além da quantificação do poluente acumulado nos tecidos pelo organismo (CARNEIRO; TAKAYANAGUI, 2009; DALE; BEYELER, 2001; FALLA et al., 2000).

Para o biomonitoramento de poluição atmosférica por elementos tóxicos, o organismo deve apresentar algumas características biológicas à exposição química, dentre elas: (1) ser de fácil medição; (2) ser sensível ao poluente; (3) ser capaz de acumular o poluente sem causar sua morte; (4) apresentar relação dose-efeito de fácil observação e (5) ter baixa variabilidade de respostas (DALE; BEYELER, 2001; WOLTERBEEK, 2003). Encontrar um candidato a bioindicador para o biomonitoramento que apresente todas essas respostas é improvável, devendo ser selecionado em função do objetivo do trabalho.

A metodologia do biomonitoramento da qualidade do ar emprega, principalmente, espécies de plantas, líquens e fungos como bioindicadores. Em relação aos líquens e fungos, o biomonitoramento, na maioria das vezes, é feito a nível de comunidade, avaliando a presença/ausência de determinadas espécies (WOLTERBEEK, 2003). Já o biomonitoramento com plantas, a nível de

organismo, emprega os conceitos de bioindicadores de reação ou de acumulação (CARNEIRO; TAKAYANAGUI, 2009).

Indicadores de reação são aqueles que respondem a poluentes definidos ou grupos de poluentes com danos visíveis ou alterações anatômicas. Indicadores de acumulação, ou bioacumuladores, são aquelas espécies relativamente tolerantes à poluição aérea, mas que acumulam substâncias tóxicas nos seus tecidos foliares, sendo que esse acúmulo é proporcional ao tempo e à concentração do poluente à que o organismo foi exposto (FALLA et al., 2000; KLUMPP; DOMINGOS; KLUMPP, 2002). Existem ainda os biosensores, que reagem discretamente aos efeitos da poluição, sem sintomas visuais, mas apresentam danos ultraestruturais (TEMMERMAN et al., 2004).

A seleção de bioindicadores para chuva ácida em ambientes terrestres tem se baseado em indicadores de reação (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006b; SILVA et al., 2005). Em relação à poluição por flúor, é possível utilizar as plantas tanto como bioindicadores de reação (SANT'ANNA-SANTOS; AZEVEDO, 2010; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007; MESQUITA et al., 2011) como de acumulação (DIVAN JÚNIOR; OLIVA; FERREIRA, 2008; KLUMPP et al., 1996; WEISNTEIN; DAVISON, 2003).

São inúmeras as vantagens do uso de bioindicadores vegetais no monitoramento da qualidade do ar. Os bioindicadores de reação fornecem: 1) resultados eficazes e baratos; 2) respostas rápidas, que apesar de serem qualitativas, podem fornecer uma ideia da concentração do poluente no ar mediante dados de literatura; 3) uma estimativa do grau da lesão no momento da pesquisa permitindo assim uma inferência do tempo de exposição. A desvantagem é que, às vezes, os sintomas podem ser confundidos com injúrias causadas por outros fatores. Já os bioindicadores de acumulação fornecem uma medida quantitativa da absorção e acumulação do poluente no tecido vegetal

proporcional ao tempo de exposição e da concentração desse no ar (WEINSTEN; DAVISON, 2003).

Grande parte dos trabalhos realizados com bioindicadores vegetais da qualidade do ar visa selecionar novas espécies bioindicadoras, avaliar a relação dose-resposta e assim definir metodologias que tornem o biomonitoramento mais confiável (WOLTERBEEK, 2003). No Brasil estão sendo realizados estudos visando determinar a resposta e o grau de sensibilidade de plantas nativas aos poluentes atmosféricos, com o intuito de selecionar espécies bioindicadoras da qualidade do ar (DOMINGOS et al., 2003; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006a, 2006b; SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2005).

O biomonitoramento da qualidade do ar utilizando espécies vegetais tem se mostrado um método eficaz (PASQUALINI et al., 2003), porém, essa técnica não pode e nem pretende substituir as medições das concentrações de poluentes no ambiente por meio de métodos físico-químicos, mas visa fornecer informações adicionais referentes aos efeitos dos poluentes atmosféricos sobre organismos vivos e deveser utilizado em paralelo com as abordagens técnicas na avaliação da qualidade do ar (KLUMPP; DOMINGOS; KLUMPP, 2002).

### **2.3 As espécies**

Para o estudo foram selecionadas duas espécies arbóreas nativas e de ampla ocorrência na região Sudeste, estando portanto sujeitas à poluição atmosférica por chuvas ácida ou fluoretada.

#### **2.3.1 *Plinia cauliflora***

*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel, é uma *Myrtaceae* conhecida popularmente como jabuticaba, jabuticaba-paulista ou jabuticaba-açu, é uma

espécie de ampla ocorrência na Mata Atlântica e com distribuição geográfica em toda a região sudeste do país e no Paraná (SOBRAL et al., 2012).

A família *Myrtaceae* possui distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrada na região neotropical e Austrália. Engloba cerca de 144 gêneros e 4.630 espécies. Essa família representa uma das maiores da flora brasileira, com 23 gêneros e mais de 1.000 espécies, com diversas árvores frutíferas. O gênero *Plinia* L. é representado no Brasil com 32 espécies, sendo 27 endêmicas (SOUZA; LORENZI, 2005), nove espécies desse gênero são conhecidos popularmente como jabuticabeiras (SASSO; CITADIN; DANNER, 2010).

As características morfológicas dessa espécie são: altura de 10-15m, com tronco liso de 30-40 cm de diâmetro; folhas simples, de 6-7 cm de comprimento por 2-3 cm de largura; flores e frutos fixados no caule. A planta é perenifólia, mesófito ou heliófito e seletiva higrófito. Ocorre preferencialmente em planícies aluviais e matas abertas do litoral e em submatas do planalto. É rara no interior de florestas primárias sombreadas. Produz grande quantidade de frutos, duas ou mais vezes por ano, o que garante regeneração natural (LORENZI, 2002).

O fruto da *P. cauliflora*, a jabuticaba, tem grande apreço para consumo *in natura* ou sob a forma de geleias, sorvetes, bebidas fermentadas e licores, tendo assim, grande potencial para comercialização (SASSO; CITADIN; DANNER, 2010).

Muitos trabalhos têm sido realizados com essa espécie, principalmente aqueles que visam maiores investigações sobre sua propagação vegetativa (MALAGI et al., 2012; SASSO; CITADIN; DANNER, 2010) e seu potencial medicinal (OLIVEIRA et al., 2011; SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

### 2.3.2 *Cupania vernalis*

Conhecida popularmente como camboatã ou arco-de-peneira, *C. vernalis*, é uma espécie arbórea de 10 a 22 m de altura, pertencente à família *Sapindaceae*, com tronco de 50-70 cm de diâmetro; possui folhas compostas, com 10-18 folíolos de 6-15 cm de comprimento. A espécie é semidecídua, heliófita e seletiva higrófila, característica de floresta semidecidual de altitude e da mata pluvial atlântica. Ocorre tanto no interior de matas primárias como em todos os estágios das formações secundárias (LORENZI, 2002).

*Sapindaceae*, a família do guaraná, possui distribuição tropical e subtropical, com poucos representantes nas regiões temperadas. Inclui cerca de 147 gêneros e 2.215 espécies (JUDD; SINGER; SINGER, 2009). No Brasil ocorrem cerca de 25 gêneros e 411 espécies. O gênero *Cupania* L. é representado por 31 espécies nativas no território brasileiro, sendo a espécie *Cupania vernalis* Cambess. de ampla ocorrência, podendo ser encontrada nos domínios fitogeográficos da Floresta Amazônica, da Mata Atlântica e do Cerrado (SOMNER; FERRUCCI; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 2012).

*Cupania vernalis* é uma espécie de interesse ecofisiológico e econômico (LIMA JÚNIOR et al., 2006) e possui grande valor para a fauna, uma vez que seus frutos são utilizados na alimentação, principalmente por pássaros, sendo esses últimos seus principais dispersores (JUDD; SINGER; SINGER, 2009; LORENZI, 2002). A espécie possui potencial medicinal e é utilizada na medicina popular contra asma e tosse convulsivas (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Devido à plasticidade dessa espécie e sua ocorrência natural em todos os estágios das formações secundárias da sucessão (LORENZI, 2002), os principais trabalhos com *C. vernalis*, visam à exploração e conservação da espécie para sua

utilização na recuperação de áreas degradadas e no paisagismo, além de obtenção de madeiras e fitoterápicos (LIMA JÚNIOR et al., 2006).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Para o estudo foram selecionadas duas espécies, *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (*Myrtaceae*) e *Cupania vernalis* Cambess. (*Sapindaceae*). A escolha dessas se deu por se tratarem de espécies que possuem ampla ocorrência na região sudeste do Brasil, onde se concentra o maior centro industrial do país (MOREIRA, 2003).

As mudas, com cinco meses de idade, foram fornecidas em sacos plásticos de 1,5 litros pelo viveiro do Instituto Estadual de Florestas localizado na cidade de Barbacena, MG. Trinta mudas de *P. cauliflora* com cerca de 20 cm de altura e trinta mudas de *C. vernalis* com cerca de 30 cm de altura foram transferidas para sacos plásticos de 3,0 L, os quais foram preenchidos com mistura de terra de subsolo, areia e esterco, em uma proporção de 2:1:1, respectivamente.

As mudas permaneceram no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada em Lavras, MG, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012, sendo mantidas à temperatura ambiente, em viveiro, sob 50% de sombreamento, com radiação média de  $660 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  até serem transferidas para sala de experimentos. Durante esse período, receberam 75 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon a 50% de força iônica (HOAGLAND; ARNON, 1950) a cada 15 dias, sendo também irrigadas, de forma que fosse sempre mantida a capacidade de campo do substrato.

### 3.2 Descrição dos experimentos

O experimento foi dividido em duas partes. Entre os dias seis a dezesseis de janeiro de 2012 foi realizado o experimento com *P. cauliflora* e entre os dias vinte e um a trinta e um de janeiro de 2012 foi realizado o experimento com *C. vernalis*.

Cinco dias antes do início de cada experimento, as plantas foram transferidas para a sala de experimentos do Laboratório de Ecologia da UFLA, para aclimatização, onde permaneceram até o final das simulações de chuva, para que não houvesse grande interferência de estressores ambientais na resposta das plantas aos tratamentos.

Ao longo do período experimental, as plantas foram submetidas a fotoperíodo de 12 horas, com radiação global média de  $24,3 \pm 2,1 \text{ W m}^{-2}$  o que correspondeu a um valor médio de  $110,8 \pm 9,4 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Durante o período experimental com *P. cauliflora* a média da umidade relativa do ar foi de  $72,5 \pm 2,4 \%$  e as temperaturas máxima, média e mínima durante o período foram de:  $25,4 \pm 0,8$ ;  $23,1 \pm 0,8$ ;  $19,4 \pm 1,1 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Durante o período experimental com *C. vernalis* a média da umidade relativa do ar foi de  $67,5 \pm 4,2 \%$  e as temperaturas máxima, média e mínima durante o período foram de:  $26,7 \pm 0,8$ ;  $24,2 \pm 0,8$ ;  $21,1 \pm 1,1 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente.

A intensidade da radiação foi mensurada por meio de um quantômetro-fotômetro-radiômetro LI-COR, modelo LI-185, equipado com um sensor quântico. As temperaturas máxima, média e mínima e a umidade relativa do ar foram mensuradas com Termo Higrômetro digital INCOTERM<sup>®</sup> modelo 7663.02.0.00.

Em cada espécie vegetal foram realizadas a simulação de chuva ácida e chuva fluoretada, separadamente, durante 10 dias consecutivos. As plantas foram submetidas a 15 minutos diários de chuva simulada, totalizando 9,15mm

dia<sup>-1</sup> de precipitação, a qual foi aplicada em uma câmara construída a partir do modelo proposto por Evans, Gmur e Costa (1977), com algumas adaptações.

Em ambas as espécies, para simulação da chuva ácida foram utilizados dois tratamentos controle (chuva apenas com água deionizada, pH 6,0) e ácido com pH 3,0. O tratamento de chuva ácida foi preparado mediante a mistura de ácido sulfúrico 1 M adicionado à água destilada. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento.

Os valores de pH das soluções de cada tratamento foram aferidos com pHmetro portátil Hanna HI 98127.

Para simulação da chuva fluoretada em *P. cauliflora* e *C. vernalis* foram utilizados quatro tratamentos por espécie: controle (chuva apenas com água deionizada) e três tratamentos com diferentes concentrações de flúor (F). Os tratamentos de chuva com F foram preparados mediante a mistura de flúor, na forma de fluoreto de potássio, em água deionizada, nas seguintes concentrações: 10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup>. O pH de todos os tratamentos foi ajustado para 6,0 com solução de HCl 2N. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento.

### **3.3 Análises morfológicas, externa e interna**

Durante o período experimental foram feitas observações diárias nas folhas para detecção da presença de injúrias relacionadas à ação da chuva ácida e da chuva fluoretada, tendo sido realizado o registro fotográfico das folhas antes do início da simulação e vinte e quatro horas após o término dos experimentos.

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Para a avaliação das modificações anatômicas das espécies selecionadas, folhas completamente

expandidas localizadas no terceiro nó de *P. cauliflora* e folíolos de folhas completamente expandidas localizadas no primeiro nó de *C. vernalis* foram coletados e fixados em F.A.A.<sub>70</sub> (JOHANSEN, 1940).

Em cada tratamento, foram retiradas duas folhas do terceiro nó de *P. cauliflora* e o segundo folíolo de folhas do primeiro nó de *C. vernalis* por repetição, em um total de cinco repetições. Após fixação, regiões medianas dos folíolos foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesina, *Leica Instruments*). Utilizando micrótomo de deslizamento, foram feitas secções transversais com 8,0 µm de espessura, as quais foram coradas com azul de toluidina pH 4,7 (O'BRIEN; MCCULLY, 1981). As lâminas permanentes foram montadas em bálsamo do Canadá. As imagens foram capturadas por câmera Moticam 2500 acoplada a microscópio *Olympus CX 41*.

Foram mensuradas as espessuras da epiderme na face adaxial, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso, da epiderme na face abaxial, do limbo foliar e do mesofilo. Foram mensurados 25 campos por características avaliadas por repetição, utilizando-se o *software Image Tool* versão 3.0 para *Windows*, disponibilizado pelo *University of Texas Health Science Center at Santo Antonio* (EUA).

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa *Sisvar 5.1* (FERREIRA, 2008).

### **3.4 Análise ultraestrutural**

Para a análise ultraestrutural, foram seguidos os protocolos proposto por Alves (2009). Amostras foliares foram preparadas e observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Vinte e quatro horas após a última simulação de chuva em cada espécie, fragmentos foliares de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> foram retirados de folhas completamente expandidas localizadas no segundo nó de *P. cauliflora* e do terceiro folíolo de folhas completamente expandidas localizadas no primeiro nó de *C. vernalis* e fixados em solução *Karnovsky* (glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%), em tampão cacodilato, pH 7,0, 0,05 M + CaCl<sub>2</sub> 0,001 M). Posteriormente, as amostras foram lavadas (três vezes por 10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M. Posteriormente, foi feita pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (1,0%) com o mesmo tampão, por 1 hora. Em seguida, o material foi desidratado em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes).

As amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico, depois montadas em *stubs* e deixadas em câmara seca por 24 horas. Após receberem cobertura com ouro, foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura (Leo Evo 40) para análises e captura de imagens.

### **3.5 Fluorescência da clorofila *a***

As medidas das variáveis da fluorescência da clorofila *a* foram obtidas utilizando o fluorômetro portátil modulado MINI-PAM (WALZ).

Uma das variáveis avaliada foi o rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm) que indica a máxima eficiência em que a luz absorvida pelo fotossistema II é convertida em energia química (BAKER; HARBINSON; KRAMER, 2007).

Para a medição do rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm) foi utilizado uma pinça especial modelo DLC-8, as medições foram realizadas após 30 minutos de aclimação ao escuro. O Fv/Fm foi mensurado

apenas em *C. vernalis* (terceiro folíolo de folhas completamente expandidas localizadas no primeiro nó) devido às características da folha de *P. cauliflora*.

O Fv/Fm foi mensurado nos, primeiro, terceiro, quinto, sétimo e nono dias de experimento, antes da simulação da chuva, e 24 horas após a simulação da última chuva, décimo primeiro dia de experimento.

Para as medições das características associadas à fluorescência da clorofila *a* no claro foi utilizado uma pinça especial para suporte da folha modelo 2030-B. As medições foram feitas em folhas completamente expandidas localizadas no segundo nó de *P. cauliflora* e do terceiro folíolo de folhas completamente expandidas localizadas no primeiro nó de *C. vernalis*, por meio da aplicação de oito pulsos sucessivos de luz actínica saturante (PAR) sobre as folhas. As características de fluorescência da clorofila *a* no claro mensuradas foram: produtividade quântica do fotossistema II (*yield*), taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), *quenching* fotoquímico (qP), *quenching* não-fotoquímico (qN) e coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) que monitoram a perda de calor do fotossistema II e suas antenas (BAKER; HARBINSON; KRAMER, 2007) atuando como um segundo mecanismo de regulação e proteção (HOLT et al., 2005).

As características de fluorescência da clorofila *a* no claro foram mensuradas antes do início da primeira simulação das chuvas, e vinte e quatro horas após o término da última simulação.

Os dados de fluorescência da clorofila *a*, no escuro e no claro, foram mensurados em cinco folhas de cada tratamento, sendo uma folha por repetição.

Para a análise dos dados de fluorescência da clorofila *a*, no escuro, foi realizada regressão linear, onde Fv/Fm, foi considerado a variável resposta e os dias do experimento como variável determinante.

Para a análise dos dados de fluorescência da clorofila *a*, no claro, a fim de verificar a diferença entre os tratamentos, foi feita uma análise de variância

(ANAVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5%. As análises foram realizadas no programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

### **3.6 Quantificação do Flúor**

Para determinação do teor de flúor, foram coletadas amostras de folhas inteiras de todas as plantas, 24h após a última chuva. As amostras foram previamente secas em estufa de circulação forçada a 70°C até se obter massa constante e trituradas, em moinho tipo *Wiley*, em partículas com dimensões inferiores a 1,0 mm. Alíquotas de 0,5g foram submetidas à extração com ácido perclórico 0,1 M (GARCIA-CIUDAD; GARCIA-CRIADO; PONTON-SAN EMETERIO, 1985). Para determinação potenciométrica do teor de flúor, foi utilizado o ajustador de força iônica (ORION) proposto por Larsen e Widdowson (1971), com eletrodo específico para flúor. As análises de quantificação do flúor foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para a análise dos dados de teor de flúor na massa seca, foi realizada regressão linear, onde o teor de flúor nos tecidos foi considerado a variável resposta e a concentração do poluente na chuva como variável determinante. A fim de verificar a diferença entre os tratamentos, foi feita uma análise de variância (ANAVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5%. As análises foram realizadas no programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da simulação de chuva ácida sobre as características morfológicas e ultraestruturais das espécies estudadas

Após o término do experimento de simulação de chuva ácida (pH = 3,0) a espécie *P. cauliflora* apresentou clorose pouco acentuada e manchas necróticas na borda de algumas folhas quando comparadas com o tratamento controle (pH = 6,0) (Figura 1).

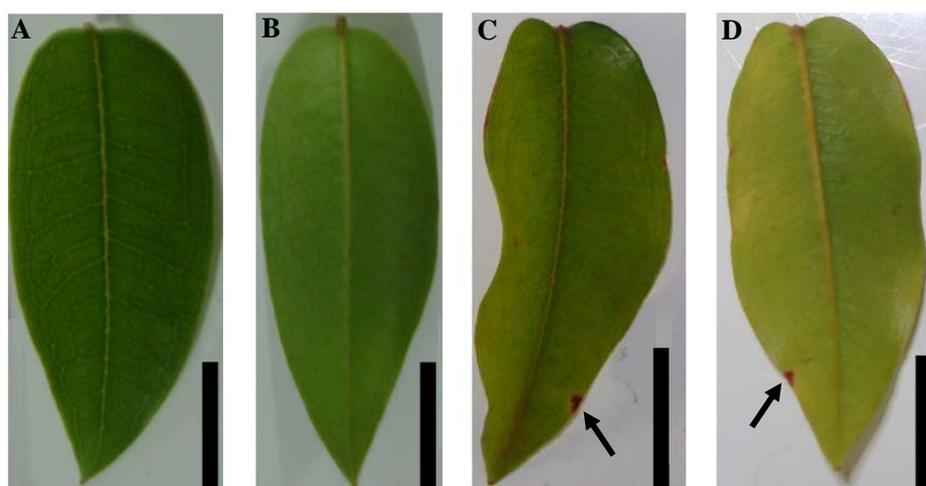


Figura 1 Folhas de *Plinia cauliflora* expostas à chuva simulada, durante dez dias. A (face adaxial) e B (face abaxial): tratamento controle (pH = 6,0); C (face adaxial) e D (face abaxial) apresentado mancha necrótica (seta): chuva ácida (pH=3,0). Barras = 1 cm

As análises anatômicas em microscopia de luz mostraram que o mesofilo das folhas de *P. cauliflora* é dorsiventral e apresenta, em secção transversal, epiderme das faces adaxial e abaxial unisseriadas, parênquima paliçádico composto por duas a três camadas de células e parênquima esponjoso,

composto por 4 a 5 camadas de células e com muitos espaços intercelulares (Figura 2).

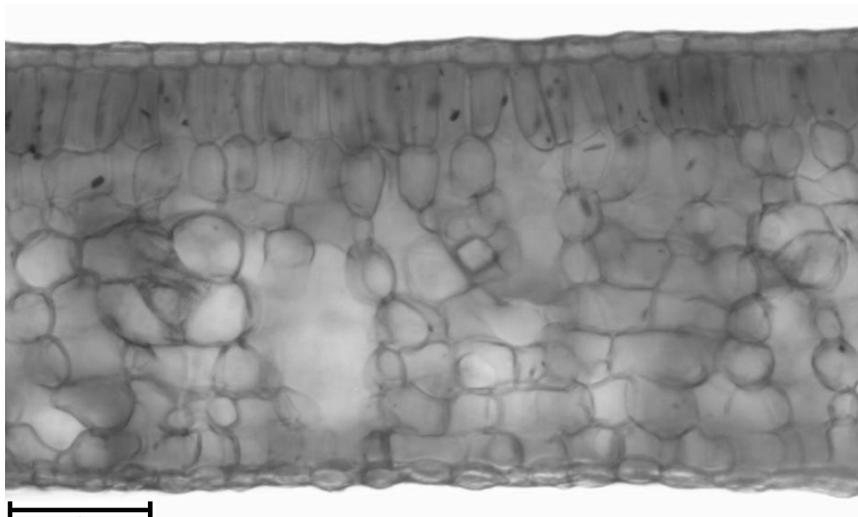


Figura 2 Seção transversal da estrutura foliar de *Plinia cauliflora* em microscopia de luz. Barra = 50  $\mu\text{m}$

Não foram detectadas alterações na espessura de nenhum dos tecidos de *P. cauliflora* entre as plantas do tratamento controle e as plantas expostas à chuva ácida (Tabela 1).

Tabela 1 Espessura média ( $\mu\text{m}$ ) dos tecidos das folhas do 3º nó de plantas de *Plinia cauliflora* submetidas à chuva ácida

| <b>Tratamento</b>          | <b>Epiderme da face adaxial</b> | <b>Parênquima paliçádico</b> | <b>Parênquima esponjoso</b> | <b>Epiderme da face abaxial</b> | <b>Mesofilo</b> | <b>Limbo foliar</b> |
|----------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------------|
| <b>Controle (pH = 6,0)</b> | 11,22                           | 59,14                        | 105,99                      | 9,35                            | 165,13          | 185,70              |
| <b>Ácido (pH = 3,0)</b>    | 11,38                           | 58,42                        | 108,01                      | 9,02                            | 166,43          | 186,83              |
| <b>F<sub>calc</sub></b>    | 0,080                           | 0,074                        | 0,400                       | 1,114                           | 0,081           | 0,058               |
| <b>p-valor</b>             | 0,7735                          | 0,7866                       | 0,5301                      | 0,2965                          | 0,7771          | 0,8110              |
| <b>C.V.</b>                | 13,17                           | 15,92                        | 10,52                       | 11,98                           | 9,70            | 8,57                |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub>(F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

A nível ultraestrutural as plantas de *P. cauliflora* expostas à chuva ácida apresentaram modificações na superfície foliar quando comparadas com o tratamento controle (Figura 3). Na face adaxial da epiderme foram detectadas a erosão e a formação de placas de cera epicuticular, além da colonização da superfície foliar por hifas fúngicas (Figura 3C). Na face abaxial da epiderme foi detectado apenas a colonização da superfície foliar por hifas fúngicas (Figura 3D).

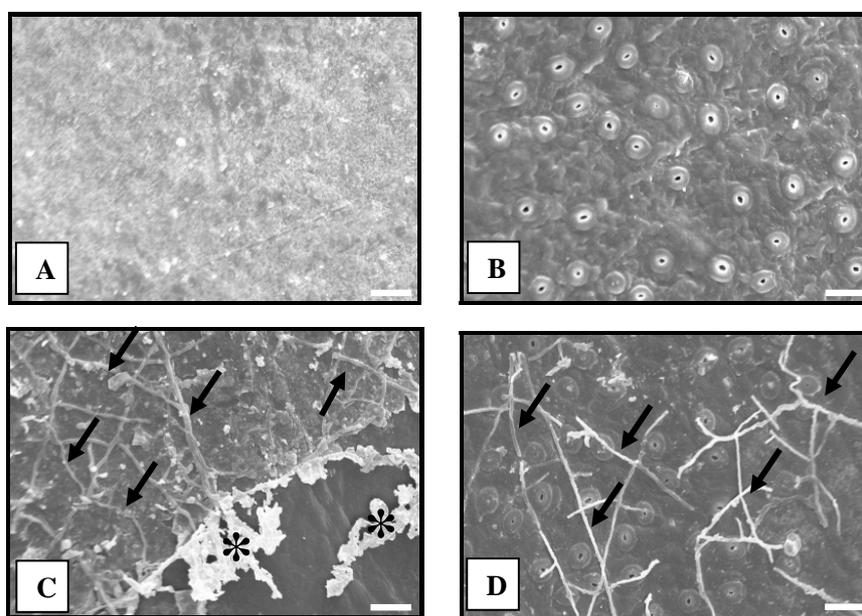


Figura 3 Eletromicrografias de folhas de *P. cauliflora* expostas à chuva simulada durante dez dias. Tratamento controle (pH = 6,0), A superfície adaxial e B superfície abaxial; Chuva ácida (pH = 3,0), C superfície adaxial apresentando erosão e formação de placas de cera epicuticular (\*) e colonização por hifas fúngicas(setas) e D superfície abaxial com colonização por hifas fúngicas (setas). Barras = 20  $\mu$ m

Após o término do experimento de simulação de chuva ácida (pH = 3,0) a espécie *C. vernalis* não apresentou nenhuma alteração visível em suas folhas quando comparadas com o tratamento controle (pH = 6,0) (Figura 4).

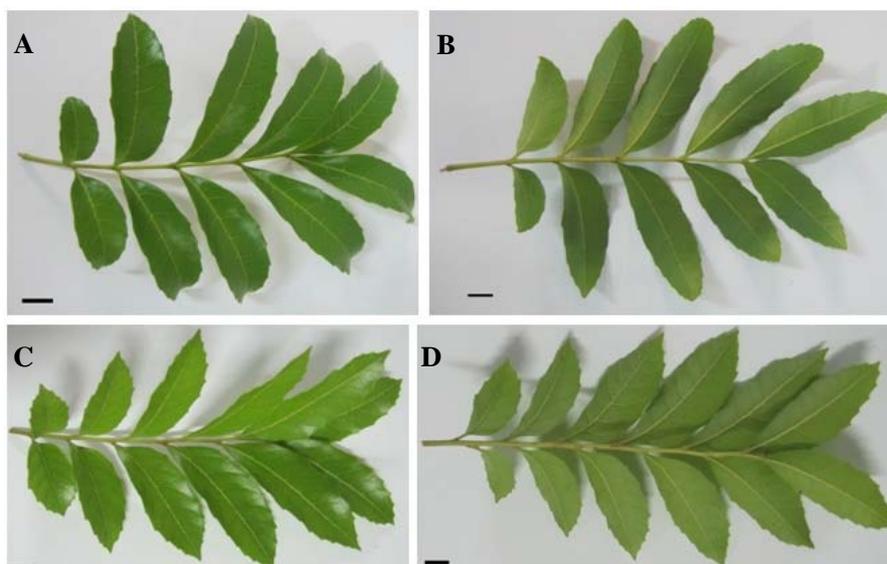


Figura 4 Folhas de *Cupania vernalis* expostas à chuva simulada, durante dez dias. A (face adaxial) e B (face abaxial): tratamento controle (pH = 6,0); C (face adaxial) e D(face abaxial): chuva ácida (pH=3,0). Barras = 1 cm

As análises anatômicas em microscopia de luz mostraram que o mesofilo dos folíolos de *C. vernalis* é dorsiventral e apresenta, em secção transversal, epiderme na face adaxial unisseriada com cutícula bem visível, parênquima paliçádico composto por uma a duas camadas de células e parênquima esponjoso, composto por 4 a 5 camadas de células e com muitos espaços intercelulares e epiderme na face abaxial unisseriada com presença de tricomas glandulares (Figura 5).

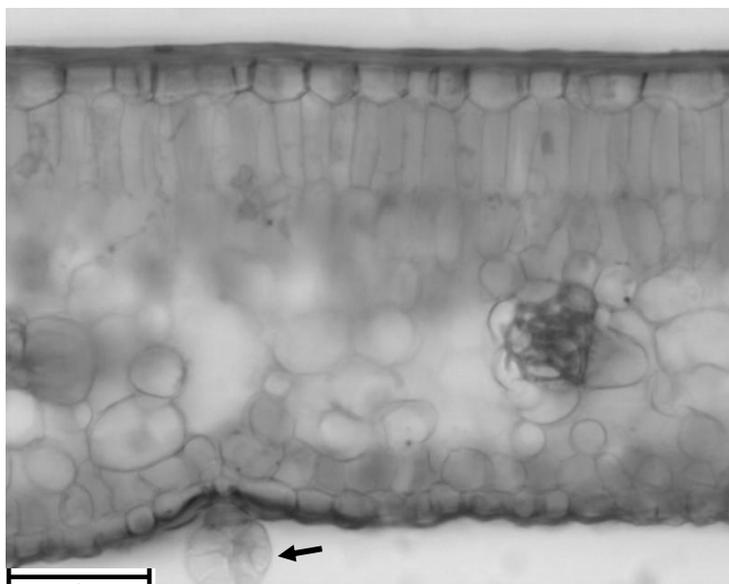


Figura 5 Secção transversal da estrutura foliar de *Cupania vernalis* em microscopia de luz. Detalhe de um tricoma glandular na epiderme da face abaxial (seta). Barra = 50  $\mu\text{m}$

Não foram detectadas alterações na espessura de nenhum dos tecidos de *C. vernalis* entre as plantas do tratamento controle e as plantas expostas à chuva ácida (Tabela 2).

Tabela 2 Espessura média ( $\mu\text{m}$ ) dos tecidos do 2º folíolo de folhas do 1º nó de plantas de *Cupania vernalis* submetidas à chuva ácida

| <b>Tratamento</b>          | <b>Epiderme da face adaxial</b> | <b>Parênquima paliçádico</b> | <b>Parênquima esponjoso</b> | <b>Epiderme da face abaxial</b> | <b>Mesofilo</b> | <b>Limbo foliar</b> |
|----------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------------|
| <b>Controle (pH = 6,0)</b> | 16,49                           | 44,11                        | 86,72                       | 11,04                           | 130,84          | 158,38              |
| <b>Ácido (pH = 3,0)</b>    | 15,22                           | 42,70                        | 91,19                       | 11,48                           | 133,89          | 160,58              |
| <b>F<sub>calc</sub></b>    | 3,820                           | 0,531                        | 1,313                       | 0,965                           | 0,430           | 0,207               |
| <b>p-valor</b>             | 0,0565                          | 0,4699                       | 0,2576                      | 0,3308                          | 0,5153          | 0,6510              |
| <b>C.V.</b>                | 14,53                           | 15,78                        | 15,46                       | 14,02                           | 12,41           | 10,76               |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

A nível ultraestrutural as plantas de *C. vernalis* expostas à chuva ácida apresentaram modificações na superfície foliar quando comparadas com o tratamento controle (Figura 6). Na face adaxial da epiderme foram detectadas erosão e formação de placas de cera epicuticular, além da colonização da superfície foliar por hifas fúngicas (Figura 6C). Na face abaxial da epiderme foi detectado apenas a colonização da superfície foliar por hifas fúngicas (Figura 6D).

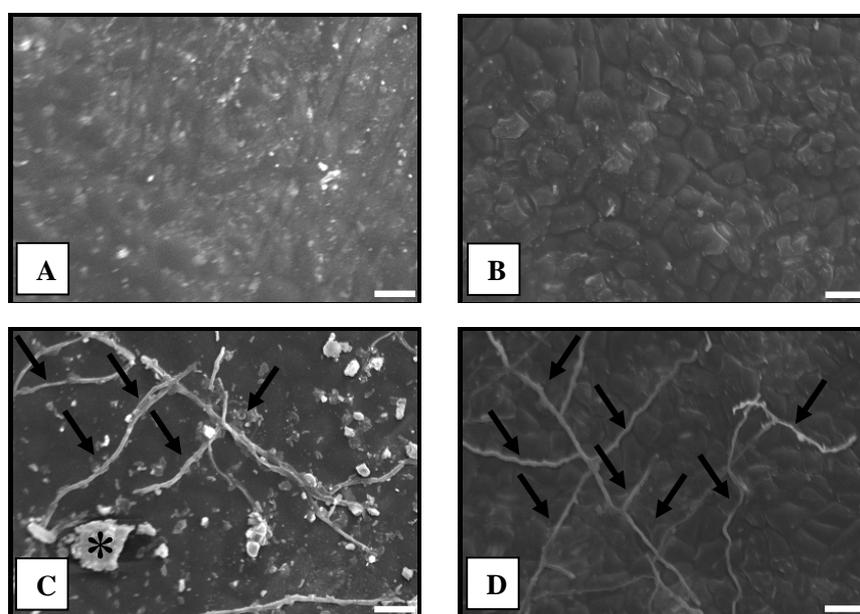


Figura 6 Eletromicrografias de folhas de *Cupania vernalis* expostas à chuva simulada durante dez dias. Tratamento controle (pH = 6,0), A superfície adaxial e B superfície abaxial; Chuva ácida (pH = 3,0), C superfície adaxial apresentando erosão e formação de placas de cera epicuticular(\*) e colonização por hifas fúngicas (setas) e D superfície abaxial apresentando colonização por hifas fúngicas (setas). Barras = 20  $\mu$ m

#### 4.2 Efeitos da simulação de chuva fluoretada sobre as características morfológicas e ultraestruturais das espécies estudadas

Após o término do experimento de simulação de chuva fluoretada a espécie *P. cauliflora* não apresentou injúria foliar visível a olho nu nas faces, adaxial (Figura 7) e abaxial (Figura 8) em nenhum dos tratamentos.

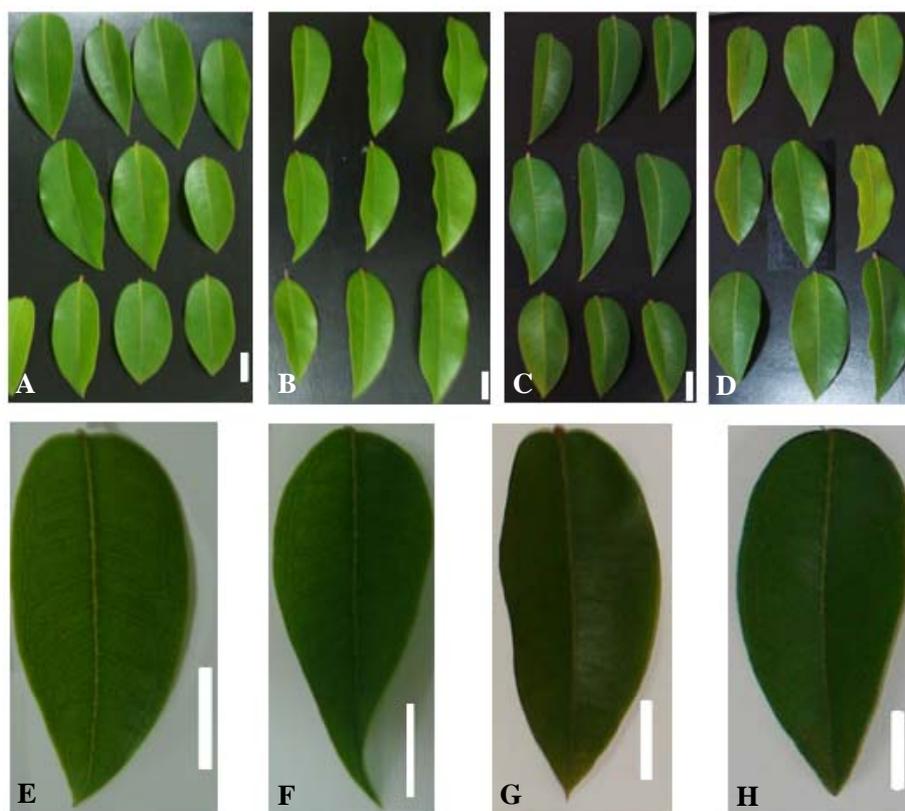


Figura 7 Superfície adaxial de folhas de *Plinia cauliflora* expostas a diferentes concentrações de fluoreto em chuva simulada, durante dez dias. A e E: controle ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ); B e F:  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; C e G:  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ; D e H:  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Barras = 1 cm

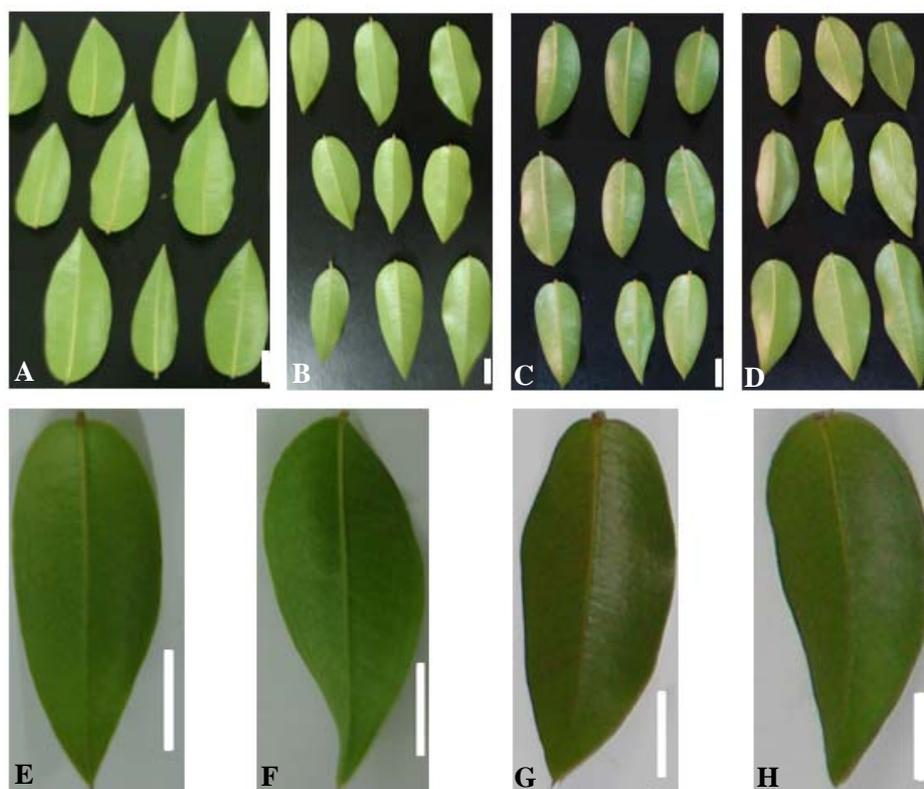


Figura 8 Superfície abaxial de folhas de *Plinia cauliflora* expostos a diferentes concentrações de fluoreto em chuva simulada, durante dez dias. A e E: controle ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ); B e F:  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; C e G:  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ; D e H:  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Barras = 1 cm

Não foram detectadas alterações na espessura de nenhum dos tecidos de *P. cauliflora* entre as plantas do tratamento controle e as plantas expostas à chuva fluoretada (Tabela 3).

Tabela 3 Espessura média ( $\mu\text{m}$ ) dos tecidos das folhas do 3º nó de plantas de *Pliniacauliflora* submetidas à chuva fluoretada

| <b>Tratamento</b>                      | <b>Epiderme da face adaxial</b> | <b>Parênquima paliçádico</b> | <b>Parênquima esponjoso</b> | <b>Epiderme da face abaxial</b> | <b>Mesofilo</b> | <b>Limbo foliar</b> |
|--|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------------|
| <b>Controle - 0 mg L<sup>-1</sup></b>  | 11,22                           | 59,14                        | 105,99                      | 9,35                            | 165,13          | 185,70              |
| <b>Fluoreto - 10 mg L<sup>-1</sup></b> | 11,58                           | 57,52                        | 107,65                      | 9,54                            | 165,17          | 186,29              |
| <b>Fluoreto - 15 mg L<sup>-1</sup></b> | 11,87                           | 56,38                        | 107,14                      | 9,57                            | 163,52          | 184,96              |
| <b>Fluoreto - 20 mg L<sup>-1</sup></b> | 11,44                           | 57,94                        | 107,22                      | 9,49                            | 165,16          | 186,09              |
| <b>F<sub>calc</sub></b>                | 0,830                           | 0,510                        | 0,096                       | 0,134                           | 0,081           | 0,040               |
| <b>p-valor</b>                         | 0,4808                          | 0,6733                       | 0,9627                      | 0,9397                          | 0,9706          | 0,9900              |
| <b>C.V.</b>                            | 13,04                           | 13,80                        | 10,71                       | 13,89                           | 8,72            | 7,99                |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

A nível ultraestrutural as plantas de *P. cauliflora* expostas à chuva fluoretada apresentaram modificações na superfície foliar quando comparadas com o tratamento controle (Figura 9 e 10).

Na face adaxial da epiderme foram detectadas erosão e formação de placas de cera epicuticular além da colonização da superfície foliar por hifas fúngicas em todos os tratamentos com fluoreto (Figura 9B, C e D).

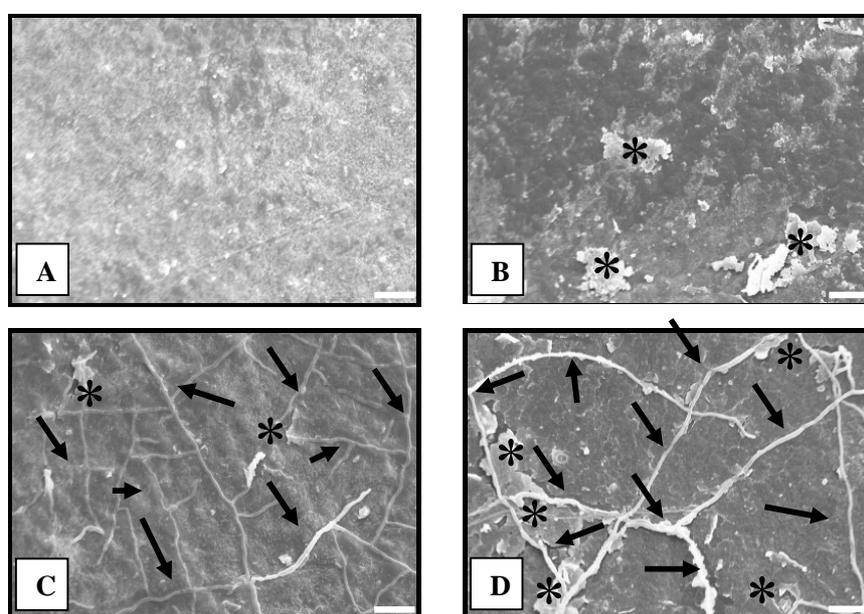


Figura 9 Eletromicrografias da superfície adaxial de folhas de *Plinia cauliflora* expostas à chuva fluoretada durante dez dias consecutivos. A) controle ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ); B)  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; C)  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ; D)  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . B, C e D apresentando erosão e formação de placas de cera epicuticular e colonização por hifas fúngicas. Barras =  $20 \mu\text{m}$

Na face abaxial da epiderme foram detectadas erosão e o acúmulo de cera epicuticular, porém em menor proporção que na face adaxial, em todos os

tratamentos com fluoreto, além da colonização da superfície foliar por hifas fúngicas (Figura 10B, C e D).

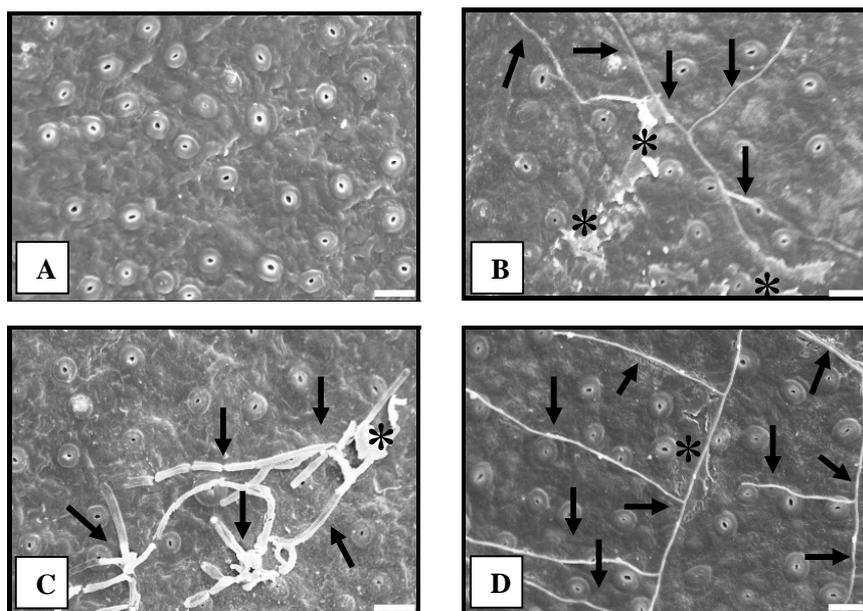


Figura 10 Eletromicrografias da superfície abaxial de folhas de *Plinia cauliflora* expostas à chuva fluoretada durante dez dias consecutivos. A) controle ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ); B) ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ); C) ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ); D) ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ). B, C e D apresentando erosão e formação de placa de cera epicuticular (\*) e colonização por hifas fúngicas (setas). Barras =  $20 \mu\text{m}$

Após o término do experimento de simulação de chuva fluoretada a espécie *C. vernalis* apresentou clorose como injúria foliar visível a olho nu nas faces, adaxial (Figura 11) e abaxial (Figura 12) em todos os tratamentos, exceto o controle, sendo o dano mais acentuado no tratamento de maior concentração.

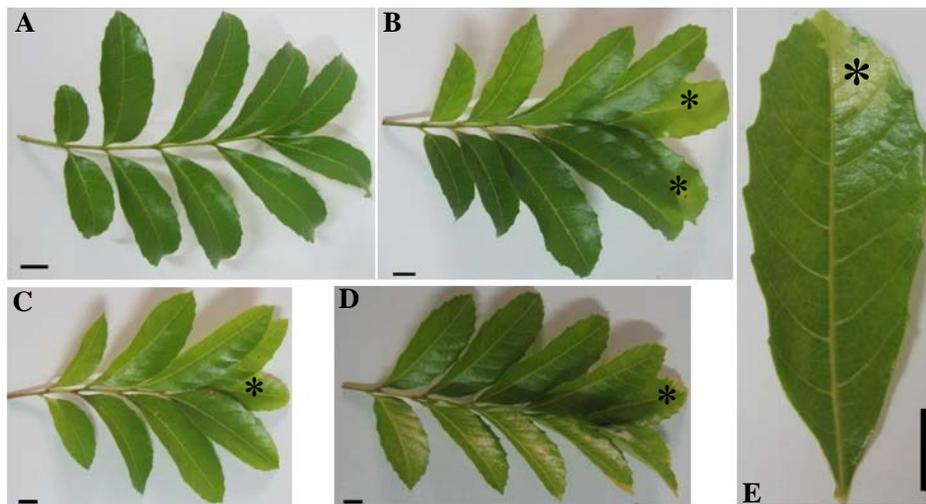


Figura 11 Superfície adaxial de folhas de *Cupania vernalis* expostas a diferentes concentrações de fluoreto em chuva simulada, durante dez dias. A: controle (0 mg L<sup>-1</sup>); B: 10 mg L<sup>-1</sup>; C: 15 mg L<sup>-1</sup>; D e E: 20 mg L<sup>-1</sup>. Clorose (\*). Barras = 1 cm

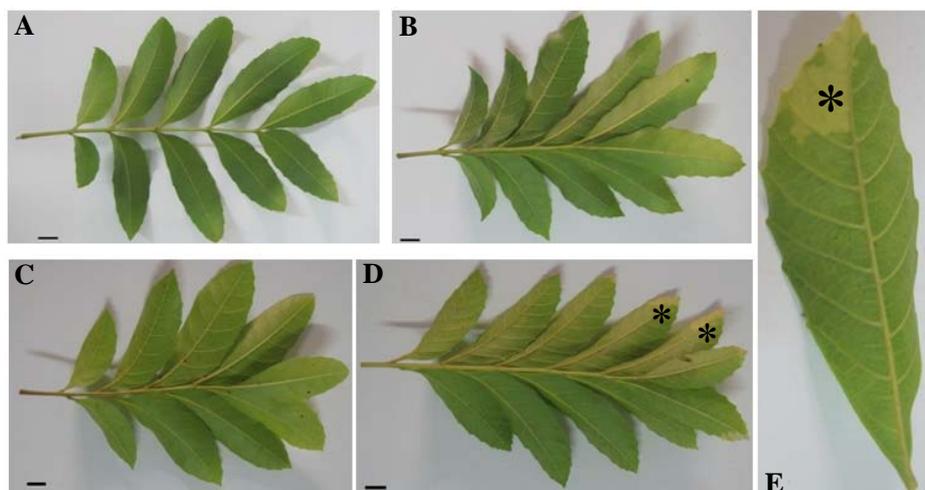


Figura 12 Superfície abaxial de folhas de *Cupania vernalis* expostas a diferentes concentrações de fluoreto em chuva simulada, durante dez dias. A: controle ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ); B:  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; C:  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ; D e E:  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Clorose (\*). Barras = 1 cm

Não foram detectadas alterações na espessura de nenhum dos tecidos de *C. vernalis* entre as plantas do tratamento controle e as plantas expostas à chuva fluoretada (Tabela 4).

Tabela 4 Espessura média ( $\mu\text{m}$ ) dos tecidos do 2º folíolo de folhas do 1º nó de plantas de *Cupania vernalis* submetidas à chuva fluoretada

| <b>Tratamento</b>                      | <b>Epiderme da face adaxial</b> | <b>Parênquima paliçádico</b> | <b>Parênquima esponjoso</b> | <b>Epiderme da face abaxial</b> | <b>Mesofilo</b> | <b>Limbo foliar</b> |
|--|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------------|
| <b>Controle - 0 mg L<sup>-1</sup></b>  | 16,49                           | 44,11                        | 86,72                       | 11,04                           | 130,83          | 158,36              |
| <b>Fluoreto - 10 mg L<sup>-1</sup></b> | 15,82                           | 41,43                        | 88,23                       | 11,20                           | 129,66          | 156,68              |
| <b>Fluoreto - 15 mg L<sup>-1</sup></b> | 16,06                           | 42,39                        | 89,14                       | 11,25                           | 131,53          | 158,84              |
| <b>Fluoreto - 20 mg L<sup>-1</sup></b> | 15,20                           | 41,85                        | 92,92                       | 10,85                           | 134,77          | 160,82              |
| <b>F<sub>calc</sub></b>                | 1,135                           | 0,519                        | 1,885                       | 0,389                           | 0,714           | 0,421               |
| <b>p-valor</b>                         | 0,3391                          | 0,6702                       | 0,1373                      | 0,7608                          | 0,5462          | 0,7381              |
| <b>C.V.</b>                            | 15,94                           | 19,28                        | 10,76                       | 12,94                           | 9,83            | 8,26                |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

A nível ultraestrutural as plantas de *C. vernalis* expostas à chuva fluoretada apresentaram modificações na superfície foliar quando comparadas com o tratamento controle (Figuras 13 e 14).

Na face adaxial da epiderme foram detectadas erosão e formação de placas de cera epicuticular em todos os tratamentos com fluoreto, além da colonização da superfície foliar por hifas fúngicas (Figura 13B, C e D).

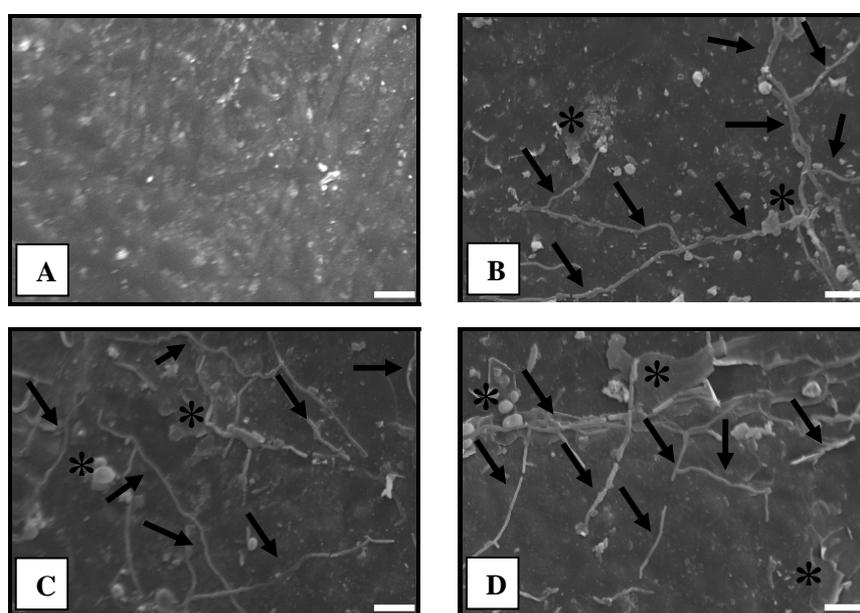


Figura 13 Eletromicrografias da superfície adaxial de folhas de *Cupania vernalis* expostas à chuva fluoretada durante dez dias consecutivos. A) controle (0 mg L<sup>-1</sup>); B) (10 mg L<sup>-1</sup>); C) (15 mg L<sup>-1</sup>); D) (20 mg L<sup>-1</sup>). B, C e D apresentando erosão e formação de placas de cera epicuticular (\*) e colonização por hifas fúngicas (setas). Barras = 20  $\mu$ m

Na face abaxial da epiderme também foram detectadas erosão e o acúmulo de cera epicuticular e colonização da superfície foliar por hifas fúngicas, em todos os tratamentos com fluoreto (Figura 14B, C e D).

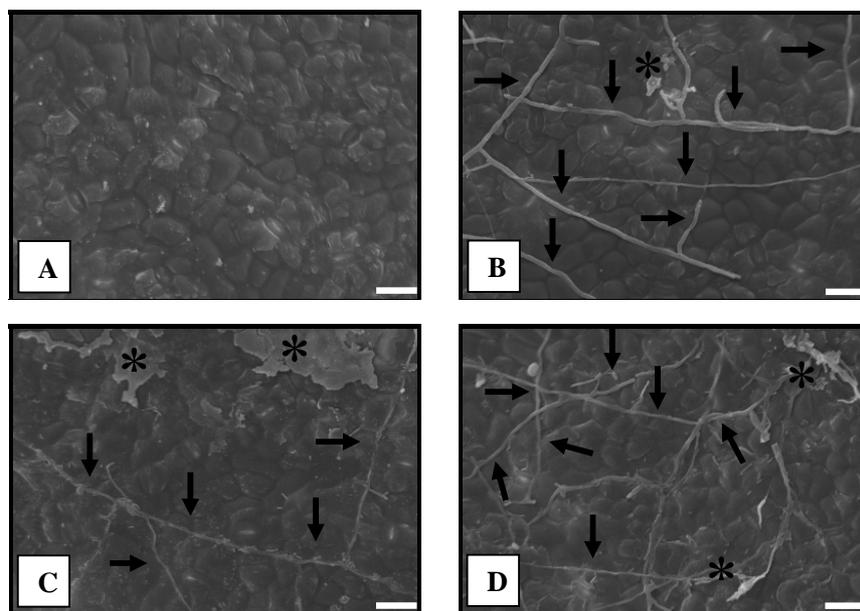


Figura 14 Eletromicrografias da superfície abaxial de folhas de *Cupania vernalis* (A) (0 mg L<sup>-1</sup>); B) (10 mg L<sup>-1</sup>); C) (15 mg L<sup>-1</sup>); D) (20 mg L<sup>-1</sup>). B, C e D apresentando erosão e formação de placas de cera epicuticular (\*) e colonização por hifas fúngicas (setas). Barras = 20 µm

#### 4.3 Efeitos da simulação das chuvas, ácida ou fluoretada, sobre as características da fluorescência da clorofila *a* das espécies estudadas

Antes do início das simulações (dia 1), foi verificado que todas as mudas de *P. cauliflora* utilizadas na realização do experimento com simulação de chuva ácida não apresentavam diferença significativa em nenhuma das características de fluorescência da clorofila *a* avaliadas (Tabela 5), demonstrando que as mudas de *P. cauliflora*, do tratamento controle (pH = 6,0) e do tratamento com chuva ácida (pH=3,0) estavam sob as mesmas condições iniciais.

Tabela 5 Produtividade quântica do fotossistema II (*yield*), da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), do *quenching* fotoquímico (qP), do *quenching* não fotoquímico (qN) e do coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) de *Plinia cauliflora* entre plantas do tratamento controle (pH = 6,0) e da chuva ácida (pH = 3,0) antes do início do experimento

| Tratamento                 | Variáveis analisadas |        |        |        |        |
|----------------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|
|                            | <i>yield</i>         | ETR    | qP     | qN     | NPQ    |
| <b>Controle (pH = 6,0)</b> | 0,022                | 35,48  | 0,169  | 0,885  | 1,212  |
| <b>Ácido (pH = 3,0)</b>    | 0,019                | 31,22  | 0,121  | 0,848  | 1,369  |
| <b>F<sub>calc</sub></b>    | 1,257                | 1,261  | 1,341  | 0,338  | 0,641  |
| <b>p-valor</b>             | 0,2948               | 0,2940 | 0,2802 | 0,5771 | 0,4464 |
| <b>C.V.</b>                | 17,87                | 17,98  | 44,88  | 11,74  | 23,99  |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

Vinte e quatro horas após o término das simulações (dia 11) foi possível verificar que a chuva ácida não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) nenhuma das características de fluorescência da clorofila *a* avaliadas (Tabela 6) em *P. cauliflora*.

Tabela 6 Produtividade quântica do fotossistema II (*yield*), da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), do *quenching* fotoquímico (qP), do *quenching* não fotoquímico (qN) e do coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) de *Plinia cauliflora* entre plantas do tratamento controle (pH = 6,0) e da chuva ácida (pH = 3,0) vinte e quatro horas após o término do experimento

| Tratamento                 | Variáveis analisadas |        |        |        |        |
|----------------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|
|                            | <i>yield</i>         | ETR    | qP     | qN     | NPQ    |
| <b>Controle (pH = 6,0)</b> | 0,021                | 34,80  | 0,114  | 0,860  | 1,186  |
| <b>Ácido (pH = 3,0)</b>    | 0,020                | 32,18  | 0,090  | 0,832  | 1,189  |
| <b>F<sub>calc</sub></b>    | 1,347                | 1,354  | 3,352  | 2,975  | 0,000  |
| <b>p-valor</b>             | 0,2792               | 0,2782 | 0,1045 | 0,1228 | 0,9846 |
| <b>C.V.</b>                | 10,58                | 10,63  | 20,43  | 2,99   | 16,07  |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

Antes do início das simulações (dia 1), foi verificado que todas as mudas de *P. cauliflora* utilizadas na realização do experimento com simulação de chuva fluoretada não apresentavam diferença significativa em nenhuma das características de fluorescência da clorofila *a* avaliadas (Tabela 7), demonstrando que as mudas de *P. cauliflora* do tratamento controle (0 mg L<sup>-1</sup>) e do tratamento com chuva fluoretada (10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup> de KF) estavam sob as mesmas condições iniciais.

Tabela 7 Produtividade quântica do fotossistema II (*yield*), da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), do *quenching* fotoquímico (qP), do *quenching* não fotoquímico (qN) e do coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) de *Plinia cauliflora* entre plantas do tratamento controle (0 mg L<sup>-1</sup>) e da chuva fluoretada (10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup>) antes do início do experimento

| Tratamento                             | Variáveis analisadas |        |        |        |        |
|--|----------------------|--------|--------|--------|--------|
|  | <i>yield</i>         | ETR    | qP     | qN     | NPQ    |
| <b>Controle - 0 mg L<sup>-1</sup></b>  | 0,022                | 35,48  | 0,169  | 0,885  | 1,212  |
| <b>Fluoreto - 10 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,024                | 39,04  | 0,166  | 0,885  | 1,237  |
| <b>Fluoreto - 15 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,021                | 33,87  | 0,104  | 0,829  | 1,141  |
| <b>Fluoreto - 20 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,024                | 38,40  | 0,126  | 0,837  | 1,119  |
| <b>F<sub>calc</sub></b>                | 0,551                | 0,543  | 1,749  | 1,098  | 0,440  |
| <b>p-valor</b>                         | 0,6550               | 0,6598 | 0,1974 | 0,3785 | 0,7276 |
| <b>C.V.</b>                            | 20,16                | 20,21  | 37,66  | 7,48   | 16,13  |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

Vinte e quatro horas após o término das simulações (dia 11) foi possível verificar que a chuva fluoretada não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) nenhuma das características de fluorescência da clorofila *a* avaliadas (Tabela 8) em *P.cauliflora*.

Tabela8 Análise de variância da produtividade quântica do fotossistema II (*yield*), da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), do *quenching* fotoquímico (qP), do *quenching* não fotoquímico (qN) e do coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) de *Plinia cauliflora* entre plantas do tratamento controle (0 mg L<sup>-1</sup>) e da chuva fluoretada (10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup>) vinte e quatro horas após o término do experimento

| Tratamento                             | Variáveis analisadas |        |        |        |        |
|--|----------------------|--------|--------|--------|--------|
|  | <i>yield</i>         | ETR    | qP     | qN     | NPQ    |
| <b>Controle - 0 mg L<sup>-1</sup></b>  | 0,021                | 34,80  | 0,114  | 0,860  | 1,186  |
| <b>Fluoreto - 10 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,021                | 34,50  | 0,126  | 0,852  | 1,138  |
| <b>Fluoreto - 15 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,019                | 30,26  | 0,090  | 0,837  | 1,176  |
| <b>Fluoreto - 20 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,024                | 39,72  | 0,104  | 0,827  | 1,169  |
| <b>F<sub>calc</sub></b>                | 1,652                | 1,654  | 1,071  | 0,512  | 0,083  |
| <b>p-valor</b>                         | 0,2171               | 0,2167 | 0,3891 | 0,6797 | 0,9686 |
| <b>C.V.</b>                            | 19,28                | 19,32  | 31,00  | 5,49   | 14,03  |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

Antes do início das simulações (dia 1), foi verificado que todas as mudas de *C. vernalis* utilizadas na realização do experimento com simulação de chuva ácida não apresentaram diferença significativa em nenhuma das características de fluorescência da clorofila *a*, no claro (Tabela 9), demonstrando que as mudas de *C. vernalis*, do tratamento controle (pH = 6,0) e do tratamento com chuva ácida (pH=3,0) estavam sob as mesmas condições iniciais.

Tabela9 Produtividade quântica do fotossistema II (*yield*), da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), do *quenching* fotoquímico (qP), do *quenching* não fotoquímico (qN) e do coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) de *Cupania vernalis* entre plantas do tratamento controle (pH = 6,0) e da chuva ácida (pH = 3,0) antes do início do experimento

| Tratamento                 | Variáveis analisadas |        |        |        |        |
|----------------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|
|                            | <i>yield</i>         | ETR    | qP     | qN     | NPQ    |
| <b>Controle (pH = 6,0)</b> | 0,032                | 52,76  | 0,074  | 0,722  | 1,040  |
| <b>Ácido (pH = 3,0)</b>    | 0,030                | 54,08  | 0,077  | 0,727  | 1,097  |
| <b>F<sub>calc</sub></b>    | 0,293                | 0,023  | 0,092  | 0,012  | 0,152  |
| <b>p-valor</b>             | 0,6028               | 0,8841 | 0,7683 | 0,9144 | 0,7066 |
| <b>C.V.</b>                | 26,36                | 25,97  | 20,81  | 9,84   | 21,54  |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

Vinte e quatro horas após o término das simulações (dia 11) foi possível verificar que a chuva ácida não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) nenhuma das características de fluorescência da clorofila *a*, no claro (Tabela 10) em *C.vernalis*.

Tabela10 Produtividade quântica do fotossistema II (*yield*), da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), do *quenching* fotoquímico (qP), do *quenching* não-fotoquímico (qN) e do coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) de *Cupania vernalis* entre plantas do tratamento controle (pH = 6,0) e da chuva ácida (pH = 3,0) vinte e quatro horas após o término do experimento

| Tratamento                 | Variáveis analisadas |        |        |        |        |
|----------------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|
|                            | <i>yield</i>         | ETR    | qP     | qN     | NPQ    |
| <b>Controle (pH = 6,0)</b> | 0,030                | 44,84  | 0,059  | 0,542  | 0,615  |
| <b>Ácido (pH = 3,0)</b>    | 0,025                | 41,00  | 0,045  | 0,437  | 0,475  |
| <b>F<sub>calc</sub></b>    | 1,512                | 1,512  | 3,815  | 2,667  | 1,899  |
| <b>p-valor</b>             | 0,2538               | 0,2538 | 0,0866 | 0,1411 | 0,2055 |
| <b>C.V.</b>                | 22,36                | 22,44  | 22,51  | 21,15  | 29,44  |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

Em relação à fluorescência da clorofila *a*, no escuro, ao término do experimento com *C. vernalis*, a análise de regressão entre os dias do experimento e o Fv/Fm demonstrou que para o controle (pH = 6,0), o rendimento quântico potencial do FSII não diferiu entre os dias ( $p = 0,4864$ ); já no tratamento com chuva ácida (pH = 3,0), ocorreu um decréscimo significativo de 14,1 % na razão Fv/Fm ( $p = 0,0007$ ), demonstrando que a chuva ácida afeta o rendimento quântico potencial do FS II nessa espécie (Figura 15).

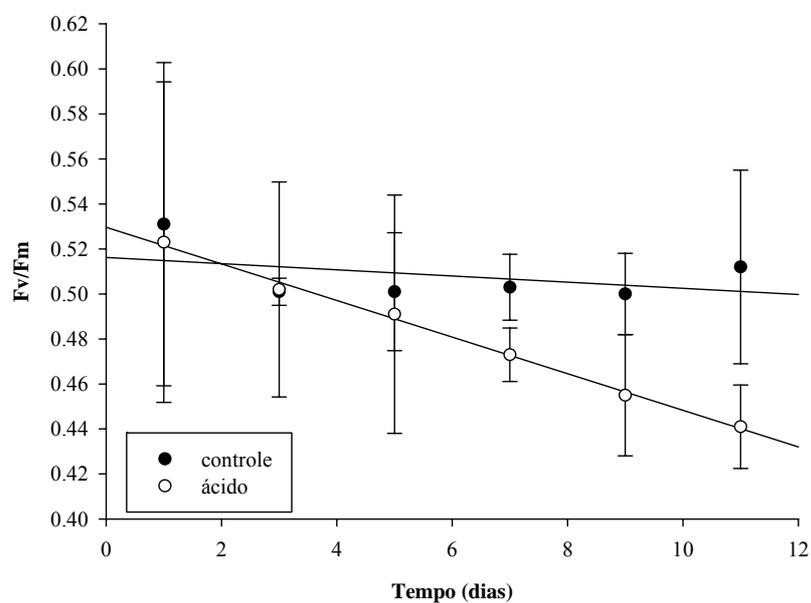


Figura 15 Rendimento quântico potencial do PSII (Fv/Fm) em indivíduos de *Cupania vernalis*, em relação aos dias do experimento. Tratamento controle ( $p = 0,4864$  e  $y = 0,5161 - 0,0014x$ ); Chuva ácida ( $p = 0,0007$  e  $y = 0,5299 - 0,0082x$ ). As barras verticais indicam o desvio padrão da média ( $n=5$ )

Para determinar a partir de qual dia de simulação de chuva a razão Fv/Fm diferiu entre o controle e o tratamento foi realizado uma ANAVA, que demonstrou que a partir do sexto dia de simulação eles apresentaram diferença significativa (Tabela 11).

Tabela 11 Rendimento quântico potencial do PSII de *Cupania vernalis* entre plantas do tratamento controle (pH = 6,0) e da chuva ácida (pH = 3,0) por dia de experimento

| Tratamento                 | Dias de experimento |        |        |        |        |        |
|----------------------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                            | 1                   | 3      | 5      | 7      | 9      | 11     |
| <b>Controle (pH = 6,0)</b> | 0,531               | 0,501  | 0,500  | 0,503  | 0,500  | 0,512  |
| <b>Ácido (pH = 3,0)</b>    | 0,524               | 0,502  | 0,490  | 0,473  | 0,455  | 0,449  |
| <b>F<sub>calc</sub></b>    | 0,028               | 0,001  | 0,137  | 12,344 | 9,736  | 6,974  |
| <b>p-valor</b>             | 0,8707              | 0,9713 | 0,7204 | 0,0079 | 0,0142 | 0,0297 |
| <b>C.V.</b>                | 13,56               | 6,79   | 8,43   | 2,73   | 4,80   | 7,90   |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

Antes do início das simulações (dia 1), foi verificado que todas as mudas de *C. vernalis* utilizadas na realização do experimento com simulação de chuva fluoretada não apresentaram diferença significativa em nenhuma das características de fluorescência da clorofila *a*, no claro (Tabela 12), demonstrando que as mudas de *C. vernalis*, do tratamento controle (0 mg L<sup>-1</sup>) e do tratamento com chuva fluoretada (10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup> de KF) estavam sob as mesmas condições iniciais.

Tabela 12 Produtividade quântica do fotossistema II (*yield*), da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), do *quenching* fotoquímico (qP), do *quenching* não fotoquímico (qN) e do coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) de *Cupania vernalis* entre plantas do tratamento controle (0 mg L<sup>-1</sup>) e da chuva fluoretada (10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup>) antes do início do experimento

| Tratamento                             | Variáveis analisadas |        |        |        |        |
|--|----------------------|--------|--------|--------|--------|
|  | <i>yield</i>         | ETR    | qP     | qN     | NPQ    |
| <b>Controle - 0 mg L<sup>-1</sup></b>  | 0,032                | 52,76  | 0,074  | 0,722  | 1,040  |
| <b>Fluoreto - 10 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,031                | 49,82  | 0,073  | 0,712  | 1,096  |
| <b>Fluoreto - 15 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,030                | 50,82  | 0,071  | 0,723  | 1,143  |
| <b>Fluoreto - 20 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,032                | 52,10  | 0,075  | 0,715  | 1,095  |
| <b>F<sub>calc</sub></b>                | 0,153                | 0,076  | 0,060  | 0,033  | 0,168  |
| <b>p-valor</b>                         | 0,9263               | 0,9721 | 0,9802 | 0,9919 | 0,9162 |
| <b>C.V.</b>                            | 20,78                | 20,70  | 19,82  | 9,47   | 21,03  |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

Vinte e quatro horas após o término das simulações (dia 11) em *C. vernalis* foi possível verificar que a chuva fluoretada não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) a produtividade do fotossistema II (*yield*), a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), o *quenching* fotoquímico (qP), e nem o *quenching* não fotoquímico (qN) (Tabela 11). Entretanto, houve efeito significativo das maiores concentrações de KF (15 e 20 mg L<sup>-1</sup>) sobre o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) (Tabela 13).

Tabela 13 Produtividade quântica do fotossistema II (*yield*), da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), do *quenching* fotoquímico (qP), do *quenching* não fotoquímico (qN) e do coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) de *Cupania vernalis* entre plantas do tratamento controle (0 mg L<sup>-1</sup>) e da chuva fluoretada (10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup>) vinte e quatro horas após o término do experimento

| Tratamento                             | Variáveis analisadas |         |         |         |         |
|--|----------------------|---------|---------|---------|---------|
|  | <i>yield</i>         | ETR     | qP      | qN      | NPQ     |
| <b>Controle - 0 mg L<sup>-1</sup></b>  | 0,030 a              | 48,84 a | 0,059 a | 0,542 a | 0,615 b |
| <b>Fluoreto - 10 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,029 a              | 46,54 a | 0,052 a | 0,542 a | 0,671 b |
| <b>Fluoreto - 15 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,027 a              | 43,60 a | 0,057 a | 0,651 a | 0,866 a |
| <b>Fluoreto - 20 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,021 a              | 34,16 a | 0,041 a | 0,567 a | 0,847 a |
| <b>F<sub>calc</sub></b>                | 2,525                | 2,519   | 3,018   | 2,627   | 0,4791  |
| <b>p-valor</b>                         | 0,0944               | 0,0949  | 0,0605  | 0,0859  | 0,0144  |
| <b>C.V.</b>                            | 20,93                | 21,00   | 19,75   | 12,39   | 17,10   |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

\*Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Ao término do experimento com *C. vernalis* a análise de regressão entre os dias do experimento e o Fv/Fm demonstrou que para o controle (0 mg L<sup>-1</sup>), o rendimento quântico potencial do FSII não diferiu entre os dias ( $p = 0,4864$ ); já nos tratamentos com chuva fluoretada (10 mg L<sup>-1</sup>,  $p = 0,0014$ ), (15 mg L<sup>-1</sup>,  $p = 0,00007$ ) e (20 mg L<sup>-1</sup>,  $p = 0,0003$ ), ocorreu um decréscimo significativo de 16,9; 22,5 e 27,6 % respectivamente na razão Fv/Fm, demonstrando que a chuva fluoretada afeta o rendimento quântico potencial do FS II nessa espécie (Figura 16).

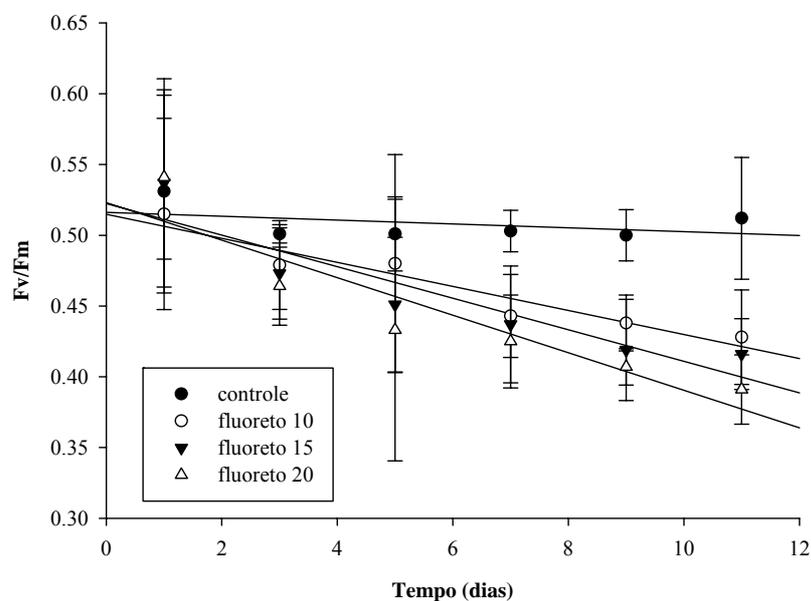


Figura 16 Rendimento quântico potencial do PSII ( $F_v/F_m$ ) em indivíduos de *Cupania vernalis*, expostas à chuva fluoretada (KF) durante dez dias consecutivos, em relação aos dias do experimento. ● controle ( $p = 0,4864$  e  $y = 0,5161 - 0,0014x$ ); ○ fluoreto 10 ( $p = 0,0014$  e  $y = 0,5154 - 0,0086x$ ); ▼ fluoreto 15 ( $p = 0,00007$  e  $y = 0,5227 - 0,0112x$ ); △ fluoreto 20 ( $p = 0,00003$  e  $y = 0,523 - 0,0133x$ ). As barras verticais indicam o desvio padrão da média ( $n=5$ )

Para determinar a partir de qual dia de simulação de chuva a razão  $F_v/F_m$  diferiu entre o controle e os tratamentos com fluoreto de potássio foi realizado uma ANOVA, que demonstrou que a partir do sexto dia de simulação eles apresentaram diferença significativa (Tabela 14).

Tabela 14 Rendimento quântico potencial do PSII de *Cupania vernalis* entre plantas do tratamento controle (0 mg L<sup>-1</sup>), e plantas dos tratamentos com chuva fluoretada (10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup>) por dia de experimento

| Tratamento                             | Dias de experimento |         |         |         |         |         |
|--|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|  | 1                   | 3       | 5       | 7       | 9       | 11      |
| <b>Controle - 0 mg L<sup>-1</sup></b>  | 0,531 a             | 0,501 a | 0,500 a | 0,503 a | 0,500 a | 0,512 a |
| <b>Fluoreto - 10 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,515 a             | 0,479 a | 0,480 a | 0,443 b | 0,438 b | 0,428 b |
| <b>Fluoreto - 15 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,537 a             | 0,473 a | 0,451 a | 0,437 b | 0,419 b | 0,416 b |
| <b>Fluoreto - 20 mg L<sup>-1</sup></b> | 0,540 a             | 0,464 a | 0,433 a | 0,425 b | 0,407 b | 0,391 b |
| <b>F<sub>calc</sub></b>                | 0,135               | 1,787   | 1,025   | 6,264   | 15,840  | 13,245  |
| <b>p-valor</b>                         | 0,9380              | 0,1901  | 0,4078  | 0,0051  | 0,0000  | 0,0001  |
| <b>C.V.</b>                            | 12,81               | 5,54    | 14,15   | 6,87    | 5,27    | 7,41    |

Nota: Valores do F<sub>calc</sub> (F calculado), p-valor e C.V. (coeficiente de variação) obtidos a partir da análise de variância

\*Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

#### 4.4 Análise do teor de flúor na massa seca das espécies estudadas

A análise de variância do teor de flúor na massa seca mostrou que todas as concentrações de fluoreto de potássio (10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup>) foram responsáveis por acumulações significativas do poluente ( $F = 75,774$ ;  $p = 0,0000$ ), sendo que todos os tratamentos diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O teor de flúor na massa seca de *P. cauliflora* aumentou com o aumento da concentração inicial de fluoreto na solução (Figura 17).

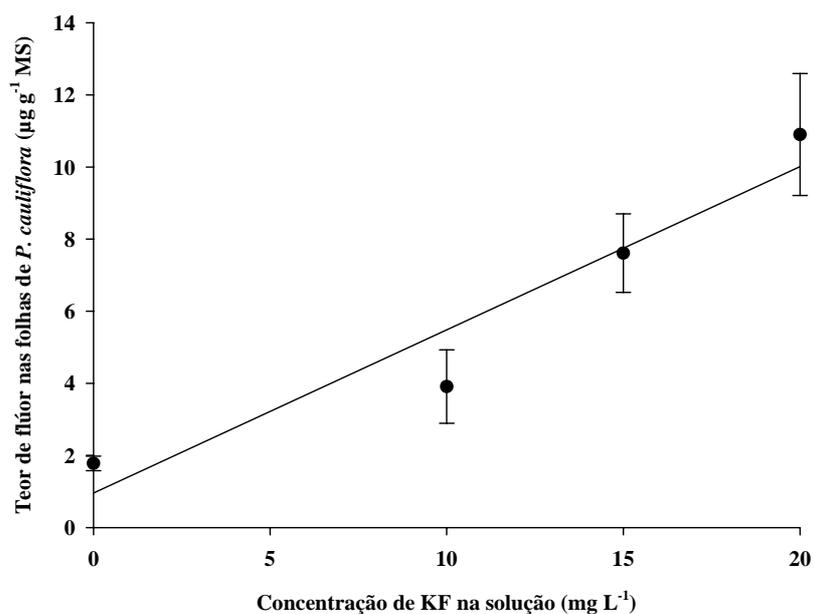


Figura17 Teor de flúor (µg g<sup>-1</sup>MS) nas folhas de *Plinia cauliflora* em função de diferentes concentrações de fluoreto de potássio (0, 10, 15 e 20mg L<sup>-1</sup>) em chuva simulada, durante dez dias consecutivos ( $R^2 = 0,8485$ ;  $p = 0,0000$ ;  $y = 0,9605 + 0,4526x$ ). As barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=6)

A análise de variância do teor de flúor na massa seca de *Cupania vernalis* mostrou que todas as concentrações de fluoreto de potássio (10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup>) foram responsáveis por acúmulos significativos do poluente ( $F = 47,696$ ;  $p = 0,0000$ ), sendo que todos os tratamentos diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O teor de flúor na massa seca de *C. vernalis* aumentou com o aumento da concentração inicial de fluoreto na solução (Figura 18).

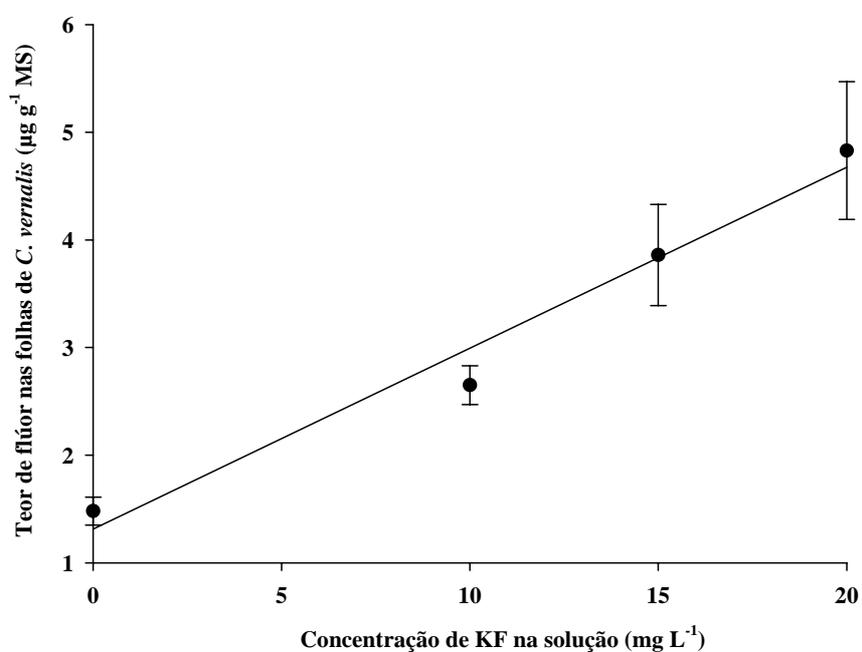


Figura18 Teor de flúor (µg g<sup>-1</sup>MS) nas folhas de *Cupania vernalis* em função de diferentes concentrações de fluoreto de potássio (0, 10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup>) em chuva simulada, durante dez dias consecutivos ( $R^2 = 0,8931$ ;  $p = 0,0000$ ;  $y = 1,3108 + 0,1683x$ ). As barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=6)

## 5 DISCUSSÃO

Os poluentes atmosféricos afetam a vegetação sendo a folha o órgão mais sensível ao dano, por isso este tem sido alvo de muitos estudos (KLUMPP et al., 2001; SINGH; AGRAWAL, 2008).

### 5.1 Efeitos da simulação de chuva ácida sobre as características morfológicas e ultraestruturais das espécies estudadas

As plantas expostas à deposição ácida apresentam alterações tanto morfoanatômicas, ultraestruturais, fisiológicas e bioquímicas (CHOI et al., 2006; EVANS, 1984; SINGH; AGRAWAL, 2008).

Um dos sintomas externos mais observados em estudos que submetem plantas à exposição de chuvas com baixo pH é o surgimento de clorose e manchas necróticas (EVANS, 1982; SILVA et al., 2005).

*Plinia cauliflora* apresentou poucas folhas com clorose e manchas necróticas, porém o mesmo não foi observado em *C. vernalis*.

A intensidade dos danos causados pela chuva ácida em uma planta depende da espécie considerada e de suas características específicas como seu estágio de desenvolvimento, condições fisiológicas da planta, área foliar e taxa de absorção da chuva por unidade de área (COWLING; LINTHURST, 1981). Silva et al. (2005) estudando cinco espécies arbóreas brasileiras verificaram diferentes graus de sensibilidade das plantas à chuva ácida tanto em relação a danos foliares como às alterações anatômicas. Nas espécies estudadas não foram observadas alterações anatômicas. Algumas plantas não apresentam sintomas visuais quando expostas à poluentes atmosféricos, em outras só são detectadas

alterações ultraestruturais, fisiológicas e/ou bioquímicas (GOSTIN, 2009; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006b).

Em ambas as espécies estudadas foi observado que a chuva ácida afetou principalmente as células epidérmicas causando erosão da cera epicuticular na face adaxial foliar, por estar diretamente exposta ao poluente. O que pode resultar na alteração da permeabilidade da folha (EVANS, 1984). Segundo Shepherd e Griffiths (2006) quanto maior a acidez de uma chuva maiores são os danos que essa causa na morfologia e deposição da cera, entre esses danos incluem erosão da cera, redução de sua espessura e consistência.

As ceras são compostos hidrofóbicos que formam a cutícula juntamente com a cutina e suberina. A cutícula dificulta a perda de água pela planta, sendo uma defesa contra certas condições ambientais adversas, inclusive, essa camada impede a entrada de fungos e bactérias no interior dos tecidos das plantas (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Ao apresentarem danos nesse revestimento, as espécies estudadas ficaram suscetíveis à colonização por fungos. O mesmo foi observado por outros autores estudando outras espécies (PERCY; BAKER, 1987; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006b). O favorecimento do ataque de patógenos e herbívoros devido à erosão da cutícula da superfície das folhas é considerado um efeito indireto da exposição das plantas à chuva ácida (LIKENS; BORMANN, 1974).

A cutícula também apresenta importante função na reflexão da radiação incidente em plantas de clima tropical e a remoção da mesma deixa a superfície foliar mais exposta à luminosidade e ao superaquecimento (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). O excesso da luz é um dos fatores responsáveis pelo surgimento de cloroses e posteriormente de necroses em plantas. Foi observada maior remoção de cera epicuticular em *P. cauliflora* podendo esse ser o motivo dessa espécie ter apresentado danos externos.

Diversos outros danos causados pela chuva ácida na anatomia e ultraestrutura de plantas que não foram observados nas espécies estudadas são relatados na literatura.

Colapso das células da epiderme e mesofilo foram relatados para as espécies arbóreas *Genipa americana* (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006a), *Spondias dulcis* e *Gallesia integrifolia* (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006b). Danos nas células estomáticas também foram observados por Silva et al. (2005) na espécie *Eugenia uniflora* como a deformação dos estômatos e presença de ostíolos abertos, essa espécie se mostrou altamente sensível à exposição de chuva com pH 3, pois foi verificado colapso em todos os tecidos foliares.

## **5.2 Efeitos da simulação de chuva fluoretada sobre as características morfológicas e ultraestruturais das espécies estudadas**

A maioria dos estudos relacionados aos efeitos do fluoreto sobre organismos vegetais se concentra nas alterações provocadas nas folhas, devido a esse órgão constituir a principal via de entrada do poluente e onde o mesmo se acumula (DOMINGOS et al., 2003; PITA-BARBOSA et al., 2009).

Nas espécies estudadas apenas *C. vernalis* apresentou danos morfológicos externos sendo observada cloroses em todos os tratamentos, exceto o controle. O surgimento de áreas sem coloração nas folhas expostas ao flúor pode ser devido ao fato desse elemento ser eletronegativo e que ao penetrar no interior da célula vegetal forma complexos com o  $Mg^{2+}$  reduzindo a biossíntese de clorofila (FORNASIERO, 2001).

Além de cloroses, as necroses marginais e apicais, o murchamento e encarquilhamento das folhas são as injúrias mais comumente relatadas pela literatura em trabalhos com plantas expostas ao fluoreto (CHAVES et al., 2002; FORNASIERO, 2001; FORNASIERO, 2003; MILLER, 1993; SILVA et al.,

2000). Mas, apesar do fluoreto ser um dos mais fitotóxicos poluentes atmosféricos, podendo causar injúrias às plantas em concentrações de 10 a 1000 vezes menores que outros poluentes (WEINSTEN, 1977) muitas espécies não apresentam sintomas visuais quando submetidos a baixas concentrações desse elemento.

Algumas espécies apresentam alterações anatômicas, ultraestruturais e fisiológicas em decorrência da exposição ao fluoreto sem apresentarem danos visuais como é o caso das espécies *Plectranthus neochilus*, *Cymbopogon citratus* (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010) e *Lolium multiflorum* (MESQUITA et al., 2011). Por outro lado *Spondias dulcis* se mostra muito sensível à ação do poluente, apresentando necroses expressivas logo após 24h de aplicação da chuva à concentração de 5 mg L<sup>-1</sup> (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2012).

Sant'Anna-Santos et al. (2007) analisando a fitotoxidez do flúor em *Magnolia ovata* não visualizaram dano morfológico externo expressivo e nem observaram diferença significativa nas espessuras da epiderme e mesofilo, como verificado nas espécies em estudo, porém esses autores relataram alterações na forma das células epidérmicas.

A ausência de danos visuais não indica que a planta é resistente ao flúor, sendo assim, o uso apenas da sintomatologia visual para avaliar a fitotoxidade do fluoreto é inadequado, sendo necessárias outras técnicas como análises ultraestruturais e fisiológicas (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2012).

Um dos danos ultraestruturais mais relatados na literatura em folhas expostas ao fluoreto são a erosão e descamação da cera epicuticular causando desestruturação da cutícula e essas alterações podem ser visualizadas mesmo em folhas sem danos externos (CAMPOS; AZEVEDO; SANT'ANNA-SANTOS, 2010; CHAVES et al., 2002; MESQUITA et al., 2011; PITA-BARBOSA et al., 2009; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007).

Segundo Sant'Anna-Santos e Azevedo (2010), a maior densidade da camada de cera epicuticular confere maior resistência à planta contra a fitotoxidez do fluoreto, ou seja, uma planta com menor espessura dessa camada está mais suscetível à ação desse poluente.

A desestruturação da cutícula pode estar relacionada à possível ação do flúor nessa camada, facilitando a entrada do poluente na epiderme e permitindo maior colonização de patógenos como fungos na superfície da folha (HEREDIA et al., 1998). A alteração da cutícula, devido à remoção da cera epicuticular, leva a aumento da umidade da folha, condição essa favorável à proliferação de fungos (BARTHLOTT, 1981).

Em ambas as faces da epiderme das espécies estudadas foram observadas a colonização por hifas fúngicas nas plantas expostas ao flúor, sendo que quanto maior a concentração do poluente maior essa colonização. Como a cutícula também tem função de proteção, quanto menor a espessura dessa camada de revestimento ou mais danificada essa se apresenta, mais suscetível à ação de patógenos uma planta se encontra.

### **5.3 Efeitos da simulação das chuvas, ácida ou fluoretada, sobre as características da fluorescência da clorofila *a* das espécies estudadas**

Uma planta quando exposta a um agente estressor, mesmo sem expor sintomas visuais pode apresentar alterações fisiológicas, pois os processos fisiológicos e bioquímicos de um vegetal são mais sensíveis e respondem mais rápido à ação do poluente (SHAN et al., 1995). Boese, Mavlean e El-Mogazi (1995) analisando o efeito do fluoreto na clorofila *a* em plantas de espinafre e Singh e Agrawal (2004) avaliando o efeito da simulação de chuva com pH 4 na taxa de assimilação líquida em cultivares de trigo observaram que essas plantas apresentaram alterações fisiológicas mesmo sem apresentarem sintomas visuais.

Na literatura, há relatos sobre as alterações fisiológicas em plantas causadas tanto pela exposição ao flúor quanto à chuva ácida são redução da taxa fotossintética, da fluorescência da clorofila *a* e do teor de pigmentos fotossintéticos (DIVAN JÚNIOR; OLIVA; FERREIRA, 2007; FLAGLER; LOCK; ELSIK, 1994; NEVES et al., 2009).

A análise da fluorescência da clorofila *a* constitui bom indicador do estado do fotossistema II e de sua operação (LÜTTGE, 2008), pois agentes estressores, como o flúor (SINGH-RAWAL; JAJOO; BHARTI, 2010) e a chuva ácida (LIU et al., 2007) podem influenciar no estado funcional das membranas do tilacoide (BAKER; ROSENQVST, 2004).

No presente trabalho os únicos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* que apresentaram alterações foram o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) para os tratamentos de maior concentração de flúor em *C. vernalis* e o rendimento quântico potencial do PSII (Fv/Fm) para todos os tratamentos com chuva ácida e flúor em *C. vernalis*.

O NPQ e o QN são considerados mecanismos de proteção da planta que tem a função de dissipar a energia excessiva não utilizada nas reações fotoquímicas. O aumento no NPQ em plantas estressadas tem por objetivo evitar danos causados pela maior incidência de luz no tecido do vegetal e está relacionado com o ciclo de xantofila e com o desenvolvimento de tilacoides (RIBEIRO, 2009; SILVA et al., 2011).

Estudos mostram que a possível causa do aumento do NPQ está relacionada com o aumento no teor de carotenoides e da habilidade de conversão de violaxantina para zeaxantina conferindo assim à planta maior resistência contra o superaquecimento (LIU et al., 2007). Os carotenoides atuam reduzindo o estado excitado da clorofila e dissipando a energia na forma de calor, por meio do NPQ mediante o ciclo das xantofilas (RIBEIRO, 2008).

Todos os tratamentos comparados ao controle apresentaram redução na razão  $F_v/F_m$ . Essa razão que indica a máxima eficiência em que a luz absorvida pelo PSII é convertida em energia química (BAKER; HARBINSON; KRAMER, 2007). Esse parâmetro é importante e mede imediatamente o estado fisiológico do aparato fotossintético em folhas de plantas saudáveis. Estresse ambiental que afeta a eficiência do PSII leva ao decréscimo em  $F_v/F_m$ , portanto, essa medida se tornou uma maneira rápida e fácil de monitorar a ação de agentes estressores sobre as plantas (BAKER, 2008; KRAUSE; WEIS, 1991).

As razões que levam o estresse a reduzir os valores de  $F_v/F_m$  são complexos. Tecidos fotossintéticos estressados na luz podem resultar no aumento do  $q_N$  e NPQ que muitas vezes é acompanhada pela fotoinibição dos centros de reação do PSII reduzindo assim a razão  $F_v/F_m$ . No entanto, a identificação das causas intrínsecas de tais alterações pode ser difícil. É comum em trabalhos de ecofisiologia relacionar a diminuição do  $F_v/F_m$  com o comprometimento da eficiência fotossintética das folhas em condições de luz, porém esse nem sempre é o caso, pois o rendimento quântico do PSII nas condições de claro podem ser consideravelmente menores que o valor de  $F_v/F_m$  observado que avalia o rendimento quântico máximo do PSII, e não o rendimento em que o PSII funciona em condições de claro (BAKER, 2008).

Liu et al. (2007) verificaram que a chuva ácida reduziu significativamente o valor de  $F_v/F_m$  nas espécies *Schima superba* e *Pinus massoniana*, e em se tratando do flúor, Ribeiro (2008) verificou a mesma alteração nas espécies de *Eremanthus erythropappus*, *Tibouchina granulosa* e *Schinus terebinthifolius*, porém o mesmo não foi observado por Boese, Mavlean e El-Mogazi (1995) em *Spinacea oleracea*.

Essa redução do  $F_v/F_m$  sugere que alguns mecanismos importantes de proteção ou reguladores para evitar o fotodano ao aparato fotossintético sob excesso de luz foi ativado em detrimento da eficiência dos centros de reações na

utilização dos fótons capturados nas reações fotoquímicas primárias no PSII (KRAUSE; WEIS, 1991).

Como foi observado, grande parte dos danos causados pelo flúor e pela chuva ácida nas características da fluorescência da clorofila *a* estão relacionados com a maior intensidade luminosa na planta. A destruição da cutícula foliar observada no presente trabalho levou a uma diminuição da refletância e ao aumento da incidência da luminosa sobre as folhas de *C. vernalis*, que pode ter ativado o ciclo das xantofilas como forma de proteger o maquinário fotossintético da fotoinibição. Em condições de alta luminosidade o ciclo é ativado, os prótons da zeaxantina se ligam às proteínas da antena de captação de luz causando mudanças na conformação, levando à dissipação de calor (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1992).

A ausência de variação significativa nos demais parâmetros da fluorescência da clorofila *a* de *C. vernalis* indica que o flúor não afetou a conversão da energia radiante em química nos centros de reação do PSII e o transporte de elétrons na cadeia fotossintética, fato também observado por Rossi (2012).

A resposta da fluorescência da clorofila *a* em relação à ação de um poluente é variada. Divan Júnior, Oliva e Ferreira (2007) avaliando as gramíneas *Chloris gayana* e *Panicum maximum*, e Sant'Anna-Santos (2008) avaliando folhas sadias de *Spondias dulcis* expostas ao flúor não encontraram nenhuma alteração nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* como observado em *P. cauliflorans* simulações de chuva ácida e de chuva fluoretada.

#### **5.4 Análise do teor de flúor na massa seca das espécies estudadas**

Para a planta ser utilizada como bioindicadora de determinado poluente, essa deve ter respostas inequívocas quando expostas a ele, como alteração em

seu crescimento, sintomatologia e sensibilidade ao poluente, avaliada por respostas morfoanatômicas, fisiológicas ou bioquímicas específicas facilmente mensuráveis (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005). Como visto, é difícil especificar os efeitos do flúor, uma vez que outros poluentes atmosféricos como a chuva ácida e metais pesados causam injúrias semelhantes às plantas. Uma forma de relacionar as injúrias na planta causadas pelo agente estressor testado e assim avaliar o potencial bioindicador, mais precisamente, seu potencial biomonitor, é analisar o teor do poluente no tecido vegetal comparando com o controle (WEINSTEIN; DAVISON, 2003). Além disso, diversos estudos de biomonitoramento da poluição atmosférica causada pelo flúor têm sido feitos utilizando o teor desse poluente encontrado no tecido das plantas (DIVAN JÚNIOR; OLIVA; FERREIRA, 2008; RODRIGUEZ et al., 2012)

O fluoreto, seja gasoso ou aquoso, atinge os espaços intercelulares através da cutícula e pode ser absorvido pelas células do mesofilo alcançando o simplasto, ou ser arrastado pela corrente transpiratória, via apoplasto, até as extremidades do xilema, onde é acumulado (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005). Plantas com cutícula pouco espessa e com baixa concentração de cera, como plântulas ou plantas adultas com danos a esse revestimento pelo próprio flúor são mais suscetíveis à entrada do poluente em todo o apoplasto da folha (KANNAN, 1986). Outra forma de entrada do flúor gasoso no interior do tecido vegetal é via estômatos como a maioria dos poluentes atmosféricos (PEIXOTO; PIMENTA; ANTUNES, 2005). O fato de se avaliar o teor de flúor apenas nas folhas é devido esse elemento ser disperso via aérea e depositar diretamente nas folhas, pois o solo normalmente não é fonte de níveis tóxicos do flúor e a possibilidade de absorção do ânion pelas raízes parece menor em virtude da baixa retenção desse elemento pelo substrato (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005).

Ambas as espécies estudadas concentraram flúor em seus tecidos, sendo que *P. cauliflora* concentrou teores superiores comparados à *C. vernalis*

( $F_{\text{calc}}=83,800$ ; p-valor =0,0000), mesmo essa não apresentando sintomatologia visível. A quantidade de flúor acumulada nos tecidos e o grau de injúria provocado por esse poluente variam com a espécie e com o estágio de desenvolvimento da planta (SILVA et al., 2000).

Não há relação clara de dose-efeito em se tratando do flúor e plantas como verificado para outros poluentes como o Cd (WOLFF et al., 2012). Silva et al. (2000) estudando cinco espécies arbóreas verificaram que em três, *Spondias dulcis*, *Gallesia gorazima* e *Genipa americana*, houve uma relação positiva entre flúor acumulado e o grau de injúria, porém essa relação não foi verificada em *Peltophorum dubuim* e *Joannesia princeps*.

Sant'Anna-Santos et al. (2007) estudando o efeito fitotóxico do flúor em *Magnolia ovata* verificaram que apesar dessa espécie acumular o ânion em seus tecidos não apresentaram sintomas visuais. O mesmo foi observado por Rossi (2012) ao expor *Vitex polygama* durante dez dias a concentrações de até 20 mgF.L<sup>-1</sup>. De acordo com Treshow e Anderson (1989) para uma planta apresentar injúrias ao ser exposta ao flúor, essa deve acumular teores superiores a 30 µgF.g<sup>-1</sup> de MSeu seus tecidos.

Porém, diversos outros estudos mostram que mesmo acumulando teores bem baixos a planta pode apresentar danos. Como é o caso da espécie arbórea *S. dulcis* que ao ser exposta durante quatro dias a chuva de 20 mgF.L<sup>-1</sup> acumulou teores de apenas 2,5 µgF.gMS<sup>-1</sup> em suas folhas mas desenvolveram cloroses e necroses, além de vários danos ultraestruturais (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2012). Outros casos semelhantes são as gramíneas *Panicum maximum*, *P. notatum* (OLIVA; FIGUEIREDO, 2005), *Brachiaria brizantha* e *B. decumbens* (PITA-BARBOSA et al., 2009).

A ocorrência de injúrias visuais não está ligada a um limite de concentração de flúor, mas sim à resposta específica de cada organismo vegetal ao poluente (ROSSI, 2012). Segundo Coulter, Pack e Sulzbach (1985), o flúor se

acumula nos tecidos na forma solúvel e inorgânica, causando lesões quando concentrações letais são atingidas sendo, portanto, um poluente cuja injúria tem natureza cumulativa e dependente de cada espécie.

Outros sintomas relacionados ao acúmulo de flúor por plantas descritos na literatura são redução na germinação, no comprimento das raízes e dos caules (CHAKRABARTI et al., 2012), queda da produtividade e do vigor da planta (DATTA et al., 2012).

A maior parte dos trabalhos realizados com flúor visando avaliar o acúmulo desse elemento em plantas foi feito em espécies agrícolas como-de-bico (CHAKRABARTI et al., 2012), trigo (JOSHI; BHARDWAJ, 2012) e frutíferas (JHA et al., 2013) devido ao risco à saúde humana que existe ao ingerir grandes quantidades desse elemento.

## 6 CONCLUSÃO

As espécies *P. cauliflora* e *C. vernalis* apresentaram potencial para serem utilizadas como biosensores da presença de chuvas, ácida e fluoretada, sendo que, a erosão e o acúmulo de ceras epicuticulares na epiderme dessas espécies e a razão  $F_v/F_m$  em *C. vernalis* podem ter importante valor prognóstico na detecção de danos causados por esse tipo de poluição nessas espécies.

As espécies *P. cauliflora* e *C. vernalis* apresentam potencial para serem utilizadas como indicadores ecológicos (bioacumuladoras) da presença de flúor na atmosfera, sendo a espécie *P. cauliflora* promissora para ser utilizada em áreas impactadas por esse tipo de poluição.

## REFERÊNCIAS

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2009. 43 p. Apostila.

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

BAIRD, C. A. A química e a poluição do ar na atmosfera. In: \_\_\_\_\_. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 3, p. 107-193.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89–113, 2008.

BAKER, N. R.; HARBINSON, J.; KRAMER, D.M. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, p. 1107–1125, 2007.

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

BARTHLOTT, W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v. 1, p. 345–355, 1981.

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

CALLISTO, M.; GONÇALVES, J. F. A vida nas águas das montanhas. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 182, p. 68-71, 2002.

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

CARNEIRO, R. M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Estudos sobre bioindicadores vegetais e poluição atmosférica por meio de revisão sistemática da literatura. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, São Paulo, n. 13, p. 26-44, 2009.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CHAKRABARTI, S. et al. Effect of sodium fluoride on germination, seedling growth, and biochemistry of bengal gram (*Cicer arieninum*). **Fluoride**, Detroit, v. 45, n. 3, p. 257-262, 2012.

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

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

COULTER, C. T.; PACK, M. R.; SULZBACH, C. W. An evaluation of the dose-response relationship of fluoride injury to *Gladiolus*. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1001-1007, 1985.

COWLING, E. B.; LINTHURST, R. A. The acid precipitation phenomenon and its ecological consequences. **BioScience**, Washington, v. 31, p. 649-53, 1981.

DALE, V. H.; BEYELER, S. C. Challenges in the development and use of ecological indicators. **Ecological Indicators**, New York, v. 1, p. 3–10, 2001.

DATTA, J. K. et al. Studies on the impact of fluoride toxicity on germination and seedling growth of gram seed (*Cicer arietinum* L. cv. Anuradha). **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, Irkutsk, v. 8, n. 1, p. 194-202, 2012.

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

DENG, S. et al. Modeled dosage–response relationship on the net photosynthetic rate for the sensitivity to acid rain of 21 plant species. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 89, n. 2, p. 251-256, 2012.

DENISON, R. et al. The effects of acid rain on nitrogen fixation in Western Washington coniferous forests. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 21-34, 1977.

DIVAN JÚNIOR, A. M.; OLIVA, M. A.; FERREIRA, F. A. Dispersal pattern of airborne emissions from an aluminium smelter in Ouro Preto, Brazil, as expressed by foliar fluoride accumulation in eight plant species. **Ecological Indicators**, New York, v. 8, p. 454-461, 2008.

DIVAN JÚNIOR, A. M.; OLIVA, M. A.; FERREIRA, F. A. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colônia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 67, n. 2, p. 247-253, 2007.

DOBBS, C. G. Fluoride and the environment. **Fluoride**, Detroit, v. 7, p. 123-135, 1974.

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

EVANS, L. S. Biological effects of acidity in precipitation on vegetation: a review. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 22, n. 2, p. 155-169, Apr. 1982.

EVANS, L. S. Botanical aspects of acidic precipitation. **Botanical Review**, Bronx, v. 50, p. 449-90, 1984.

EVANS, L. S.; GMUR, N. F.; COSTA, F. Leaf surface and histological perturbations of leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus* after exposure to simulated acid rain. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 64, p. 903-913, 1977.

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

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

FLAGLER, R. B.; LOCK, J. E.; ELSIK, C. G. Leaf-level and whole-plant gas-exchange characteristics of shortleaf pine exposed to ozone and simulated acid-rain. **Tree Physiology**, Oxford, v. 14, p. 361-374, 1994.

FORNARO, A. Águas de chuva: conceitos e breve histórico. Há chuva ácida no Brasil? **Revista USP**, São Paulo, n. 70, p. 78-87, 2006.

FORNASIERO, R. B. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 3, p. 507-513, 2003.

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

FRANCIS, A. J. Effects of acidic precipitation acidity on soil microbial processes. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 18, p. 375-394, 1982.

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

GEORGSSON, G.; PÉTURSSON, G. Fluorosis of sheep caused by the Hekla eruption in 1970. **Fluoride**, Detroit, v. 5, n. 2, p. 58-66, 1972.

GOSTIN, I. N. Air pollution effects on the leaf structure of some Fabaceae species. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Cluj-Napoca, v. 37, n. 2, p. 57-63, 2009.

GUO, Z.; LIAO, B. Mobility and speciation of Cd, Cu and Zn in two acidic soils affected by simulated acid rain. **The Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 17, n. 2, p. 332-334, 2005.

HARA, H. et al. Analysis of two-year results of acid precipitation survey within Japan. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 63, n. 9, p. 2691-2697, 1990.

HOLT, N. E. et al. Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. **Science**, New York, v.307, p. 433-436, 2005.

HEREDIA, A. et al. La cuticula vegetal: estructura y funciones. **Ecología**, Madrid, v. 12, p. 293-305, 1998.

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

JESUS, E. F. R. A importância do estudo das chuvas ácidas no contexto da abordagem climatológica. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 14, p. 143-153, 1996.

JHA, S. K. et al. Bio-concentration of fluoride in Lady's finger (*Abelmoschus esculentus*) grown in contaminated alkaline soil and evaluation of exposure risk in human. **Toxicological & Environmental Chemistry**, New York, v.95, n. 1, p. 138-149, 2013.

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

JOSHI, M.; BHARDWAJ, N. Effect of fluoride on growth parameters and its accumulation in *Triticum aestivum* var. Raj 3675. **Fluoride**, Detroit, v. 45, n. 3, p. 297-301, 2012.

JUDD, W. S.; SINGER, R. B.; SINGER, R. F. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.

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

KAMPA, M.; CASTANAS, E. Human health effects of air pollution. **Environmental Pollution**, Barking, v. 151, n. 2, p. 362-367, 2008.

KANNAN, S. Physiology of foliar uptake of inorganic nutrients. **Proceedings of the Indian Academy of Science**, Bangalore, v. 96, p. 457-470, 1986.

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

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

KLUMPP, A. et al. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede europeia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionit). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 511-518, 2001. Supl.

KOZLOWSKI, T.T. Impacts of air pollution on forest ecosystems. **BioScience**, Washington, v. 30, p. 89-93, 1980.

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

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

LIKENS, G. E.; BORMANN, F. H. Acid rain: a serious regional environmental problem. **Science**, New York, v. 184, p. 1176-1179, 1974.

LIMA JÚNIOR, E. C. et al. Aspectos fisiopatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 1, p. 33-41, 2006.

LIMA, W. P. As florestas e a poluição do ar. **IPEF Serie Técnica**, Piracicaba, v. 1, n. 1, p. 1-41, 1980. 41 p.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. v.1, 384 p.

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

MALAGI, G. et al. Enxertia interespecífica de jaboticabeira: influência do tipo de garfo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 221-224, 2012.

MCFEE, W. W.; KELLY, J. M.; BECK, R. H. Acid precipitation effects on soil pH and base saturation of exchange sites. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 7, n. 3, p. 401–408, 1977.

MENDELSSOHN, I. A.; MCKEE, K. L.; KONG, T. A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wetland plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 263–275, 2001.

MENON, M. et al. Effects of heavy metal soil pollution and acid rain on growth and water use efficiency of a young model forest ecosystem. **Plant and Soil**, The Hague, v. 297, p. 171-183, 2007.

MENZ, F.C.; SEIP, H.M. Acid rain in Europe and the United States: an update. **Environmental Science & Policy**, Exeter, v. 7, p. 253–265, 2004.

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

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

MOREIRA, R. Modelo industrial e meio ambiente no espaço brasileiro. **Geographia**, Niterói, v. 5, n. 9, p. 7-28, 2003.

MUDD, J. B.; KOZLOWSKI, T. T. **Responses of plants to air pollution**. New York: Academic, 1975. 386 p.

NEVES, N. R. et al. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: potential use in environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, p. 3740-3745, 2009.

NIEMI, G. J.; MCDONALD, M. E. Application of ecological indicators. **Annual Review Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 35, p. 89-111, 2004.

NORBY, R. J.; LUXMOORE, R. J. Growth analysis of soybean exposed to simulated acid rain: damage, growth and gas exchange. **New Phytologist**, Cambridge, v. 99, p. 389-405, 1983.

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

ODILARA, C. A. et al. A. Air pollution tolerance indices (APTI) of some plant species around Ilupeju industrial area, Lagos. **Journal of Engineering Science and Applications**, Abuja, v. 4, n. 2, p. 97-101, 2006.

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

OLIVEIRA, L. A. et al. Design of antiseptic formulations containing extract of *Plinia cauliflora*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 47, n. 3, 2011.

PASQUALINI, V. et al. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 239–248, 2003.

PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D. S.; ANTUNES, F. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 727-734, 2005.

PERCY, K. E.; BAKER, E. A. Effects of simulated acid rain on production, morphology and composition of epicuticular wax and on cuticular membrane development. **New Phytologist**, Cambridge, v. 107, n. 3, p. 577–589, 1987.

PERCY, K. E. The effects os simulated acid rain on germinative capacity, growth and morphology of forest tree seedlings. **New Phytologist**, Cambridge, v. 104, n. 3, p. 473-484, 1986.

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

PRADO FILHO, J. F. P. Uso de bioindicadores para monitoramento do ar. **Ambiente**, São Paulo, v. 7, p. 57-64, 1993.

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

RIBEIRO, R. V. Photosynthesis and water relations of well-watered orange plants as affected by winter and summer conditions. **Photosynthetica**, Prague, v. 47, n. 2, p. 215-222, 2009.

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

ROCHA, F. R. et al. Wet deposition and related atmospheric chemistry in the São Paulo metropolis, Brazil: major inorganic ions in rainwater as evaluated by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 37, p. 105-115, 2003. Part 1.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

RODRIGUEZ, J. H. et al. Fluoride biomonitoring around a large aluminium smelter using foliage from different tree species. **CLEAN – Soil, Air, Water**, Weinheim, v. 40, n. 12, p. 1315–1319, 2012.

ROSE, D.; MARIER, J. R. **Environmental Fluoride 1977**. Ottawa: National Research Council of Canada, 1977. 98 p.

ROSSI, Z. T. T. **Características ecofisiológicas, anatômicas e ultraestrutura de *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae) submetida à diferentes concentrações de flúor**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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

SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A. Toxicidade e acúmulo de flúor em hortaliças nas adjacências de uma fábrica de alumínio. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 24, n. 4, p. 952-963, 2010.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. et al. Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 689-702, 2012.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. et al. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 313-321, 2006a.

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

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

SASSO, S. S.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jaboticabeira por enxertia e alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 571-576, 2010.

SCHINDLER, D. W. Effects of acid rain of freshwater ecosystems. **Science**, New York, v. 239, p. 149-157, 1988.

SHAN, Y. et al. The individual and combined effects of ozone and simulated acid-rain on chlorophyll contents, carbon allocation and biomass accumulation of armand pine seedlings. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 85, p. 1399-1404, 1995.

SHEPHERD, T.; GRIFFITHS, D. W. The effects of stress on plant cuticular waxes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, p. 469-499, 2006.

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

SILVA, L. C. et al. Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 53, p. 789-796, 2005.

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

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

SINGH, B.; AGRAWAL, M. Impact of simulated acid rain on growth and yield of two cultivars of wheat. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 152, p. 71-80, 2004.

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

SMITH, F. A.; HODGE, H. C. Airborne fluorides and man: Part I. **CRC Critical Reviews of Environment Control**, Boca Raton, v. 8, p. 293-372, 1979.

SOBRAL, M. et al. *Myrtaceae*. In: LISTA de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB010828>>. Acesso em: 15 jul. 2012.

SOMNER, G. V.; FERRUCCI, M. S.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. *Cupania*, In: LISTA de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB032717>>. Acesso em: 15 jul. 2012.

SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 48-53, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

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

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

WAGH, N. D. et al. Biological monitoring of roadside plants exposed to vehicular pollution in Jalgaon city. **Journal of Environmental Biology**, Vikas Nagar, v. 27, n. 2, p. 419-421, 2006.

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

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

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

WOLFF, G. et al. The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 72, n. 1, p. 71-77, 2012.

WOLTERBEEK, B. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. In: INTERNATIONAL WORKSHOP-BIOMAP, 2., 2003, Vienna. **Proceedings**...Vienna: IAEA, 2003. p. 87-104.

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