



DISSERTAÇÃO

**EFEITOS DA ABSORÇÃO DO FLÚOR
ATMOSFÉRICO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E ESTADO
NUTRICIONAL VEGETAL**

GEISA LIMA MESQUITA

Campinas, SP
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO AGRONÔMICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL
E SUBTROPICAL

EFEITOS DA ABSORÇÃO DO FLÚOR
ATMOSFÉRICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO
E ESTADO NUTRICIONAL VEGETAL

GEISA LIMA MESQUITA

Orientador: Dirceu de Mattos Junior

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Gestão dos Recursos Ambientais

Campinas, SP
Abril 2010

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

M582e Mesquita, Geisa Lima

Efeitos da absorção do flúor atmosférico sobre o desenvolvimento e estado nutricional vegetal / Geisa Lima Mesquita. Campinas, 2010. 90 fls

Orientador: Dirceu de Mattos Junior
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)
– Instituto Agronômico

1. Poluição Toxicidade 3. Bioindicadoras, 4. Anatomia foliar
5. Trocas gasosas I. Mattos Junior, Dirceu de II. Título

CDD 631.8



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(019) 3231-5422 ramal 194
pgiac@iac.sp.gov.br



Curso de Pós-Graduação
Agricultura Tropical e Subtropical
Certificado de Aprovação

Título: **Efeitos da absorção do flúor atmosférico sobre o desenvolvimento e estado nutricional vegetal**

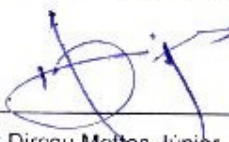
Aluna: **Geisa Lima Mesquita**

Área de Concentração: **Gestão de Recursos Agroambientais**

Processo SAA nº: **12147/08**

Orientador: **Dr. Dirceu Mattos Júnior**

Aprovado pela Banca Examinadora:



Dr. Dirceu Mattos Júnior - IAC



Dr. Elliot Watanabe Kitajima - ESALQ



Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro - IAC

Visto

Campinas, 26 de abril de 2010


Adriana Parada Dias da Silveira
Coordenadora
Pós-Graduação Instituto Agrônomo

DEDICO

A meus pais, Jarcisio e Joaquina pelo grande amor, incentivo e mesmo nas maiores dificuldades sempre me proporcionaram o melhor e também por me ensinarem, nos bons e nos difíceis momentos, a ser uma pessoa mais humana, Aos meus irmãos Jhais e Luciano, que são pessoas incríveis e que com certeza, fizeram parte de mais essa etapa da minha vida

HOMENGEIO

Ao Fernando C. B. Zambrosi, pela enorme ajuda em cada etapa desse trabalho, pelo amor, carinho, companheirismo, cumplicidade, dedicação, força,

AGRADECIMENTO

À Deus, pela força e proteção em todos os momentos, nunca me deixando desistir;

Ao Dr. Dirceu de Mattos Júnior, por ter sido um grande orientador, pelo apoio, paciência, confiança e por ter deixado uma grande contribuição para minha melhoria profissional;

Ao Dr. Heitor Cantarella pela ajuda em todos os momentos, pela segura orientação, por também ter deixado uma grande contribuição para minha vida profissional;

Ao Dr. Francisco Tanaka pela amizade, apoio, incentivo e ajuda para uma das etapas mais difíceis desse trabalho;

Aos Pesquisadores Mônica Abreu, Cristiano Alberto Andrade e Luiz Teixeira pela contribuição e ajuda;

Ao Dr. Eduardo Caruso Machado e Ricardo Krella Machado contribuição para este trabalho;

À Oliveira Guerreiro Filho pela recomendação e disponibilização das variedades de café para a realização deste trabalho;

Ao Dr. Eliot Kitajima e Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro pela grande contribuição para a finalização desta Dissertação;

À Fundag, juntamente com o Dr. Heitor Cantarella pela concessão da primeira bolsa de estudo que tive;

À Fapesp, pela concessão da bolsa de estudo, fundamental para o desenvolvimento meu trabalho (FAPESP, Proc. 2008/52557-0 e 2008/09541-6);

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica de Pesquisa Agropecuária do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (NAP/MEPA, ESALQ/USP)

Às amigas de todas as horas Ariana, Mariana, Rimena, Júlia pela amizade, carinho, apoio, ajuda e pelos momentos divertidos que passamos juntas;

A Dona Leo e à Marildinha, que foram duas mães de coração que tive durante o mestrado;

Às amigas de república Lenita, Cecília, Rafaely, Fabiana, Juliana e Andréia;

A José Luís pela grande ajuda na preparação e condução dos experimentos;

Aos Funcionários do centro de solos e Recurso Agroambientais, especialmente Giselda Alexandre, Renata, Luís, Rubens, Tibana, pela ajuda na preparação e realização das análises químicas;

À todos que de algum modo prestaram a sua colaboração para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 A Poluição Ambiental	2
2.2 O Flúor, sua Ocorrência no Meio Ambiente e suas Fontes Emissoras	3
2.3 Formas de Absorção, Acúmulo e Efeitos do Flúor em Plantas	4
2.4 Plantas Tolerantes, Suscetíveis e Bioindicadoras	6
2.5 Outras Plantas de Interesse Econômico.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Experimento I: Resposta do Citros e Cafeeiro à Exposição ao Flúor Atmosférico....	9
3.1.1 Plantas e delineamento experimental	9
3.1.2 Construção e controle da uniformidade da câmara de nebulização, preparação dos vasos, semeadura, plantio e transplântio	9
3.1.3 Exposição controlada das plantas ao F e sintomas visuais da sua toxicidade	11
3.1.4. Medidas de trocas gasosas	12
3.2 Coleta, Fixação e Polimerização de Amostras para Análise Anatômica	13
3.2.1 Microscopia de luz	13
3.2.2 Microscopia eletrônico de varredura (MEV).....	14
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	14
3.3 Coleta do Experimento.....	15
3.4 Experimento II: Respostas no Gênero Citrus e Cafee à Exposição ao Flúor Atmosférico	15
3.4.1 Plantas e delineamento experimental	15
3.4.2 Exposição controlada de F e avaliações de efeitos de tratamentos.....	15
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	17
4.1 Experimento I: Resposta do Citros e Cafeeiro à Exposição ao Flúor Atmosférico..	17
4.1.1 Concentração de flúor nas folhas	17
4.1.2 Trocas gasosas	18
4.1.3 Sintomas visuais nas folhas	24
4.1.4 Microscopia de luz	26
4.1.5 Microscopia eletrônica de varredura	31
4.1.6 Produção de massa seca foliar	37
4.1.7 Análise química de folhas e acúmulo de nutrientes minerais.....	38
4.1.8 Flúor no solo	42
4.2 Experimento II: Respostas de Variedades de Citros e Café à Exposição ao Flúor Atmosférico	43
4.2.1 Teores de flúor nas folhas.....	43
4.2.2 Trocas gasosas	45
4.2.3 Sintomas visuais da toxicidade de flúor.....	53
4.2.4 Microscopia de luz	53
4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura	59
4.2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	64
4.2.7 Produção de massa seca foliar	69
4.2.8 Análise química de folhas e acúmulo de nutrientes minerais.....	71
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
6 CONCLUSÕES	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

ANEXOS..... 86

Efeitos da absorção do flúor atmosférico sobre o desenvolvimento e estado nutricional vegetal

RESUMO

A liberação de compostos inorgânicos fluorados à atmosfera causa preocupação pelo seu efeito tóxico às plantas, tais como alterações metabólicas, lesões foliares, e redução no crescimento e na produtividade. Na atmosfera, a presença do flúor (F) está relacionada a emissões de compostos reativos oriundos, por exemplo, da produção de superfosfatos e de revestimentos cerâmicos que constituem vias importantes de contaminação de culturas no entorno dos pólos industriais. Estudos utilizando espécies vegetais sensíveis e tolerantes como bioindicadoras de ambientes contaminados por F podem auxiliar na caracterização do nível de contaminação do ambiente e consequentemente do potencial de prejuízo à produção agrícola. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da exposição de citros e café ao F atmosférico sobre características anatômicas e fisiológicas, e acúmulo no tecido vegetal e comparar níveis de absorção com espécies de referência. Foram desenvolvidos dois experimentos em casa-de-vegetação em delineamento inteiramente ao acaso, para avaliar o efeito da exposição prolongada de plantas de citros e cafeeiros ao F atmosférico sobre características anatômicas e fisiológicas e o estado nutricional das plantas. Os níveis de absorção na matéria seca em relação às espécies de referência sensível (gladíolo, *Gladiolus* spp.) e tolerante (azevém, *Lolium multiflorum*) à toxicidade do elemento também foram avaliadas. Os tratamentos foram definidos pela combinação das espécies/variedades e duas intensidades de exposição ao F atmosférico (baixa e alta), em sistema de nebulização de solução $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,16 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fluorídrico (HF) no ambiente interno de uma câmara em três dias alternados, mais um controle não exposto em ambos os estudos. O Experimento I teve duração de 28 dias e avaliou o efeito do F nas plantas de citros e café durante a contaminação pelo elemento. Com base nos resultados obtidos, estabeleceu-se o Experimento II com duração de 57 dias para avaliação de três espécies de *Citrus* (laranjeira, limoeiro e tangerineira) e três variedades de cafeeiro (Apoatã, Catuaí e Obatã). Foram feitas medidas de assimilação de CO_2 (A), transpiração (E), condutância estomática (g_s), análises em microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão, além de análise química para caracterização dos teores de F no tecido foliar e de macro e micronutrientes. Plantas de gladíolo

manifestaram sintomas da toxicidade causada pelo F nas folhas a partir do segundo dia de exposição e os citros a partir da terceira semana de exposição com a alta dose do elemento em ambos os experimentos, já o café mostrou danos visuais apenas no Experimento I, a partir da terceira semana de exposição ao elemento. Houve variações nos parâmetros de trocas gasosas causados por efeitos indiretos à exposição ao F, os quais foram associados a prejuízos nos processos bioquímicos e fotoquímicos da fotossíntese das plantas, além de danos estruturais e ultraestruturais nas folhas, principalmente na alta exposição ao elemento. O efeito do F nas plantas foi agravado devido às condições ambientais. O F afetou negativamente a produção de fitomassa nas variedades de café, no limoeiro e nas plantas de gladiólo nos Experimentos I e II.

Palavras-chave: poluição ambiental, toxicidade, bioindicadoras, anatomia foliar, trocas gasosas, citros, café.

Effects of atmospheric fluoride absorption on plant growth and nutritional status

ABSTRACT

The release of inorganic fluorine compounds to the atmosphere is a concern because of its toxic effects on plants, such as metabolic disorders, leaf injuries, and reduction on growth and productivity. In the atmosphere, the presence of fluorine (F) is related to emissions of reactive compounds derived from production of superphosphate fertilizers and ceramic tiles which are important sources of crop contamination nearby industrial sites. Studies using sensitive and tolerant plant species as bioindicators of F-contaminated environments may help to characterize the level of environmental contamination and thus the potential for damage to agricultural production. Two experiments were carried out under greenhouse conditions in a randomized complete design, to assess the effect of long term exposure of citrus and coffee plants to the F concentration on physiological and anatomical characteristics and nutritional status of plants. The levels of F absorption on dry matter of sensitive indicator (*gladiolus*, *Gladiolus* spp.) and tolerant (ryegrass, *Lolium multiflorum*) species to the toxicity of the element were also evaluated. The treatments were defined by the combination of species/varieties and two intensities of exposure to the atmospheric F (low and high) using a nebulization system of 0.04 mol L⁻¹ and 0.16 mol L⁻¹ of hydrofluoric acid (HF) in a closed chamber during three alternate days, plus a control not exposed in both studies. The Experiment I last 28 days and evaluated the behavior of citrus and coffee plants under F contamination. Based on these results, the Experiment II was set up to last 57 days and to evaluate three species of *Citrus* (orange, lemon and tangerine) and three varieties of coffee (Apoatã, Catuaí and Obatã). Measurements of CO₂ assimilation (A), transpiration (E) and stomatal conductance (g_s), analysis by light microscopy and either scanning or transmission electron microscopy, and chemical analysis of leaf tissue were conducted. *Gladiolus* plants showed symptoms of toxicity caused by F in leaves from the second day of exposure and the citrus from the third week of exposure to high dose of the element in both experiments, since the coffee showed visual damage only in Experiment from the third week of exposure to the element. There were variations in the parameters of gas exchange caused by indirect effects of exposure to F, which were associated with losses in the biochemical and photochemical processes of photosynthesis of plants, in addition to structural damage and ultrastructural leaves,

especially in the high exposure to the element. The effect of F in plants was increased due to environmental conditions. OF negatively affected the biomass production in varieties of coffee, lemon and plants of gladiolus in Experiments I and II.

Keywords: environmental pollution, toxicity, bioindicators, leaf anatomy, citrus, coffee

1 INTRODUÇÃO

O rápido crescimento das indústrias e da urbanização sob planejamento imprudente tem levado à graves impactos ao ambiente, com efeito adverso sobre a biosfera. A poluição do ar tem contribuído para os problemas de saúde de seres humanos, declínio de florestas, perdas de produtividade agrícola e, conseqüentemente, elevado a preocupação pública em todo mundo.

Grandes quantidades de poluentes do ar (partículas, líquidos e gases) são emitidas tanto de fontes naturais, quanto antropogênicas, e após a emissão esses poluentes estão sujeitos a transformações dependendo das características físicas e químicas do ambiente, o que acaba por definir suas concentrações na atmosfera. Esses poluentes podem influenciar o crescimento e o desenvolvimento das plantas através de múltiplas vias e mecanismos em longo prazo. Assim, a resposta das plantas aos poluentes do ar depende da toxicidade química, da exposição ao poluente e da sensibilidade das espécies.

Dentre os poluentes atmosféricos, o flúor (F) se destaca devido ao seu alto potencial fitotóxico. No Brasil, há pólos industriais de produção de adubos fosfatados e de pisos e revestimentos, cujas atividades constituem fontes de potencial emissão de F no ambiente. Na região de Campinas - SP encontram-se dois importantes pólos industriais de fertilizantes fosfatados (ANDA, 2009). E em relação às outras indústrias, 34 cerâmicas são listadas no pólo de Santa Gertrudes - SP (ASPACER, 2008).

Medidas de controle das emissões atmosféricas têm sido tomadas, contudo o monitoramento de sistemas de filtro e outros sequestradores de F nessas indústrias se fazem necessários para garantir a qualidade da produção agrícola. Também, faz-se necessários estudos em condições controladas, que ampliem informações sobre o que ocorre no campo e caracterizem o potencial de prejuízo do F sobre espécies com interesse agrícola, aspecto pouco tratado, até o momento.

Os efeitos do excesso de F na vegetação não são apenas limitados aos danos foliares ou ao menor crescimento e produtividade vegetal, mas também podem resultar em problemas de saúde pública. O F na forma do ácido fluorídrico (HF) pode ser incorporado à cadeia alimentar e causar fluorose em animais que se alimentam de vegetação com elevada concentração desse elemento, por exemplo. A fluorose está relacionada com alterações nos dentes e no esqueleto em herbívoros, especialmente de bovinos e de ovinos (CRONIN et al., 2001).

Com base no exposto, formularam-se as seguintes hipóteses: i) a poluição atmosférica por F causa prejuízo ao desenvolvimento e produção vegetal mesmo antes da ocorrência de sintomas visuais da toxicidade do elemento nas plantas e ii) diferentes respostas são observadas entre variedades/espécies de plantas em função do ambiente contaminado por F.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da exposição prolongada de duas espécies de interesse econômico, citros e café, ao F atmosférico sobre características anatômicas e fisiológicas, e acúmulo no tecido vegetal que afetam a formação da produção dessas culturas e comparar níveis de absorção com espécies de referência do tipo sensível e tolerante à toxicidade do elemento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Poluição Ambiental

O avanço tecnológico do mundo moderno levou ao aumento da poluição ambiental e se tornou uma preocupação globalizada em função do grande volume de emissões de gases e partículas que ocorrem atualmente na atmosfera (ALLOWAY & AYRES, 1998). Diante desse contexto de poluição, há necessidade de medidas de controle e correções adequadas para a manutenção dos ecossistemas, incluindo aqueles agrícolas.

Com o aumento dos problemas ambientais, foram desenvolvidos métodos voltados para o seu monitoramento, utilizando-se, dentre outras possibilidades, plantas ou animais como bioindicadores. Esses passam a apresentar reações específicas quando expostos a diferentes tipos de poluentes, fornecendo informações difíceis de serem obtidas ou quantificadas de outra forma. O biomonitoramento tem sido utilizado no Brasil para estudos da qualidade do ar e efeito dos poluentes sobre as espécies vegetais (WEINSTEIN & DAVISON, 2003).

Para avaliar os impactos causados pelos poluentes atmosféricos na vegetação, o órgão da planta mais estudado é a folha (AZEVEDO, 1995). Várias características foliares podem ser utilizadas para qualificar e quantificar a influência dos poluentes sobre as plantas, tais como: ocorrência e aspectos das lesões foliares, com injúrias ou necrosadas, produção e desenvolvimento das plantas, taxa de fotossíntese e respiração, fluorescência da clorofila a, conteúdo de clorofila, quantidade do poluente acumulado

no tecido foliar (PRADO-FILHO, 1993; OLIVA & FIGUEIREDO, 2005), além de alterações micromorfológicas, estruturais e ultra-estruturais (FORNASIERO, 2001; FORNASIERO, 2003; SANT'ANNA-SANTOS & AZEVEDO, 2007).

Sintomas não macroscópicos têm sido utilizados como métodos de avaliação da poluição atmosférica, sendo fundamental a detecção destes utilizando-se técnicas microscópicas e fisiológicas. Desta forma, o estudo das alterações estruturais e ultra-estruturais provocadas por poluentes tem sido importante no diagnóstico da injúria, principalmente quando não existem sintomas visíveis, e também, para o entendimento dos mecanismos de fitotoxicidade (SOIKKELI, 1981).

Dentre os poluentes atmosféricos o F é considerado o terceiro mais importante, depois do gás dióxido de enxofre (SO₂) e do ozônio (O₃) (JHA et al., 2008), e o de maior fitotoxicidade, pois pode causar injúrias em espécies suscetíveis em concentrações atmosféricas menores que 1 µmol L⁻¹ (WEINSTEIN, 1977).

Dados de SIDHU (1979) mostram que a concentração de F atmosférico diminui com a distância da fonte emissora, devido a fatores do ambiente, como a velocidade do vento, por ser facilmente diluído e arrastado pela água das chuvas e também pela sua alta reatividade, reagindo com substâncias orgânicas e inorgânicas, como alumínio (Al), cálcio (Ca), hidrogênio (H), silício (Si), formando compostos de alta estabilidade. Esses fatores refletem no padrão de efeitos do F em plantas e animais (AMARAL, 1997), e dificulta o estudo da distribuição e concentração do flúor diretamente do ar (MIRLEAN et al., 2002).

2.2 O Flúor, sua Ocorrência no Meio Ambiente e suas Fontes Emissoras

O F é o mais eletronegativo e o mais quimicamente ativo dos elementos não-metálicos. Possui pequeno diâmetro iônico e sua carga resultante de alta densidade faz com que tenha capacidade de formar fortes ligações iônicas, como pontes de H, o que fornece ao íon o potencial de se combinar diretamente com a maioria dos elementos, formando fluoretos que estão entre os mais estáveis de todos os compostos químicos, e também de interagir com macromoléculas orgânicas (SUPHARUNGSUM & WAINWRIGHT, 1982).

O fluoreto ocorre naturalmente no solo em muitas formas combinadas, sobretudo como fluorita (CaF₂), criolita (Na₃AlF₆) e apatita [Ca₁₀F₂(PO₄)₆] (SMITH, 1983). Junto das fontes naturais, o transporte aéreo de poeira e a liberação de aerossóis do mar podem introduzir na atmosfera quantidades consideráveis de partículas e gases contendo

F que constituem a principal via para a ocorrência da toxicidade em plantas (JACOBSON & HILL, 1970).

No caso da poluição antropogênica, a presença do F na atmosfera está relacionada com atividades que emitem para o ambiente compostos altamente reativos, como HF e tetrafluoreto de silício (SiF₄), que são liberados pelo aquecimento de rochas e materiais terrosos a temperaturas acima de 500 °C. Assim, as principais fontes industriais relacionadas à emissão de compostos reativos na atmosfera são grandes incineradoras (principalmente de carvão), fundição de Al e outros metais não ferrosos, produção de superfosfatos (a partir da apatita) e outros adubos minerais, fábricas de vidro e cerâmica (ARNDT et al., 1995; OLIVA et al., 2005).

2.3 Formas de Absorção, Acúmulo e Efeitos do Flúor em Plantas

O F é absorvido da atmosfera pelas folhas das plantas, principalmente pelos estômatos e, em menor proporção, através da cutícula e de lenticelas (BRAEN & WEINSTEIN, 1985). O elemento se dissolve na fase aquosa da cavidade subestomática e se move na forma iônica através dos espaços do apoplasto do mesofilo foliar com a corrente transpiratória até as margens e pontas das folhas, onde se acumula (CEPA, 1996). A absorção de F pelas raízes das plantas ocorre somente em solos muito ácidos ou quando grande quantidade do elemento é adicionada ao meio de modo que sua capacidade de inativá-lo pela formação de compostos insolúveis é excedida (BRAEN & WEINSTEIN, 1985). O F tende a se acumular no local de absorção, ou seja, nas raízes quando absorvido do solo, ou nas folhas quando absorvido da atmosfera (THOMAS, 1965). Segundo WEINSTEIN & DAVISON (2004), o solo normalmente não é uma fonte de níveis tóxicos de F para a maioria das plantas e os teores de F no sistema radicular ao redor de 5 mg kg⁻¹ a 10 mg kg⁻¹ são considerados comuns. A possibilidade de absorção de F pelas raízes é menor em virtude da alta adsorção do elemento pelo solo, em decorrência da sua alta reatividade.

Há uma tendência de ocorrer maiores teores de F em tecidos vegetais nos períodos mais secos do ano pelas elevadas concentrações na atmosfera, o que não ocorre nos meses mais úmidos devido à maior remoção do elemento pela chuva. Exposições de F atmosférico relativamente curtas podem causar danos a espécies ou cultivares sensíveis a concentrações de até 1 mg m⁻³, enquanto que, são necessárias concentrações de 100 mg m⁻³ de SO₂ ou O₃ para causar danos nestas mesmas espécies (ARNDT et al., 1995).

Na forma particulada o F causa menos danos à vegetação do que na forma gasosa (CHANG, 1975) e a quantidade desse poluente que penetra e se acumula na planta depende de fatores como espécie, idade e estágio de desenvolvimento, concentração do contaminante, duração da exposição, luz, umidade, temperatura e ventos (BUNCE, 1985).

Têm sido observadas, nas proximidades industriais emissores de F sem controle, perdas na produção agrícola e redução no crescimento de plantas cultivadas, entre elas, espécies arbóreas florestais, milho e cana-de-açúcar (ADAMS et al., 1957; FORTES et al., 2003; OTTO et al., 2007; SANT'ANNA-SANTOS & AZEVEDO, 2007). A toxicidade às plantas pelo F ocorre através de alterações metabólicas, lesões foliares, redução no crescimento e no desenvolvimento das plantas expostas à poluição, os quais se estendem a prejuízos do ambiente como um todo (ARNDT et al., 1995).

O F causa, além das injúrias visíveis, alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas importantes nas plantas. Conforme o F se acumula nos cloroplastos, uma série de enzimas como ATP-sintase, ribulose bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco) e sacarose sintase têm suas atividades reduzidas, o conteúdo das clorofilas é diminuído. Os cloroplastos, seguidos das mitocôndrias, são os principais sítios de acumulação do fluoreto. Este conjunto de fatores reduz a fotossíntese das plantas expostas e conseqüentemente seu desenvolvimento e produção (WEINSTEIN, 1977; BOESE et al., 1995; DIVAN, 2002). Outras respostas fisiológicas da planta exposta ao F incluem mudanças na composição e função da membrana e da parede celular (FAÇANHA & MEIS, 1995), mudanças na respiração celular (MILLER & MILLER, 1974), no metabolismo dos carboidratos (ASTHIR et al., 1998) e alterações anatômicas e ultra-estruturais nas plantas (FORNASIERO, 2003).

Reduções na fotossíntese podem ser associadas, por sua vez com clorose visíveis em função da redução da concentração de pigmentos de clorofila, ou com a inibição de enzimas fotossintéticas, como a rubisco (PARRY et al., 1984).

BREWER et al. (1965) relatam que sintomas de toxicidade em milho podem aparecer quando os teores foliares atingirem entre 28 mg kg⁻¹ e 48 mg kg⁻¹, pouco antes do florescimento, marcados pelo início de clorose internerval das folhas mais expostas ao sol e evolução para necrose marginal das folhas no período da maturação dos grãos. BRYAN (1957) relatou a ocorrência de sintomas foliares dessa toxicidade em citros cultivados próximos da indústria de produção de fertilizantes fosfatados na Flórida (EUA). Os efeitos da exposição prolongada dos citros ao F, nas formas de HF e fluoreto

de sódio (NaF), resultaram em acumulação gradual de F nas folhas, produzindo sintomas de toxicidade, como necrose, menor crescimento da parte aérea, menor área foliar, abscisão foliar, além de redução na produção de frutos (até 54%), associado a teores foliares de 75 mg kg⁻¹ a 150 mg kg⁻¹ de F (BREWER et al., 1969).

Segundo WEINSTEIN & DAVISON (2004), o F teria a capacidade de complexar o Ca da parede celular e da lamela média, os tornando frágeis e propensos ao colapso, uma vez que o Ca associado à membrana plasmática e à parede celular ajuda a manter a estabilidade entre grupos fosfatados e carboxílicos. Com o deslocamento do Ca pelo F ocorrerá rompimento das membranas celulares, o que desencadeia uma série de distúrbios na planta.

2.4 Plantas Tolerantes, Suscetíveis e Bioindicadoras

Para plantas que não apresentam sintomas da contaminação com F, prejuízos diretos sobre a produtividade são mais difíceis de mensurar. ARNDT et al. (1995) relatam casos de redução de 25% na produção de plantas de feijão sem sintomas de danos visuais às folhas ou redução no crescimento e na produção de espécies florestais, batata e cereais de inverno.

A determinação do nível de dano à produção em função da contaminação com F tem sido considerada tarefa difícil (WEINSTEIN et al., 1977; FLAGLER, 1998). Em casos de contaminação industrial, as áreas afetadas são relativamente extensas. Lavouras mais distantes e menos afetadas geralmente estão em solos bem adubados e com acidez controlada ou com variedades diferentes, o que limita a análise de impactos.

A esse problema, se junta ainda a questão de efeitos cumulativos pela exposição prolongada das culturas à deposição do F atmosférico mesmo a baixas concentrações. Para o diagnóstico do potencial de dano em campo, é possível utilizar determinadas espécies ou variedades como bioindicadoras de poluentes, o que consiste em um método relativamente barato e capaz de fornecer informações precisas e rápidas (ARNDT et al., 1995). As bioindicadoras são organismos ou comunidades de organismos que reagem à poluição, com modificação de suas funções vitais normais (indicadores de reação), ou que são capazes de acumular poluentes (indicadores de acumulação) sem afetar sua produtividade.

A sensibilidade dos organismos a poluentes do ar constitui um critério essencial na escolha de bioindicadores (ARNDT et al., 1995). Assim, plantas sensíveis possibilitam detectar e monitorar poluentes atmosféricos por meio da observação de

alterações morfológicas, anatômicas, fisiológicas ou bioquímicas (KOZLOWSKI, 1980).

Gladíolos (*Gladiolus* spp.) podem ser utilizados como bioindicadores por serem sensíveis ao F, uma vez que mostram sintomas visuais de clorose e necrose nas folhas, além de distúrbios fisiológicos, com concentrações de F foliares menores que 30 mg kg⁻¹ (CEPA, 1996). Gramíneas como o capim-colonião (*Panicum maximum*) e suas variedades também são considerados relativamente sensíveis à toxidez de F. Plantas de arroz expostas a altas concentrações na atmosfera (~0,03 mg g⁻¹ de F) não produzem grãos, sendo ainda relatado aumento nas atividades das peroxidases e nos níveis de fenóis (OLIVA et al., 2005). Ao contrário, o azevém (*Lolium multiflorum*) se mostra como uma planta acumuladora desse elemento. Desta forma, a coleta sistemática de dados relativos a esses efeitos permite a criação de um inventário de respostas à poluição, o que representa a possibilidade de se estabelecer um sistema de informação no controle da qualidade do ar e prejuízos latentes às culturas agrícolas (KLUMPP et al., 2001).

Plantas com tolerância intermediária apresentam sintomas de toxicidade com cerca de 100 mg kg⁻¹ de F na matéria seca da parte aérea (CEPA, 1996). Por outro lado, aquelas menos sensíveis podem acumular grandes quantidades do elemento sem mostrar sintomas foliares da toxicidade, como o algodão (THOMAS, 1965), o trigo, a alfafa e o azevém, que não apresentam danos foliares com concentrações acima de 200 mg kg⁻¹ de F (CEPA, 1996; FRANZARING et al., 2007). JACOBSON et al. (1970) mostraram que algumas espécies acumulam até 4 mg g⁻¹ do elemento na planta toda, sem mostrar sinais de toxicidade. Espécies que acumulam Al, tais como *Camellia sinensis* e *Tibouchina mutabilis*, também acumulam grandes quantidades de F sem apresentar sintomas de injúrias (ARNDT et al., 1995; DOMINGOS et al., 1998).

2.5 Outras Plantas de Interesse Econômico

As culturas como os citros e o café, frequentemente encontradas no entorno de pólos emissores de F, são importantes pela participação econômica em relação ao valor da produção e à inclusão de pequenos e médios produtores na pauta de produção agrícola no Estado de São Paulo (CATI, 2008).

WANDER & McBRIDE (1956) estudaram sintomas de clorose em folhas de árvores de citros perto de instalações de processamento de fosfato no condado de Polk na Flórida (EUA), e observaram que folhas maduras de citros são relativamente

tolerantes ao F. Todavia, folhas jovens mostraram clorose quando expostas a baixas concentrações de HF na atmosfera. Necroses apareceram apenas em plantas expostas a altos níveis de HF, superiores a $15 \mu\text{mol L}^{-1}$.

DAMATTA et al. (1997) observaram que o desempenho fotossintético de cultivares de café (*Coffea arabica* cv. Red Catuaí e *Coffea canephora* cv. Kouillou) diferiu sob estresse hídrico. MACHADO et al. (2007) demonstraram ocorrer respostas diferenciais na assimilação de CO_2 , condutância estomática (g_s), pressão parcial de CO_2 intercelular (C_i) e eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) entre a laranjeira Valência (*Citrus sinensis*), o tangor Murcott (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) e a limeira ácida Tahiti (*Citrus latifolia*) dependendo de variações da temperatura do ar, pressão de vapor atmosférica e luminosidade. Esse comportamento diferencial de plantas a fatores do ambiente se deve a alterações anatômicas, morfológicas e fotossintéticas, peculiares para cada espécie ou variedade, que influenciam as características de tolerância e suscetibilidade das plantas às condições adversas (OGUCHI et al., 2005)

Neste contexto, dispõe-se de informações limitadas acerca da resposta de espécies cultivadas ao excesso de F no ambiente, cujos prejuízos podem não estar apenas associados a sintomas visuais da toxicidade do elemento já descritos, mas também a distúrbios fisiológicos, anatômicos ou ultra-estruturais que levam a sensíveis reduções da produtividade. O conhecimento das respostas das plantas à variação das condições do ambiente possibilita que se maneje o cultivo visando aumento da produtividade, além de redução dos impactos ambientais na vegetação e na produção agrícola.

Sendo assim foram agrupados dois gêneros (*Citrus* e *Coffea*) para analisar seus comportamentos frente a contaminação por F. É possível que, em função da anatomia foliar (espessura de cutícula, número e tamanho de estômatos etc.) e características fisiológicas específicas (mecanismos de compartimentação, exclusão e etc.), a sensibilidade ou resistência à exposição ao F seja distinta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento I: Resposta do Citros e Cafeeiro à Exposição ao Flúor Atmosférico

3.1.1 Plantas e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Instituto Agrônômico (IAC), com exposição ao HF durante o período de 10 de novembro a 8 de dezembro de 2008, cuja temperatura média máxima e mínima do ar durante a condução do experimento foram 30 °C e 17 °C, respectivamente. Foram utilizadas plantas de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra], café (*Coffea arabica* L. cv. Obatã IAC 1669-20), além das bioindicadoras azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e gladiolo (*Gladiolus* spp.) var. White Goddess.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com tratamentos definidos pelas espécies vegetais e duas intensidades de exposição ao F atmosférico (0,04 mol L⁻¹ - baixa exposição ou 0,16 mol L⁻¹ - alta exposição), em sistema de nebulização de solução no ambiente interno de uma câmara, mais plantas controle não expostas ao F, utilizando quatro repetições.

Os dados de concentração de F nas folhas, produção de massa seca, trocas gasosas e concentrações de nutrientes nas folhas foram submetidos à análise de variância pelo teste F e os efeitos dos tratamentos foram avaliados por meio de comparação de médias (n = 4) pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o modo GLM do pacote estatístico SAS[®] (SAS Institute, Inc., 1996).

3.1.2 Construção e controle da uniformidade da câmara de nebulização, preparação dos vasos, semeadura, plantio e transplantio

A exposição das plantas ao F foi realizada em câmara com capacidade para oito vasos, com estrutura montada em tubos de PVC com 5 cm de diâmetro com fechamento do topo, do fundo e das laterais com filme plástico de polietileno transparente, com tratamento anti-UV e espessura de 150 µm. As dimensões da câmara foram: 2,4 m de comprimento x 1,5 m de largura x 1,7 m de altura, totalizando um volume de 6,12 m³. Na parte superior da câmara foi acoplado um nebulizador compacto (mod. Pulmosonic Star, Soniclear, São Paulo, SP), para aplicação e distribuição do F, na forma de HF, em seu interior. Na parte superior do volume interno da câmara, foi colocada uma tela branca de malha fina (0,30 mm; espessura do fio = 0,25 mm), para formação de uma

pequena antecâmara, para prevenir a injúria das folhas pelo contato direto de eventuais micro-gotas formadas no processo de nebulização do HF. Já, na parte superior da câmara, acima da tela branca e em posição diagonal, foram acoplados dois pequenos ventiladores, (mod. Personal Far, Fame, São Paulo, SP) de 18 cm de diâmetro, com três pás movimentando a 800 rpm, para circulação do ar em baixa velocidade e distribuição homogênea do F no interior da câmara. Para verificar a homogeneidade na distribuição do F na câmara foram instaladas em seu interior placas alcalinas com solução absorvente, composta por trietanolamina (TEA), glicerol, acetona e água deionizada, seguindo procedimento recomendado pela CETESB (CETESB, 1998). Essa solução foi colocada em papel de filtro Nalgon, com 2 μm de porosidade, e recortados para que coubessem em placas de Petri, com diâmetro de 5,3 cm, e dispostas em quatro diferentes pontos na câmara. Foram feitas nebulizações seguindo o mesmo critério usado para as plantas (item 3.1.3). No final de quatro dias de nebulizações, as placas foram coletadas, colocadas em recipientes fechados para evitar contato com a atmosfera, e levadas ao laboratório para determinação do F absorvido pelo método recomendado por FRANKENBERGER et al. (1996) e adaptado por Cantarella & Abreu¹. A modificação introduzida se refere a fórmula da solução tampão de ajuste de força iônica total (TISAB, acrônimo para *Total Ionic Strength Adjustment Buffer*) que mascara interferências químicas de íons como Al^{3+} e Fe^{2+} na solução, e conseqüentemente aumenta a precisão da leitura (FRANT et al., 1968), e ao uso de uma curva padrão de F no lugar do método de adição padrão para o cálculo do F na amostra. O F total foi determinado após a reação (alcalina) da amostra em mufla a 300 °C com NaOH 17 mol L^{-1} , a qual promove a decomposição de compostos contendo F.

A concentração média de F obtidos nas placas alcalinas foi $46,1 \pm 3,6 \mu\text{g L}^{-1}$ (n = 4), demonstrando que as nebulizações ocorreram de forma homogênea no interior da câmara.

As plantas foram crescidas em solo do tipo Latossolo Vermelho-Escuro coletado na camada arável, que foi seco ao ar e passado em peneira de malha de 0,4 cm de abertura. Retirou-se amostra para caracterização química, segundo RAIJ et al. (2001) e foram obtidos os seguintes resultados: P-resina = 4 mg dm^{-3} ; MO = 34 g dm^{-3} ; pH (CaCl_2) = 5,2; K^+ = 2,6 mmol_c dm^{-3} ; Ca^{2+} = 4,1 mmol_c dm^{-3} ; Mg^{2+} = 10 mmol_c dm^{-3} ; H+Al = 34 mmol_c dm^{-3} ; CTC a pH 7,0 = 87,9 mmol_c dm^{-3} ; soma de bases = 53,6 mmol_c

¹ CANTARELLA, H.; ABREU, M.F. Protocolo analítico para análise de flúor em amostras vegetais. Instituto Agrônômico, 2001. (Métodos internos).

dm^{-3} ; saturação por bases (V) = 61%; B = 0,42 mg dm^{-3} ; Cu = 8 mg dm^{-3} ; Fe = 15 mg dm^{-3} ; Mn = 23,3 mg dm^{-3} ; Zn = 2 mg dm^{-3} ; e de F total 203 mg kg^{-1} (FRANKENBERGER et al. (1996) e adaptado por Cantarella & Abreu).

No preparo do solo, misturou-se uréia e superfosfato triplo, e foi deixado em saco plástico de 20 L por 7 dias. Após esse período o solo foi colocado em vasos de 5 L (com 17 cm de diâmetro e 18 cm de altura) ou 10 L (com 27 cm de diâmetro e 28 cm de altura), que estavam preparados com um sistema de pavio, com corda de poliéster trançada com 1,5 m de comprimento, utilizada para sugar água de um recipiente colocado abaixo dos vasos e manter o solo sempre úmido. Não foi realizada a correção do pH do solo, pois de acordo com a análise química, a acidez encontrava-se satisfatória. Posteriormente foi realizado o transplante das mudas de café e de citros em vaso com capacidade de 5 e 10 L, respectivamente, colocando uma muda por vaso. A semeadura do azevém foi feita colocando-se 10 mg de sementes a 1 cm de profundidade em vasos de 5 L e o plantio do gladiolo, colocando 3 bulbos em vasos de 5 L. Em seguida foi feita a adubação dos vasos na forma de solução nutritiva composta por 10,92 g L^{-1} de sulfato de potássio (K_2SO_4), 9,49 g L^{-1} de cloreto de potássio (KCl), 37,11 g L^{-1} de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,88 g L^{-1} de sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,62 g L^{-1} de sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,23 g L^{-1} de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0,73 g L^{-1} de ácido bórico (H_3BO_3), para promover o crescimento adequado das plantas. No período inicial após o transplante e plantio das plantas, a umidade dos vasos foi mantida a 70% da capacidade de campo, e posteriormente, a 50-60%, por reposição diária da água perdida, e pesagens semanais dos vasos, até o estabelecimento das plantas.

3.1.3 Exposição controlada das plantas ao F e sintomas visuais da sua toxicidade

Após três meses do estabelecimento das plantas nos vasos, iniciaram-se as nebulizações com F na câmara montada, no dia 10 de novembro de 2008. Foram colocados 10 mL de HF (0,04 mol L^{-1} - baixa exposição ou 0,16 mol L^{-1} - alta exposição) no recipiente de plástico do nebulizador. Oito plantas, duas de cada espécie (bioindicadoras, café e citros), foram colocadas e fechadas no interior da câmara e nebulizadas até que todo o volume do ácido do recipiente do nebulizador fosse esgotado, com duração de 30 min. Após a exposição, as plantas permaneciam dentro da câmara por mais 60 min, até remoção para o ambiente externo. As plantas foram expostas ao ambiente contaminado por F durante três dias não subsequentes numa

mesma semana, durante 28 dias. Foram avaliados, periodicamente, os sintomas visuais nas folhas, causados pela exposição ao HF, com a descrição das fases de ocorrência e do tipo de folha afetada.

3.1.4. Medidas de trocas gasosas

Foram realizadas medidas de trocas gasosas das plantas expostas ou não ao F atmosférico após 27 dias do início das nebulizações nos períodos da manhã e da tarde, fazendo-se a média das variáveis analisadas entre os dois períodos. Essas medidas foram feitas utilizando um analisador de gases por infravermelho modelo LI-6400 (Licor Biosciences, Lincoln, Nebraska, EUA) e avaliando a assimilação de CO₂ (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração intercelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) nas folhas.

As temperaturas das folhas no momento das medidas variaram entre 30 °C a 35 °C no período da manhã e entre 34 °C a 39 °C no período da tarde. A radiação solar era $1200 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A umidade relativa do ar variou entre 35% a 45% no período da manhã e entre 21% a 31% no período da tarde. A concentração de CO₂ do ar foi de $370 \pm 3 \mu\text{mol mol}^{-1}$.

Medidas de fluorescência da clorofila foram feitas no mesmo dia e nas mesmas folhas utilizadas para medidas de trocas gasosas, nas folhas localizadas na região intermediária do ramo caulinar com um fluorômetro modulado (PAM 2000, Heinz-Walz). As medidas foram realizadas pelo método do pulso de saturação (SCHREIBER et al., 1994) em folhas pré-adaptadas ao escuro. Foram medidos os valores de fluorescência inicial (F_0) e máxima (F_m) após um período de 12 h no escuro. Com essas variáveis foi estimado a relação F_v/F_m , ou seja, a eficiência quântica potencial do fotossistema II (FSII). O estado adaptado ao escuro representou a situação em que a folha encontrava-se fotoquimicamente inativa, ou seja, onde os processos de transporte de elétrons na membrana do tilacóide estão desativados, resultando em um gradiente transtilacoidal mínimo e baixíssimas concentrações de NADPH e ATP, permitindo desta forma obtenção de valores de eficiência máxima para os processos fotoquímicos da fotossíntese (ROHÁČEK, 2002).

3.2 Coleta, Fixação e Polimerização de Amostras para Análise Anatômica

3.2.1 Microscopia de luz

O processamento de todos os materiais para estudos em microscopia foi realizado no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica de Pesquisa Agropecuária do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (NAP/MEPA, ESALQ/USP).

Tanto as folhas das plantas controle quanto as do tratamento com F foram coletadas e fixadas no mesmo momento e no período da manhã, dessa forma as alterações observadas nas análises de microscopia foram atribuídos aos efeitos do tratamento. Assim como o efeito do corante nas amostras, pois foram coradas no mesmo momento e por um mesmo intervalo de tempo.

Para os estudos em microscopia de luz foram coletadas duas folhas maduras, completamente desenvolvidas e fotossinteticamente ativas, do terço médio de espécies em estudo, após 28 dias de nebulizações, sendo as mesmas folhas utilizadas nas medidas de trocas gasosas.

Foram coletadas amostras do terço mediano do limbo foliar com medidas aproximadas de 4 mm x 5 mm, as quais foram imersas na solução fixadora de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) e submetidas ao vácuo para infiltração total do fixador. Após 12 h iniciou-se a desidratação em série de etanol crescente [30%, 50%, 70%, 90%, 100% (três vezes)], permanecendo 15 min em cada concentração. Em seguida, foi realizada a pré-infiltração com resina acrílica glicol-metacrilato (Leica[®]) e etanol 100% na proporção de 1:1, mantendo-se as amostras por cerca de 5 h em geladeira. Após esta etapa foi realizada a infiltração em resina pura por uma noite, também com refrigeração e em seguida levadas à polimerização em temperatura ambiente (RUETZE & SCHMITT, 1986).

Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo rotativo manual (Spencer, Lens Co., Berlim, Alemanha), com navalha de aço tipo C (Leica[®]) com 5 µm de espessura. As lâminas obtidas foram coradas com azul de toluidina a 0,05% em pH 2,6 (FEDER & O'BRIEN, 1986) e após secas, montadas com lamínulas tendo como meio de montagem Entellan[®].

As análises foram realizadas ao microscópio de luz (mod. Axioskop 2, Zeiss, Berlim, Alemanha) e as imagens registradas em arquivos digitais do tipo TIFF (acrônimo para *Tagged Image File Format*), com resolução de 1 Megapixel, com uma câmara (mod. MRc, Zeiss, Berlim, Alemanha) acoplada ao microscópio.

3.2.2 Microscopia eletrônico de varredura (MEV)

As amostras utilizadas para esta etapa foram coletadas da mesma região anteriormente determinada, também ao final do experimento com dimensões de aproximadamente 3 mm x 5 mm.

A fixação foi realizada utilizando-se o mesmo fixador da microscopia de luz. Após a fixação, foi realizada a pós-fixação por 1 h com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% no tampão cacodilato a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, o mesmo utilizado para a confecção do fixador. A seguir foi submetida à desidratação em série crescente de acetona [30%, 50%, 70%, 90%, 100% (por três vezes)] e imediatamente levados para secagem ao ponto crítico (mod. CPD 30, Balzers, Liechtenstein) tendo como meio de secagem o CO_2 .

As amostras secas foram coladas sobre *stubs*, expondo-se as duas faces do limbo foliar e levadas ao metalizador mod. MC 50, Baltec, Liechtenstein, para cobertura das amostras com ouro. Em seguida as amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura London Electronic Optical (LEO) (mod. 435 VP, Cambridge, Inglaterra), obtendo-se imagens armazenadas em arquivos digitais do tipo TIFF.

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para estudos ultra-estruturais foram coletadas amostras das mesmas regiões das análises para microscópio de luz e eletrônico de varredura (itens 3.2.1 e 3.2.2), também após 27 dias de nebulizações, no entanto com dimensões menores de aproximadamente 3 mm x 4 mm.

O fixador utilizado foi o mesmo das coletas anteriores por ser o fixador padrão do NAP/MEPA, ESALQ/USP para amostras vegetais. Após 12 h de fixação em geladeira as amostras foram pós-fixadas com OsO_4 a 1% em tampão cacodilato como no processo para o MEV.

A desidratação das amostras foi realizada em série de acetona crescente [30%, 50%, 70%, 90%, 100% (por três vezes)] e submetidas à pré-infiltração com resina epoxi Spurr[®] por no mínimo 5 h. A seguir, a infiltração com resina pura foi realizada por uma noite em temperatura ambiente. Após a infiltração, as amostras foram transferidas para moldes de silicone com resina e levadas à polimerização por 72 h a 70 °C.

Os blocos obtidos foram ajustados para o corte, retirando o excesso de resina e posteriormente seccionados a 70 nm de espessura com navalha de diamante a 45° (Diatome, Suíça), com 3 mm, em ultra-micrótomo (mod. UC6, Leica, Vien Santia, Alemanha). As secções obtidas foram depositadas sobre telas de cobre recobertas com

película de *Formvar* e contrastadas com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo em pH 12 (REYNOLDS, 1963). As telas foram analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão (mod. EM 900, Zeiss, Alemanha), e as imagens obtidas armazenadas em arquivos digitais do tipo TIFF.

3.3 Coleta do Experimento

O experimento foi coletado dia 8 de dezembro de 2008, 28 dias após o início das nebulizações. As plantas foram separadas em folhas novas, maduras e velhas, sendo as partes lavadas em água corrente e solução de detergente neutro (1 mL L^{-1}), passadas por três vezes em água deionizada, e o excesso de água retirado com o auxílio de papel absorvente. Em seguida, o material foi posto para secar em estufa com circulação forçada de ar a $65 \text{ }^\circ\text{C}$, até massa constante, para obtenção da produção de matéria seca. O material vegetal seco foi pesado, moído e submetido a análise química de rotina, para determinação dos teores de macro e micronutrientes no tecido segundo BATAGLIA et al. (1983) e de F conforme FRANKERBERGER et al. (1996) e modificado por Cantarella & Abreu (item 3.1.2). Amostras compostas de solo dos vasos foram coletadas a 5 cm de profundidade para verificar o teor de F e de nutrientes.

3.4 Experimento II: Respostas no Gênero Citrus e Cafee à Exposição ao Flúor Atmosférico

3.4.1 Plantas e delineamento experimental

O Experimento II foi conduzido de 16 de abril a 12 de junho de 2009, em casa de vegetação, onde as temperaturas médias máxima e mínima do ar durante a condução do experimento foram $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $11 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Foram utilizadas três espécies de citros: laranja Pêra [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) e limão Feminello [*Citrus limon* (L.) Burm. f.], e três variedades de cafeiro: Obatã (*Coffea arabica* L. cultivar Obatã IAC 1669-20), Catuaí vermelho (*Coffea arabica* L. cultivar Catuaí vermelho IAC 99) e Apoatã (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner cultivar Apoatã IAC 3597-8).

3.4.2 Exposição controlada de F e avaliações de efeitos de tratamentos

Com base nos resultados obtidos no Experimento I, foi utilizado o mesmo período de exposição das plantas na câmara (item 3.1.3) que melhor propiciou a

avaliação da resposta das diferentes espécies e variedades testadas, por um período de 57 dias e durante três dias não subsequentes numa mesma semana por 30 min e após a exposição permaneciam dentro da câmara por mais 60 min, até remoção para o ambiente externo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com tratamentos definidos pela combinação das espécies vegetais e duas intensidades de exposição ao F atmosférico ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$ - baixa exposição ou $0,16 \text{ mol L}^{-1}$ - alta exposição), em sistema de nebulização de solução no ambiente interno da câmara, mais um controle não exposto ao F, com quatro repetições.

Foram construídas duas novas câmaras para melhor condução do experimento, devido ao maior número de plantas, com relação ao Experimento I. A altura da câmara foi aumentada, com relação ao plano inicial, para evitar que as mudas encostassem-se à tela de proteção e se contaminassem pelo contato direto do HF. As câmaras passaram a ter as seguintes dimensões: 2,4 m de comprimento x 1,5 m de largura x 2,0 m de altura, totalizando um volume de $7,20 \text{ m}^3$.

O solo utilizado no Experimento II foi o mesmo do I, assim como o preparo (adubação e manejo da água). A caracterização química desse solo foi feito de acordo com RAIJ et al. (2001) e apresentou os mesmos resultados que a primeira análise (item 3.1.2).

Assim como no Experimento I foram realizadas medidas de trocas gasosas (item 3.1.4). No entanto, ao contrário do experimento anterior foram apresentados os valores das variáveis de trocas gasosas analisadas no período da manhã e a tarde após 57 dias do início das nebulizações. O período da manhã estava ensolarado, e a tarde nublado com pouca precipitação. As temperaturas das folhas no momento das medidas variaram entre $20 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ no período da manhã e entre $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ no período da tarde. A radiação solar foi de $1200 \pm 2 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A umidade relativa do ar variou entre 37% a 40% no período da manhã e entre 38% a 42% no período da tarde. A concentração de CO_2 do ar foi de $400 \pm 10 \text{ } \mu\text{mol mol}^{-1}$. Também foram feitas avaliações das folhas em microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão conforme descrito no item 3.2.

As plantas foram colhidas no dia 12 de junho de 2009, 57 dias após o início das nebulizações e foram amostradas as folhas novas e velhas. Os procedimentos da coleta e as avaliações de efeitos de tratamentos foram realizados conforme descritos no item 3.3.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I: Resposta do Citros e Cafeeiro à Exposição ao Flúor Atmosférico

4.1.1 Concentração de flúor nas folhas

A concentração de F nas folhas das espécies avaliadas aumentou com as doses de HF nebulizadas (Figura 1). As plantas de azevém não apresentaram sintomas visíveis da toxicidade por F ou queda da produção de massa seca da parte aérea mesmo com teores de 181 mg kg^{-1} nas folhas (Figura 1a). Para as espécies de gladiolo e café o aumento da concentração de F nas folhas provocou sintomas visuais de toxicidade pelo elemento e queda na produção. Para plantas de gladiolo, consideradas sensíveis ao F, concentrações menores que 55 mg kg^{-1} de F nas folhas foram suficientes para causar toxicidade e danos ao seu desenvolvimento (Figura 1b). Estudos sugerem que plantas sensíveis podem ser injuriadas quando a concentração foliar exceder a 30 mg kg^{-1} de F (TRESHOW & ANDERSON, 1989). Para espécies de café e citros, a concentração de 101 mg kg^{-1} causou toxicidade em folhas novas (Figura 4e-j) e influenciou de forma negativa na produção de massa seca das folhas do cafeeiro (Figura 9c).

O F atinge os espaços intercelulares através da cutícula e pode ser absorvido pelos estômatos ou pelas células do mesofilo alcançando o simplasto, ou ser arrastado pela corrente transpiratória, via apoplasto, até as extremidades do xilema, onde é acumulado (TRESHOW & ANDERSON, 1989). Assim, o padrão de distribuição de fluoreto nas plantas da maioria das gramíneas sugere que ele se acumula nos tecidos jovens e com maior atividade metabólica. A penetração do ânion no apoplasto de tecidos jovens é facilitada pela menor quantidade de cutícula, cera epicuticular e pela maior presença de pectinas (KANNAN, 1986), que associado ao crescimento vegetativo mais vigoroso e as altas taxas de movimento de água favorecem o maior acúmulo de F nos ápices e nas margens das folhas terminais (LEECE et al., 1982).

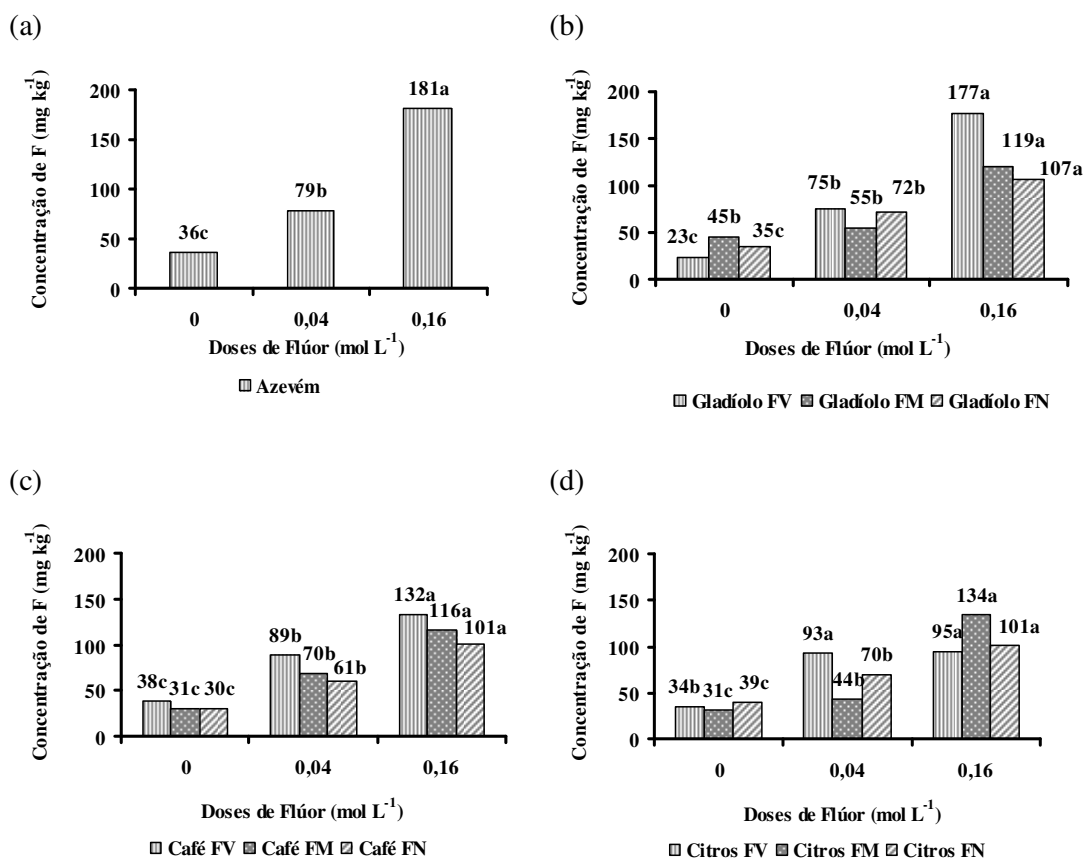


Figura 1. Teores de flúor nas folhas de plantas de azevém, e nas folhas velhas (FV), folhas maduras (FM) e folhas novas (FN) de gladiolo, café e citros 28 dias após o início da exposição ao HF em câmara de nebulização. As médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade para doses, pelo teste de Duncan.

4.1.2 Trocas gasosas

As plantas de azevém submetidas à contaminação por F não demonstraram efeitos da exposição em câmara de nebulização sobre a assimilação de CO₂ (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) (Figuras 2a, 3a e 4a). Nas plantas de gladiolo exposta ao F, as trocas gasosas foram afetadas quando comparadas às plantas controle, com efeito negativo na produção de massa seca (item 4.1.5, Figura 9b). O valor de A foi 11,63 μmol m⁻²s⁻¹ nas plantas controle e 3,97 μmol m⁻²s⁻¹ nas plantas exposta à maior dose de HF, ou seja, verificou-se redução de 66% (Figura 2b). Por outro lado as demais variáveis tiveram aumento em seus valores, de 0,028 mol m⁻² s⁻¹ para 0,123 mol m⁻² s⁻¹ para g_s, o que pode ter facilitado a absorção do elemento, aumentando a concentração nas folhas, e de 2,80 mmol m⁻² s⁻¹ para 11,10 mmol m⁻² s⁻¹ para E (Figuras 3b e 4b), mostrando que o F afetou o processo bioquímico nessa espécie. O F

pode ter se ligado ao Mg livre, metal que ativa a ação da rubisco, formando MgF_2 , afetando o processo de assimilação de CO_2 .

No café, a presença do F no ambiente causou aumento das trocas gasosas (A, g_s , e E) em relação ao controle. Na dose mais elevada de HF o aumento foi de 47% para A ($= 4,50 \mu mol m^{-2} s^{-1}$; Figura 2c), de 64% para g_s ($= 0,039 mol m^{-2} s^{-1}$; Figura 3c), efeito que também pode ter facilitado a absorção e maior concentração do elemento nas folhas, e de 46% para E ($= 3,86 mmol m^{-2} s^{-1}$; Figura 4c), quando comparado às plantas controle, não tendo efeito na dose intermediária de HF. Nessa espécie, pode-se observar que não houve limitação estomática no processo de fotossíntese, e mesmo que tenha havido aumento na assimilação de CO_2 durante o período de exposição ao F, as plantas apresentaram queda na produção (Figura 9c). Assim, o que pode ter ocorrido nas plantas de café seria aumento da respiração no período noturno, apresentando maior respiração de manutenção e menor respiração de crescimento em resposta ao estresse que estavam sendo submetidas, com maior perda noturna do CO_2 , assimilado durante o dia no processo de fotossíntese, o que fez com que grande quantidade do carbono assimilado não fosse utilizado para o desenvolvimento da planta.

No citros, assim como no azevém, não houve efeitos dos tratamentos sobre as trocas gasosas (Figuras 2d, 3d e 4d).

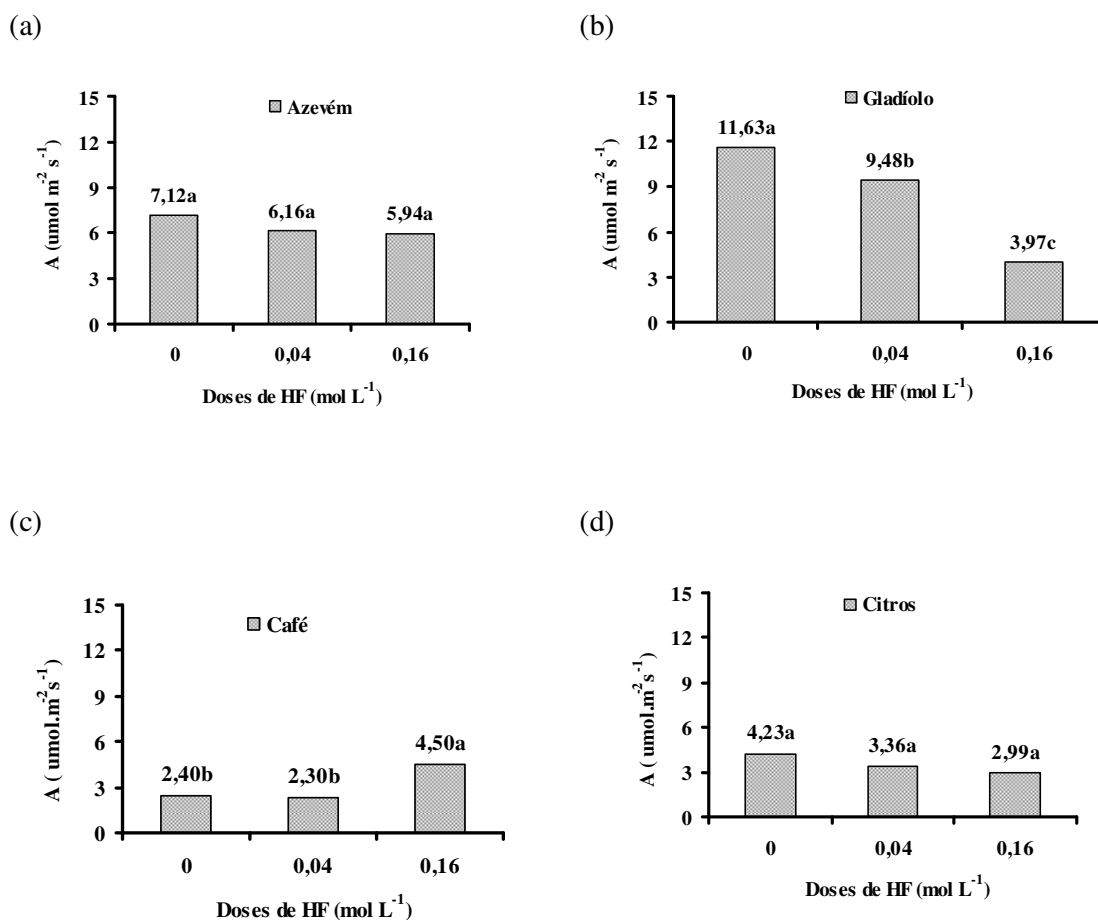


Figura 2. Efeito das doses de flúor na taxa de assimilação fotossintética de plantas de azevém (a), gladiolo (b), café (c) e citros (d) 28 dias após o início da exposição ao HF em câmara de nebulização. As médias seguidas por mesma letra, para cada dose, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Tanto as plantas de café, quanto aquelas de citros apresentaram valores de g_s muito baixos, pois foi feita médias entre os períodos da manhã e da tarde, e como o valor analisado a tarde foi muito baixo, pois as temperaturas do ar e das folhas estavam elevadas, 30 ± 4 °C e 36 ± 3 °C, respectivamente, as plantas diminuiram g_s numa tentativa de minimizar a perda excessiva de água, esse efeito foi intensificado com a presença do F, o que fez com que a média fosse reduzida para essas plantas.

O aumento de g_s pode indicar uma perda da capacidade da planta em regular o fechamento estomático, o que conseqüentemente afetou as trocas gasosas. Ainda há muito que se descobrir a respeito do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos (HAN et al., 2003; PEITER et al., 2005). Há evidências de que o aumento da concentração de cálcio (Ca^{2+}) no interior das células-guarda forneça uma força motriz

que desencadeia o fechamento dos estômatos. Como o F tem alta capacidade para reagir com o Ca^{2+} livre, e formar compostos como CaF_2 (BEN ABDALLAH et al., 2006), é possível que a concentração de Ca^{2+} livre necessária para que as células-guardas se fechem tenha diminuído, o que prejudicou o controle estomático e conseqüentemente alterou a condutância estomática de gladiolo e café, uma vez que a concentração interna de CO_2 não apresentou efeito nos tratamentos para essas espécies, não podendo ser o fator que determinasse essa regulação estomática (Figura 2). Com os estômatos abertos a transpiração foi maior com o aumento das doses de HF nessas plantas (Figura 3b, c).

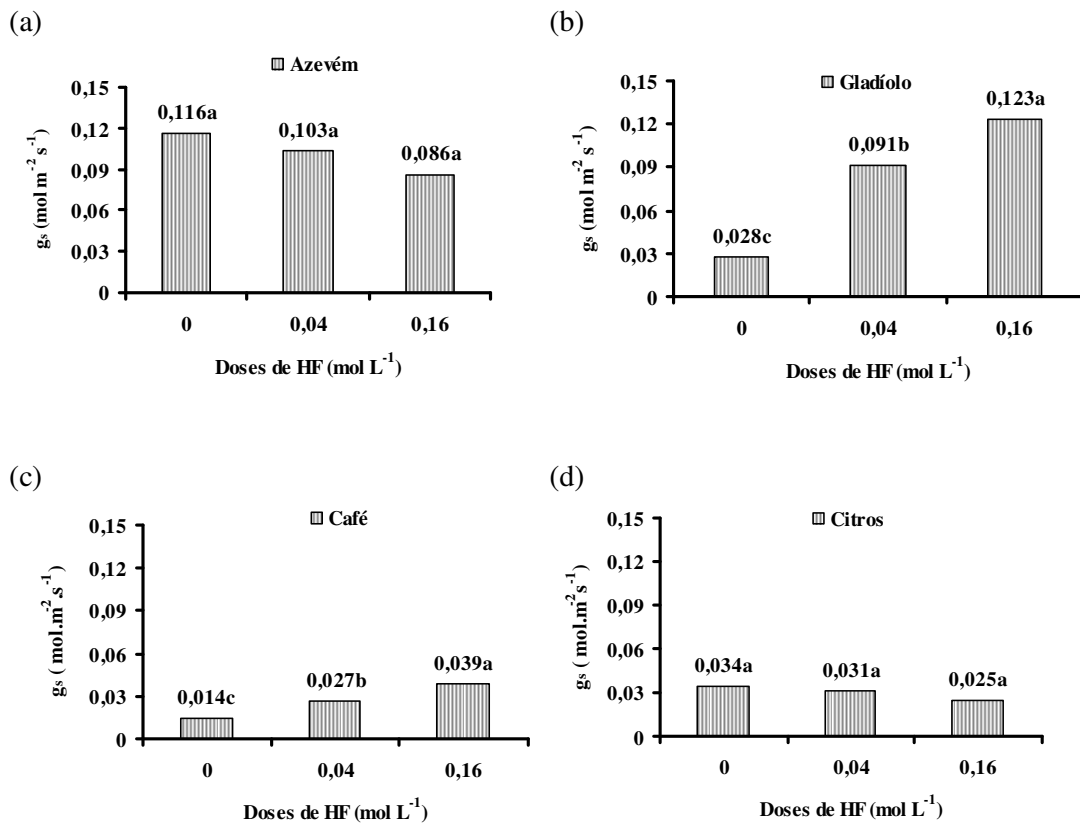


Figura 3. Efeito das doses de flúor na condutância estomática de plantas de azevém (a), gladiolo (b), café (c) e citros (d) 28 dias após o início da exposição ao HF em câmara de nebulização. As médias seguidas por mesma letra nas colunas, para cada dose, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

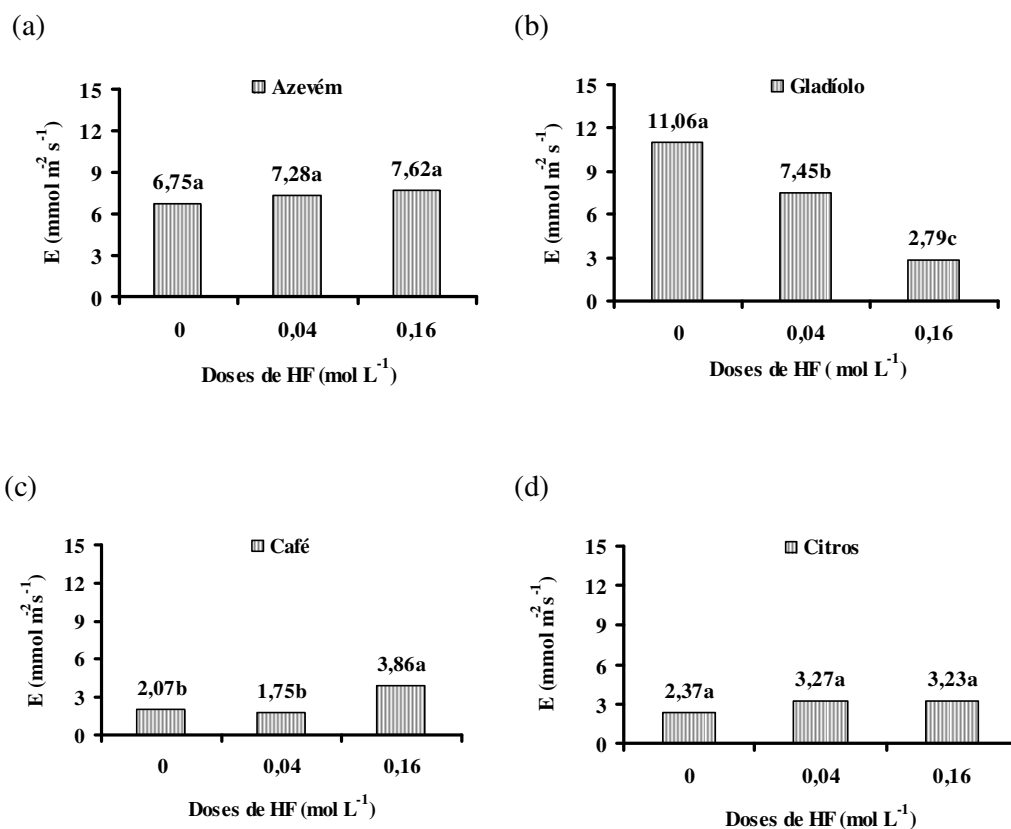


Figura 4. Efeito das doses de flúor na transpiração de plantas de azevém (a), gladiolo (b), café (c) e citros (d) 28 dias após o início da exposição ao HF em câmara de nebulização. As médias seguidas por mesma letra nas colunas, para cada dose, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Em resposta ao F, algumas plantas podem reverter o efeito na fotossíntese, apresentando aumento, seguido de redução, principalmente quando em exposições mais prolongadas (THOMAS & HENDRIDK, 1956; BENNETT & HILL, 1973; McCUNE et al., 1976; HORYATH et al., 1978), o que é difícil de entender, se o aumento inicial da taxa fotossintética estaria associada a ação de algum mecanismo de defesa da planta, acompanhado do aumento da respiração num maior prazo e com perda de maior quantidade de CO_2 no período noturno, em resposta ao estresse ambiental. Nessa condição verificar-se-ia perda líquida de CO_2 frente ao aumento aparente de A . Por outro lado, a inibição de A seria causada por acúmulo de F nos cloroplastos, redução na condutância estomática, ou alteração na atividade de enzimas fotossintéticas (YAMAUCHI et al., 1983). Estudos relataram o aumento da respiração em plantas tratadas com F, este foi o caso de plantas intactas (APPLEGATE et al., 1960b) e em

tecidos removidos de plantas após fumigação com HF, tanto na ausência de lesões foliares (APPLEGATE & ADAMS, 1960a; WEINSTEIN, 1961, MILLER & MILLER, 1974; McLAUGHLIN & BARNES, 1975) quanto na presença delas (HILL & PACK, 1959; YU & MILLER, 1967).

O tratamento com F não afetou os parâmetros de fluorescência da clorofila nas plantas de azevém, café e citros, com valores de F_v/F_m de $0,76 \pm 0,04$. Isto sugeriu que o sistema fotoquímico da fotossíntese não foi prejudicado nessas plantas. No entanto, o gladiolo apresentou efeito para essa variável (Prob. $F < 0,01$; CV=2,4%; Média = 0,74), mostrando valores de 0,826 nas plantas controle, 0,823 nas plantas nebulizadas com a dose intermediária de HF ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,578 nas plantas nebulizadas com a maior dose do ácido ($0,16 \text{ mol L}^{-1}$), sugerindo danos no sistema fotoquímico da fotossíntese para essas plantas.

Há evidências de que os efeitos do F sobre as trocas gasosas estejam ligados aos sintomas visuais (THOMAS & HENDRICK, 1956; HILL & PACK 1959; DOLEY, 1988). THOMAS & HENDRICK (1956) constataram que a redução na fotossíntese em gladiolo foi proporcional à lesão que as plantas apresentaram. Em experimentos com HF utilizando diferentes variedades de gladiolo não foi observado efeito significativo sobre a taxa de fotossíntese em plantas que não apresentavam danos visuais, ou o efeito foi proporcional à quantidade de folhas cloróticas ou necrosadas (HILL & PACK, 1959). DOLEY (1988) verificou que as diferenças das taxas de fotossíntese em espécies de pínus (*Pinus elliotti* e *P. caribaea*) foram correlacionadas com as concentrações de clorofila a e b das folhas, e cuja taxa fotossintética aumentou em baixas concentrações de HF e diminuiu em elevadas concentrações. No milho a fotossíntese foi reduzida em 14% após exposição de $5,1 \text{ mg m}^{-3}$ de HF por 15 dias, esse tratamento induziu manchas cloróticas típicas para a espécie e foi considerada a razão para a diminuição dessa variável (HORYATH et al., 1978). WEINSTEIN & DAVISON (2004) mostraram que fumigação contínua de HF variando de 1 mg m^{-3} a 9 mg m^{-3} por 18 dias em plantas de morangueiro não determinou qualquer efeito sobre a fotossíntese, embora uma pequena quantidade de necrose de tecido tenha sido induzida, mas quando a concentração de HF foi aumentada para 36 mg m^{-3} por 24 h, houve queda de 50% na taxa fotossintética. OLIVA & FIGUEIREDO (2005) estudando plantas de capim-rhodes (*Chloris gayana*) e capim-colonião, tratadas com chuva simulada de fluoreto de potássio ($\text{KF.H}_2\text{O}$) mostraram diminuição significativa da fotossíntese e na produção de massa seca em plantas de colonião, e constataram que esse efeito se deu devido a relação entre

fechamento dos estômatos e redução na assimilação de CO₂. Já para as plantas de capim-rhodes um pequeno aumento na condutância estomática resultou em aumento significativo na fotossíntese. DIVAN et al. (2007) não obtiveram resultados significativos sobre as variáveis de trocas gasosas nessas mesmas gramíneas em experimento de campo localizado há 1,1 km da fonte emissora de F atmosférico.

As injúrias visíveis e os efeitos metabólicos e fisiológicos causados pelo F podem ser explicados devido a interação do íon com cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (WEINSTEIN & DAVISON, 2004). O Mg está presente na pectina da parede celular, porém o elemento se encontra em maior quantidade nos cloroplastos, mais de 50% (MARSCHNER, 1995). Ainda segundo o autor as funções do Mg estão relacionadas à regulação do pH celular e ao balanço de cátions e ânions, além de ser requerido para muitas enzimas. Importante ainda é por fazer parte do átomo central da porfirina, componente da clorofila, e estabelecer a geometria precisa de certas enzimas como a enzima chave da fotossíntese, ribulose-bisfosfato-carboxilase/oxigenase (rubisco). O F possui a capacidade de se ligar ao Mg e formar compostos, como MgF₂, que causam distúrbios na biossíntese da clorofila, situação que ocorre quando o poluente se acumula no citoplasma. Dessa forma o mecanismo fotossintético pode ser afetado com a presença do F, não apenas por reagir com o Mg da clorofila e danificar a estrutura dos cloroplastos (FORNASIERO, 2003), mas também por impedir a atividade da rubisco no processo fotossintético (NILSSON & BRADEN, 1983; PARRY et al., 1984). No citros, apesar de ter ocorrido injúrias visuais em decorrência da exposição ao F, elas não afetaram a eficiência do fotossistema II (F_v/F_m) das plantas, principalmente pelo prejuízo ter ocorrido em menor proporção, com apenas as folhas do ponteiro danificadas, comparadas às plantas de gladiolo que tiveram mais de 70% das folhas necrosadas.

4.1.3 Sintomas visuais nas folhas

Os danos visuais ocorreram nas folhas velhas do gladiolo e do café, e nas folhas maduras do citros (Figura 5). As plantas de gladiolo foram as primeiras a manifestarem os sintomas de estresse ao F, que apareceram após o segundo dia de nebulização, nas plantas expostas à maior dose do elemento, e a partir do quarto dia, quando expostas à menor dose. A clorose iniciou pelo ponteiro das folhas novas, e se estendeu às áreas intercostais que se tornaram necrosadas, progredindo para o interior da lâmina foliar (Figura 5a, b). No início da segunda semana de nebulização todas as folhas

apresentaram os sintomas de toxicidade nas folhas (Figura 5c, d). Nas plantas de citros e de café, os primeiros sintomas apareceram a partir da quarta semana de exposição com a maior dose de HF ($0,16 \text{ mol L}^{-1}$). No citros, observou-se a ocorrência de clorose que iniciou nas extremidades e se estendeu ao longo das margens e para o interior da lâmina foliar entre as nervuras, e à medida que a concentração de F nas folhas aumentou, essa clorose se intensificou e se transformou em necrose de coloração palha (Figura 5e-g), seguida de abscisão foliar quando 50% da folha já estavam necrosadas.

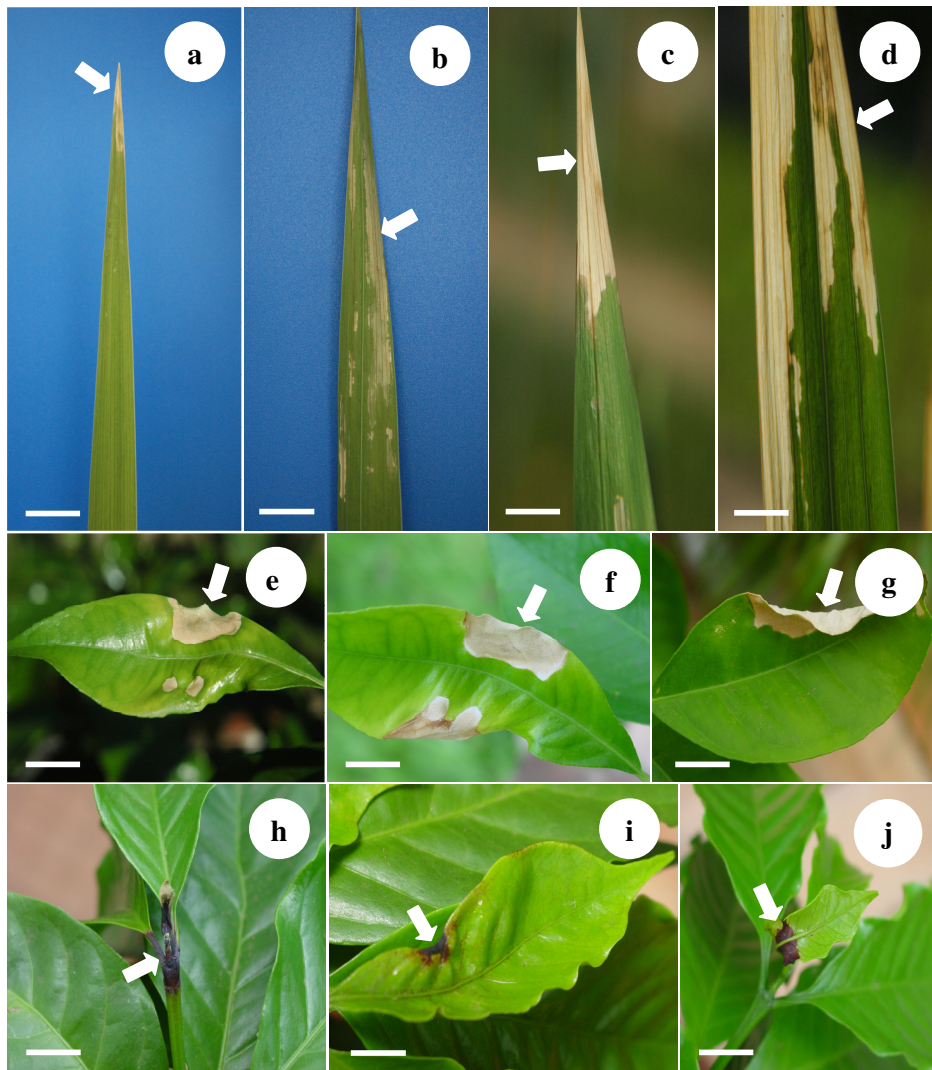


Figura 5. Sintomas de injúrias em folhas causadas pela exposição à alta dose de F em câmara de nebulização: a-d (barra = 0,2 cm): gladiolo - iniciando do ponteiro (→) e progredindo para o interior da folha (←); e-g (barra = 0,5 cm): citros - iniciando das margens (→) e progredindo para o interior da folha (←); h-j (barra = 0,2 cm): café - pedúnculo e folhas com manchas necróticas enegrecidas progredindo para o interior da folha (←).

Segundo BRYAN (1957) as fases iniciais de clorose pelo flúor em plantas de citros se assemelham a estágios iniciais de toxicidade por boro, porém quando o efeito é devido ao boro ocorre a excreção de resíduos nas folhas, o que não ocorre com a toxicidade pelo flúor. Além disso, o F causa o aparecimento de diferentes tons de verde nas folhas. Ainda segundo o autor, o elemento afeta o tamanho da folha, principalmente aquelas novas que depois apresentam queima dos bordos, seguida de abscisão. No café apareceram manchas enegrecidas no pecíolo e nas folhas novas (Figura 5h, i), também iniciadas pelas bordas e até o interior da lâmina foliar (Figura 5j). O azevém não manifestou qualquer sintoma visual devido à exposição ao F.

A descrição de sintomas em plantas de gladiolo foi feita por McLAUGHLIN & BARNES (1975), cujo aparecimento e progressão dos danos devido ao F foram similares aos observados nesse experimento. A ocorrência dessas necroses nas folhas de gladiolo foi responsável pela menor taxa fotossintética nessas plantas.

Os efeitos fitotóxicos sobre folhas em desenvolvimento devem-se provavelmente à ação do F na biossíntese de pigmentos fotossintéticos, que induzem distúrbios nos estágios iniciais da síntese de caroteno e de porfirina e, por conseguinte, da clorofila (OLIVA & FIGUEIREDO, 2005). Em plantas de *Hypericum perforatum*, as quantidades totais desses pigmentos sofreram redução levando ao surgimento de tecidos necrosados em algumas partes da folha (FORNASIERO, 2003). Também, é provável que a injúria foliar se encontre associada à alteração da matriz lipídica e sua relação com as proteínas solúveis da membrana, o que influencia funções metabólicas e altera a atividade de enzimas associadas, tais como as H⁺-ATPases (FAÇANHA & DE MEIS, 1995).

4.1.4 Microscopia de luz

As folhas do azevém que não foram expostas ao ambiente contaminado por F mostram epiderme uniestratificada com células de tamanhos variados. Na face adaxial, na região do feixe vascular, foram observadas células maiores. Nesta região, o mesofilo apresentou células do parênquima com arranjo laxo. Tais células se concentraram nas regiões periféricas, adjacentes à epiderme. O feixe vascular mostrou arranjo característico das gramíneas com células do xilema e do floema circundadas por uma bainha que se projetou até a epiderme através de uma única camada de células (Figura 6a) (ESAU, 1976).

Nas folhas de gladiolo, as células revelaram organização celular de arranjo compacto. Não se observou espaços intercelulares no mesofilo (Figura 6c). As células do parênquima clorofiliano mostraram forma alongada com a parede maior paralela à superfície foliar. Nas regiões dos feixes não se observou projeção como no azevém. O feixe vascular mostrou ainda uma bainha com células isodiamétricas que não se ligaram à epiderme. O feixe possuiu floema bicolateral sem a formação do desenho típico das gramíneas (ESAU, 1976).

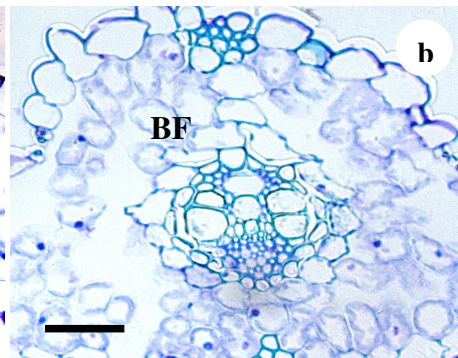
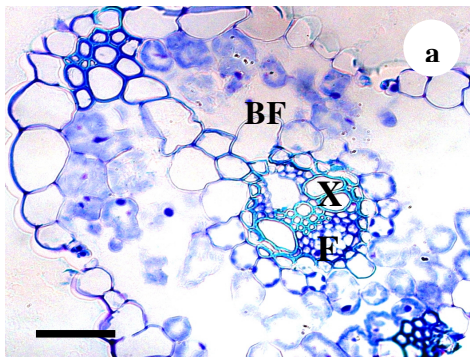
No corte transversal da folha de café (Figura 6e), o parênquima paliçádico mostrou-se constituído por uma única camada de células logo abaixo da epiderme adaxial das folhas, dispostas com seu eixo maior perpendicular à epiderme. Subsequente ao paliçádico encontrou-se o parênquima lacunoso, composto por 7 a 8 camadas de células dispostas ao acaso, com grandes espaços intercelulares.

Nos citros (Figura 6g) observou-se folha espessa de cutícula grossa com camada de cera. O parênquima paliçádico compacto em duas camadas contrastou com o parênquima esponjoso frouxo. O parênquima lacunoso, composto por 9 a 10 camadas de células grandes, continha muito espaço intercelular. Os feixes vasculares apresentaram-se circundados por uma bainha de células parenquimáticas.

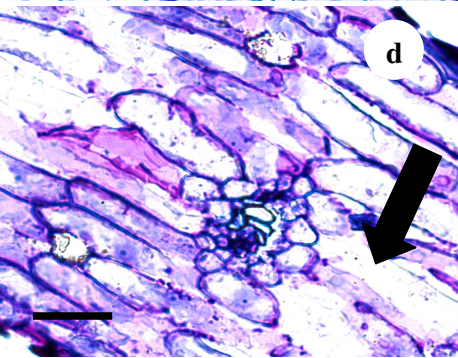
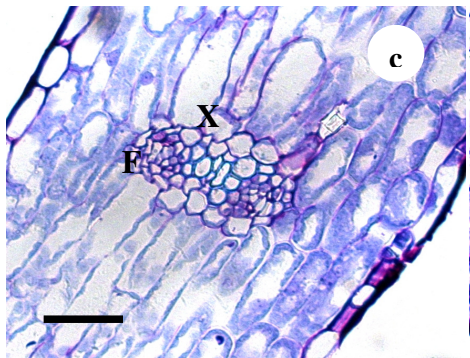
Figura 6. Secções transversais de folhas de plantas não exposta ao flúor (F) e expostas à maior dose do elemento obtidas sob microscopia de luz: a - azevém sem exposição ao F (barra = 25 μm) - parênquima clorofiliano com arranjo laxo; bainha do feixe com prolongamento até a epiderme adaxial; b - azevém exposto à alta dose de F (barra = 30 μm) - alteração nas células do parênquima paliçádico e lacunoso; epiderme pouco danificada; c - gladiolo não exposto ao F (barra = 19 μm) - parênquima clorofiliano com arranjo compacto e células com formas elípticas, com parede larga paralela à epiderme; d - gladiolo exposto ao F (barra = 25 μm), degeneração celular (seta); desestruturação das células da bainha do feixe, modificação na estrutura da parede celular; e - café não exposto ao F (barra = 17 μm) - com uma camada de parênquima paliçádico; parênquima clorofiliano disposto irregularmente; f - café exposto ao F (barra = 25 μm) - degeneração citoplasmática; acúmulo de substâncias fenólicas (seta); g - citros não exposto ao F (barra = 19 μm) - parênquima paliçádico formado por 8-10 camadas; parênquima lacunoso com células maiores, que se tornam menores e mais compactadas próximo a epiderme abaxial; h - citros exposto ao F (barra = 22) - alteração no parênquima paliçádico; afrouxamento do parênquima lacunoso. Legenda - bainha do feixe (BF), parênquima paliçádico (PP), parênquima lacunoso (PL), xilema (X), floema (F)

Controle (sem HF)

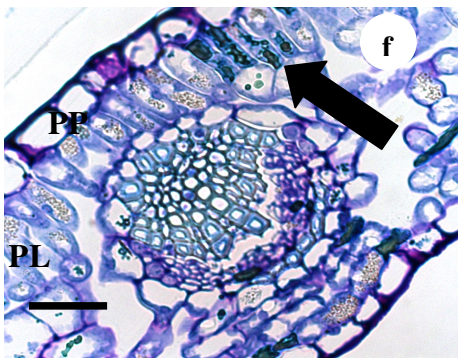
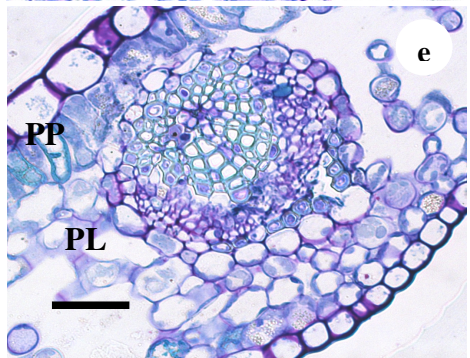
HF (0,16 mol L⁻¹)



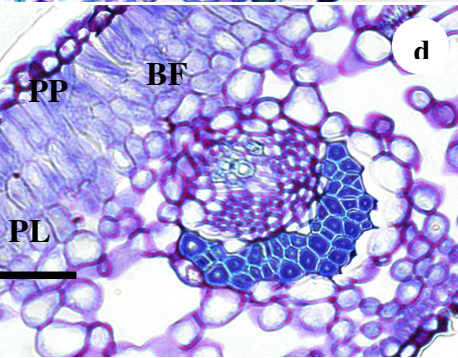
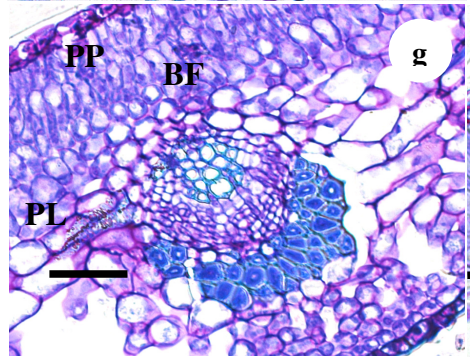
Azevém



Gladiolo



Café



Citros

Os danos anatômicos na lâmina foliar de azevém exposto a maior dose de HF consistiram em pequena perda no contorno celular, retração do parênquima lacunoso, com alguma degeneração do citoplasma (Figura 6b). A exposição à menor dose de HF para essa espécie não mostrou qualquer efeito aparente e os danos vistos em microscopia para o azevém submetido à maior dose do ácido foram muito menores comparados às outras espécies estudadas, principalmente do gladiolo e café, o que confirmou sua tolerância ao F.

Também no maior tratamento com HF as folhas de gladiolo apresentaram células da região vascular degeneradas com início de colapso, com desestruturação das células da bainha do feixe, mostrando forma e tamanho alterados (Figura 6d). As células apresentaram ainda modificações na estrutura da parede celular, quando comparada às células das plantas controle. Verificou-se que o arranjo entre as células tornou-se frouxo, além de mostrar degeneração citoplasmática intensa e colapso de parede em algumas células (seta), formando espaços vazios que não foram observados em plantas controle.

Nas folhas do cafeeiro notou-se aumento na intensidade da coloração, principalmente no citoplasma (Figura 6f). Tal fato sugere degeneração citoplasmática devido à oxidação de algumas substâncias e ao acúmulo de fenóis. O F se deposita na proximidade das terminações xilemáticas, o que explica o acúmulo de fenóis nessa região (seta), devido a ação do íon, e é interpretado como um mecanismo de defesa das plantas (VAUGHN & DUKE, 1984), e já foi relatado em outras espécies vegetais também expostas ao F (CHAVES et al., 2002; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007). Além disso, o feixe vascular mostrou-se intensamente degenerado, com células do floema e do xilema separadas, formando espaços que não foram observados nas plantas controle. Notou-se, também, que ocorre separação entre as células do xilema, sugerindo que a lamela média tenha sido degenerada.

Nas folhas de citros verificaram-se pequenas alterações no parênquima paliçádico (Figura 6h). Não se observou alteração do arranjo celular do parênquima lacunoso, mas o citoplasma apareceu alterado, assim como no paliçádico. Ocorreu separação entre algumas células devido a danos causados à lamela média responsável pela cimentação celular. Efeitos semelhantes na estrutura foliar foram encontrados por FORNASIERO (2003) em plantas de *H. perforatum*, colocadas em diferentes distâncias (1 km, 0,2 km, 0,05 km e 2,5 km) de um pólo emissor de F atmosférico.

A perda de densidade e o afrouxamento do arranjo das células evidenciado pela menor coloração dos tecidos parenquimáticos observados em plantas expostas à alta dose de F, possivelmente estão associados à disfunção causada sobre o Ca na planta (ALLMENDINGER, 1950; BEN ABDALLAH et al., 2006). Ainda, segundo esses autores, o F absorvido pelo tecido foliar reage com o Ca da planta para formar CaF_2 , cuja espécie química é relativamente insolúvel. GARREC et al. (1974) demonstraram que o gradiente normal de Ca^{2+} na planta é interrompido quando elas são expostas à poluição ambiental por esse elemento, o que de acordo com WEINSTEIN & DAVISON (2003) está relacionado à capacidade do F em complexar o Ca^{2+} da parede celular e da lamela média. Desta forma, os sintomas característicos da desordem causados pela deficiência de Ca^{2+} induzida pelo F são a desintegração das paredes celulares e o colapso dos tecidos.

Ainda, o cálcio é essencial em processos fisiológicos, como crescimento de tecidos meristemáticos, percepção de luz, ação de fitorreguladores e regulação estomática (SANDERS et al., 2002), os quais possivelmente foram afetados de forma indireta pela exposição das plantas ao F atmosférico.

4.1.5 Microscopia eletrônica de varredura

Com a microscopia eletrônica de varredura observou-se que as plantas controle de azevém apresentaram epiderme foliar formada por células alongadas e de tamanhos variáveis (Figura 7a e 8a). Os estômatos, em geral, formaram um arranjo linear paralelo às células epidérmicas. Todas as células apresentaram-se integras e sem ornamentação por cera. Os estômatos se localizaram no mesmo nível da epiderme. Já nas folhas do gladiolo a epiderme foliar se diferencia a do azevém (Figura 7c e 8c), por possuírem tricomas tectores em forma de esfera pedunculada e estômatos inseridos em cavidades com contorno retangular a um nível abaixo da epiderme. As células mostraram formas variadas, sendo algumas elípticas e outras tendendo a retangulares. A ornamentação por cera foi abundante nas células epidérmicas apresentando-se em forma de placas. A distribuição dos estômatos ocorreu ao acaso na epiderme.

Na epiderme foliar do cafeeiro das plantas controle as células apresentaram forma irregular com contorno sinuoso (Figura 7e e 8e). A região da junção das células formou sulcos que ressalta o contorno celular. Os estômatos apareceram distribuídos ao acaso e no mesmo nível das células epidérmicas.

Os citros também apresentaram células da epiderme foliar com forma variável e contorno regular (Figura 7g e 8g). A porção central das células é mais elevada em relação a região da junção celular. A ornamentação por cera apresentou-se com ondulação na parede celular. Os estômatos se apresentaram elevados em relação à epiderme.

Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de folhas das plantas não expostas ao flúor (F) e expostas à maior dose do elemento. a - azevém não exposto ao F (barra = 64 μm) - células guarda e epiderme íntegras e estômatos fechados; b - azevém exposto ao F (barra = 60 μm) - células guarda danificadas, maior deposição de cera na epiderme (seta), estômatos fechados (seta); c - gladiolo não exposto ao F (barra = 48 μm) - tricomas tectores abundantes localizados em nível inferior às células epidérmicas; estômatos fechados; d - gladiolo exposto ao F (barra = 42 μm) - sinuosidade das células epidérmicas (seta); severo aumento dos estômatos, que ficaram abertos; e - café não exposto ao F (barra = 37 μm) - células epidérmicas com coritórios sinuosos e estômatos íntegros fechados; f - café exposto ao F (barra = 35 μm) - deformação de células da epiderme com estômatos abertos e danificados; g - citros não exposto ao F (barra = 35 μm) - epiderme com ornamentação por cera; estômatos localizados em elevação e ostíolo protegido por expansão da parede e cutícula; h - citros exposto ao F (barra = 39 μm) - maior sinuosidade da epiderme reforço cuticular do ostíolo aberto e danificado .

Controle (sem HF)

HF (0,16 mol L⁻¹)

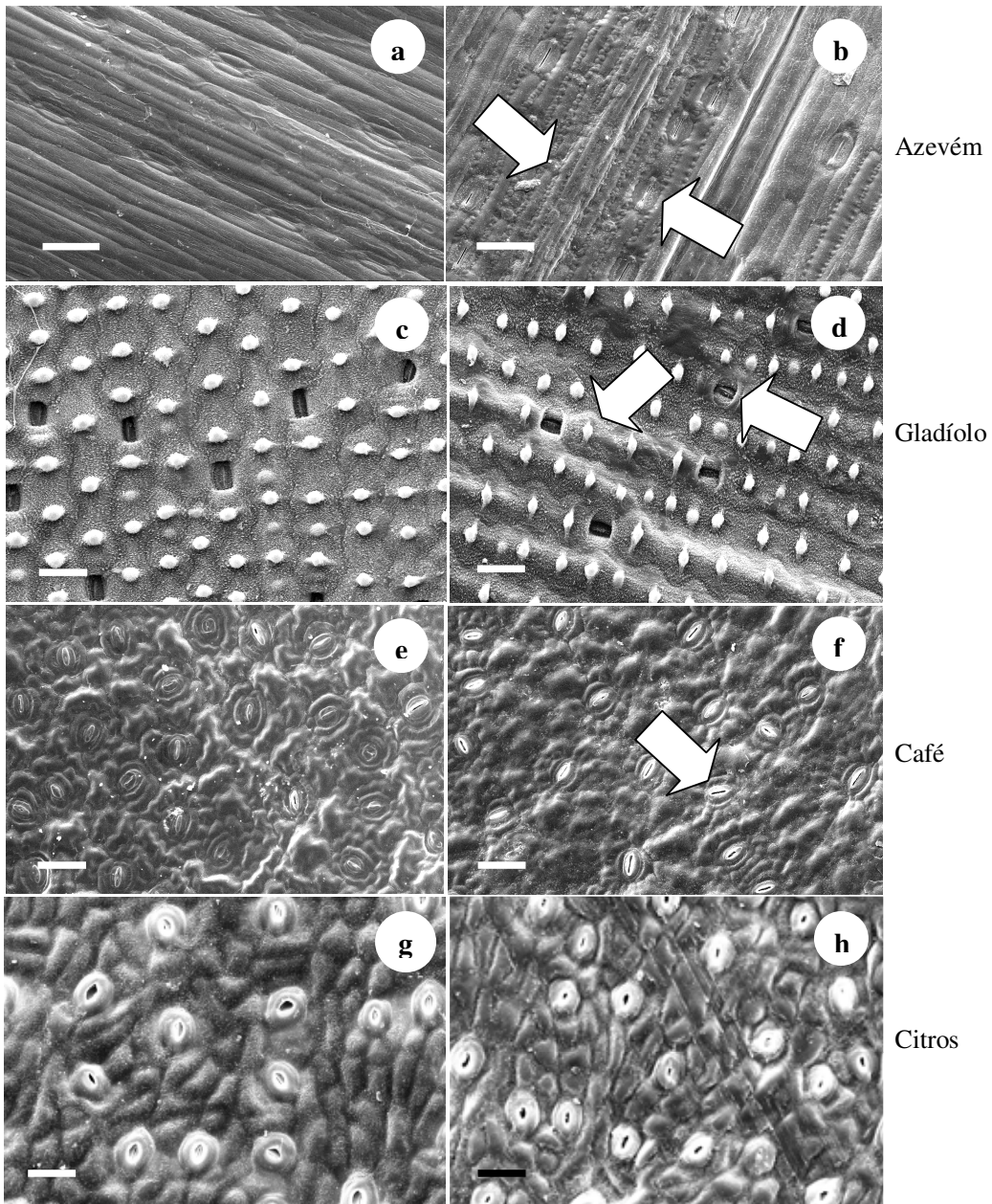
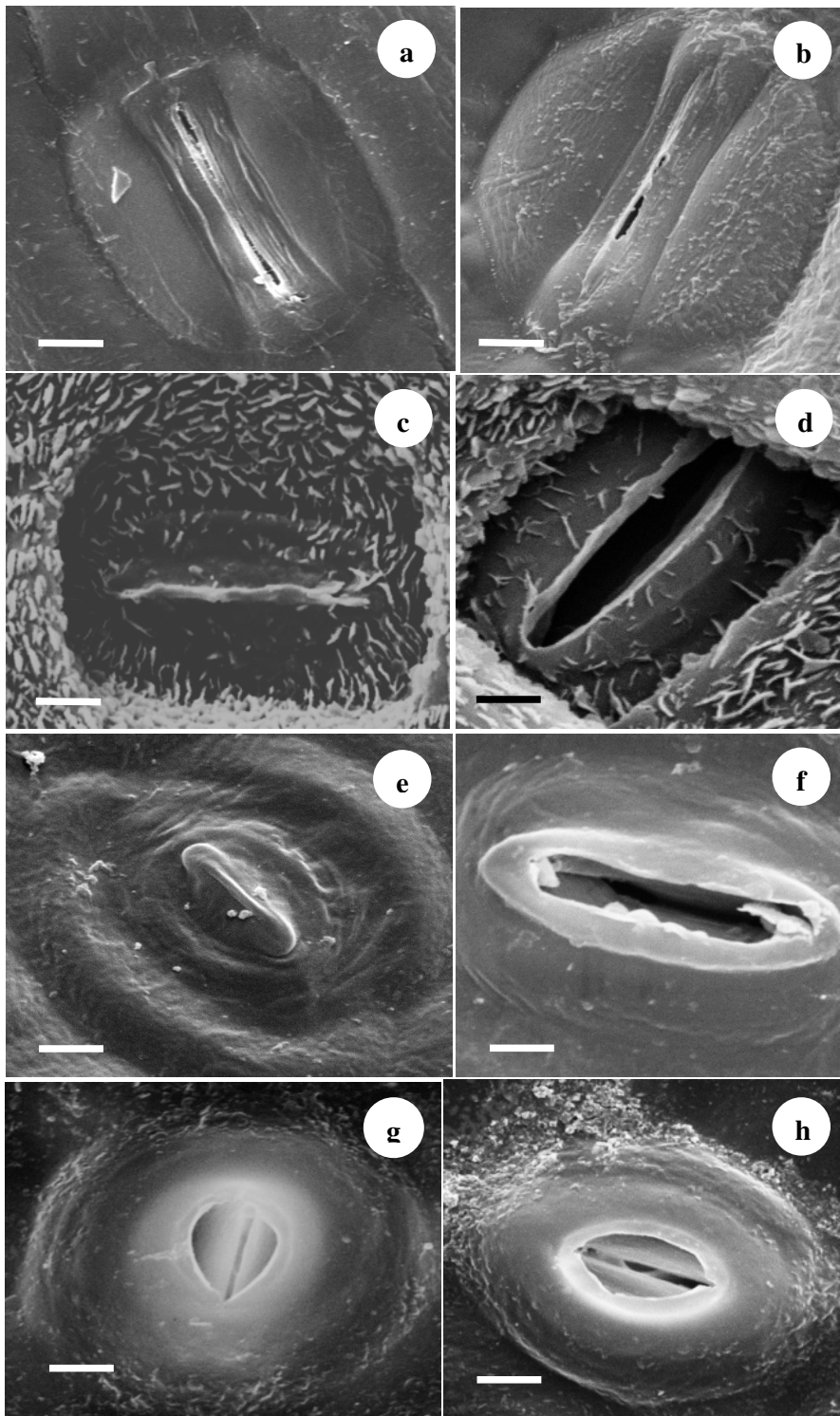


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura de folhas de plantas não expostas ao flúor (F) e expostas à maior dose do elemento. a - azevém não exposto ao F (barra = 2 μm) - ostíolo fechado; b - azevém exposto ao F (barra = 2,5 μm) - ostíolo permaneceram fechado; c - gladiolo não exposto ao F (barra = 1,3 μm) - deposição de cera em pequenas placas; d - gladiolo exposto ao F (barra = 1,04 μm) - severo aumento da ornamentação por cera epicuticular em placas verticais; e - café não exposto ao F (barra = 7 μm) - reforço cuticular suberificado no ostíolo; f - café exposto ao F (barra = 5,5 μm) reforço cuticular suberificado no ostíolo aberto e danificado; g - citros não exposto ao F (barra = 2,1 μm) - ostíolo com reforço cuticular suberificado e ostíolo fechado; h - citros exposto ao F (barra = 1,8 μm) - ostíolo com reforço cuticular suberificado e ostíolo aberto.

Controle (sem HF)

HF (0,16 mol L⁻¹)



Azevém

Gladiolo

Café

Citros

Em observações feitas em plantas de azevém tratadas com alta dose de HF, verificou-se que a quantidade de cera na superfície foliar ficou mais proeminente devido à pequena degeneração da parede celular, o que causou deformação na superfície (seta) (Figura 7b), com pequena deformação das células guarda (Figura 8b), que mantiveram o ostíolo fechado.

No gladiólo a degeneração das células da epiderme formou regiões com depressão (seta) onde não foi possível visualizar a região de limite entre as células (Figura 7d). Esta degeneração provocou a deformação das células ao redor da cavidade. Os estômatos ficaram abertos mostrando perda no controle de abertura e fechamento e quando visto em detalhe, notou-se aumento da densidade das placas de cera epicuticular (Figura 8d). No café, notou-se a mesma característica, de degeneração da parede, o que provocou a formação de regiões deprimidas (seta), não observadas nas plantas controle (Figura 7f). O ostíolo dos estômatos também ficou aberto o que pode ter facilitado a entrada de CO₂, justificando o aumento da assimilação nessas plantas (Figura 8f).

No citros ocorreu descamação da cera epicuticular provavelmente pela perda da integridade dos tecidos foliares (Figura 7h). Este fato pode explicar a alteração que leva as folhas de plantas sob a maior dose de F serem menos coriáceas ao tato, pela perda da rigidez (Figura 8h).

4.1.6 Produção de massa seca foliar

A produção de massa seca das folhas de azevém não sofreu efeito significativo entre o tratamento controle e o exposto às doses de HF (Figura 9a).

Por outro lado, o efeito das nebulizações com HF causou redução na produção de matéria seca nas folhas de gladiólo já na menor dose (0,04 mol L⁻¹ de HF). Para as plantas com maior concentração do F nas folhas a redução foi cerca de 25% com relação ao controle não exposto ao F (Figura 9b). Para o café a redução foi de 36%, e para essa espécie as plantas expostas à dose intermediária de HF não diferiram estatisticamente das plantas controle (Figura 9c). No cafeeiro a queda na produção de massa foliar ocorreu mesmo havendo aumento na assimilação de CO₂, provavelmente grande quantidade de carbono não foi utilizada para o desenvolvimento dessas plantas. Supõe-se que o carbono tenha sido desviado para alguma forma de composto fenólico produzido pelas plantas diante do estresse, tais como antocianinas, fazendo com que o aumento dessas substâncias coincida com o aparecimento de folhas avermelhadas (FORNASIERO et al., 2003). O citros não apresentou alteração na produção de massa

seca das folhas com a presença do F (Figura 9d). Nota-se que, segundo BREWER et al. (1969), o efeito da acumulação gradual de F nas folhas de citros é mais prejudicial no período de floração e produção de frutos.

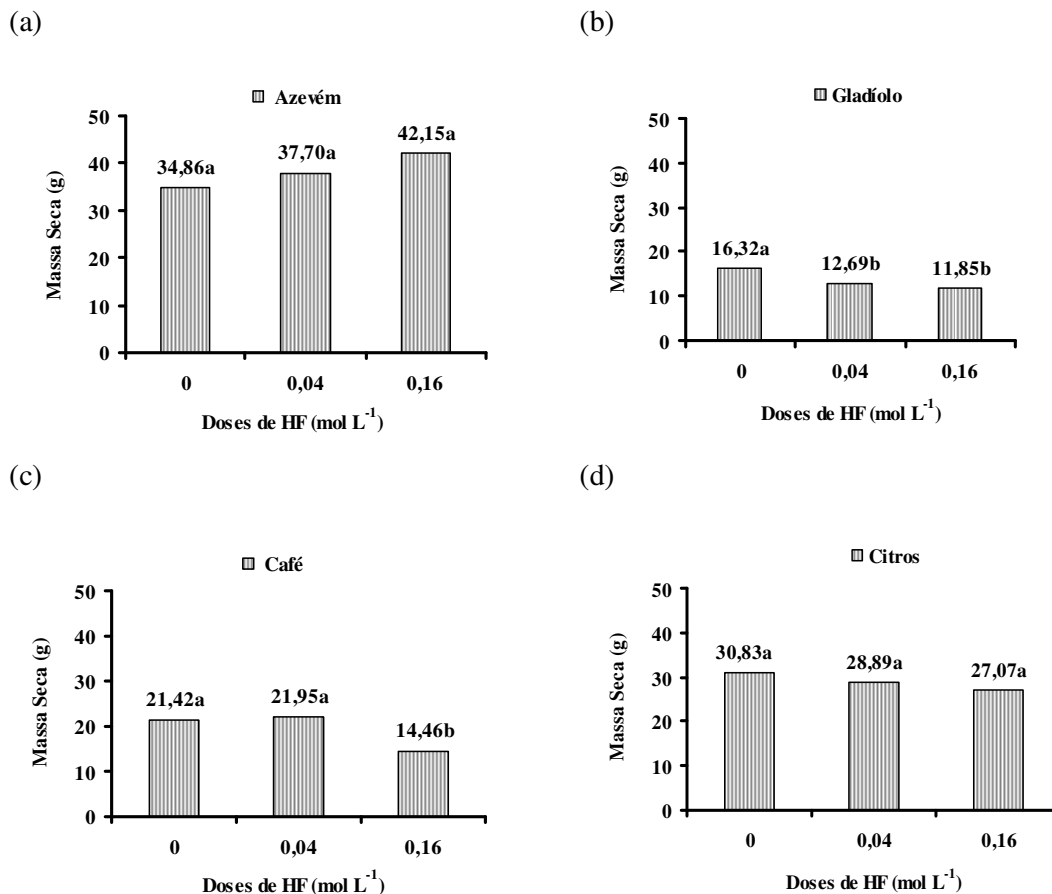


Figura 9. Efeito das doses de flúor das folhas de azevém, gladiolo, café e citros 28 dias após o início da exposição ao HF em câmara de nebulização. As médias seguidas por mesma letra nas colunas, para cada dose, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

4.1.7 Análise química de folhas e acúmulo de nutrientes minerais

Os teores de nutrientes minerais nas folhas das plantas estudadas mostraram poucas variações significativas em resposta à exposição controlada ao F (Anexo I a IV). Destacaram-se aumentos dos teores de Ca e Mg (25-40%) para o gladiolo e Ca (50%) para a laranjeira com o aumento das doses de HF de 0,16 mol L⁻¹ na câmara de nebulização em relação aos tratamentos controles. No caso do citros, o incremento de Ca foi acompanhado pela redução no teor K (Tabela 4). Para o azevém e o café, não

ocorreram variações que sugerissem variação no estado nutricional das plantas (Tabelas 1 e 3).

Diferenças no desenvolvimento e na produção das plantas, devido ao impacto da poluição do ar, podem influenciar os níveis foliares de nutrientes através dos efeitos de diluição ou concentração (KLUMPP et al., 2002). Assim, a análise nutricional se estendeu à estimativa do acúmulo de nutrientes nas folhas das plantas.

Embora não tenha ocorrido aumento da produção da massa seca foliar do azevém (Item 4.1.6), verificou-se tendência de aumento nas plantas expostas ao F, o que contribuiu para os efeitos significativos observados para o acúmulo dos nutrientes, com exceção do Fe (Tabela 1). O fluoreto não é reconhecido como elemento essencial, mas tem efeitos diretos e indiretos sobre o metabolismo da planta (MURRAY & WILSON, 1990), o que poderia explicar a maior fotossíntese para essas plantas, uma vez que a *A* não alterou com as doses de F (Figura 1). De forma contrária, a diminuição da produção de massa seca das folhas de café determinou a redução no acúmulo dos macronutrientes e micronutrientes, com exceção para Cu, Fe e Mn (Tabela 3). Isto ocorreu mesmo com o aumento da assimilação fotossintética, condutância estomática e transpiração das plantas (Figuras 2-4).

No caso do gladiolo e da laranjeira, verificaram-se aumentos no acúmulo de Ca nas folhas (Tabelas 2 e 4), cujos efeitos na produção de massa seca das folhas foram negativo ou nulo, respectivamente, em função da exposição ao F na câmara de nebulização. Outros nutrientes, como N, P, Mg, S e B sofreram efeitos similares. Não se identificou mecanismo específico que pudesse explicar essas variações, embora haja relatos na literatura que um dos fatores ligados à resistência de plantas ao F seja o estado nutricional (ARNDT et al., 1995). Como exemplo, o aumento no conteúdo de Ca pode ser um mecanismo de defesa da planta, que consiste na captura do fluoreto na forma de CaF_2 insolúvel, o que aponta para o papel deste elemento na desintoxicação do F (BEN ABDALLAH et al., 2006). Todavia, mesmo com o aumento dos teores do acúmulo de Ca nas folhas do gladiolo, este apareceu como mais sensível à toxicidade do F.

Tabela 1. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de azevém em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
mol L ⁻¹	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	866,7b	59,5b	252,7b	129,2b	181,0b	754,5b	282,7b	536,7b	2983,3	8504,5b	2868,5b	1231c
0,04	1123,2a	79,0a	318,0a	171,7a	233,7a	969,7a	461,2a	694,2a	3118,0	11404a	3853,8a	2985b
0,16	1261,2a	87,7a	325,7a	189,2a	254,0a	1030,7a	473,2a	713,2a	3485,3	12884a	3868,8a	8388a
Média	1083,7	75,42	298,83	163,42	222,9	918,3	405,7	648,08	3195,5	10930	3530	4201
Teste F ⁽¹⁾	14,02**	11,41**	4,45*	19,45**	14,5**	16,22**	6,71*	8,01*	0,70 ^{ns}	17,10**	7,55*	91,41**
CV, %	9,86	11,35	12,72	8,56	8,88	7,85	20,3	10,57	19,50	9,85	11,82	18,57

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Tabela 2. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de gladiolo em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
mol L ⁻¹	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	2239,5	88,5	333,7c	98,5b	109,2b	1379,5	2576,0b	430,0	3007,3	4318,0b	1390,0	191c
0,04	2244,5	98,7	453,0b	119,0ab	120,5ab	1413,3	3034,0b	446,7	3103,5	5453,5ab	1487,0	294b
0,16	2763,0	107,0	557,2a	138,0a	151,0a	1565,5	4910,0a	457,5	3125,0	6638,3a	1561,8	470a
Média	2415,7	98,2	448	118,5	126,9	1452,7	3506,7	444,7	3078,6	5469,9	1479,60	318,2
Teste F ⁽¹⁾	3,24 ^{ns}	1,63 ^{ns}	20,45**	4,11*	4,10*	0,60 ^{ns}	39,6**	0,18 ^{ns}	0,10 ^{ns}	9,73**	0,60 ^{ns}	24,26**
CV, %	10,88	15,16	11,04	16,44	16,81	17,54	11,20	14,69	12,88	13,60	15,06	18,04

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, respectivamente.

Tabela 3. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de café em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses HF mol L ⁻¹	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	655,7a	27,5a	326,5a	99,2a	54,2a	777,7a	1906a	147	2959	5699	178a	232c
0,04	591,5a	23,00a	301,5a	97,2a	51,5a	585,0b	1905a	145	2744	5120	166a	558b
0,16	399,0b	19,75b	229,2b	59,0b	37,2b	554,0b	1054b	109	2310	3890	119b	574a
Média	548,7	23,42	285,7	85,17	47,7	638,9	1621,9	134	2671	4903	154	455
Teste F ⁽¹⁾	17,98**	27,61**	9,37**	15,29**	16,43**	10,69**	52,48**	2,65 ^{ns}	1,95 ^{ns}	2,47 ^{ns}	12,46**	104,4**
CV, %	11,48	6,33	11,54	21,74	9,44	11,60	8,37	19,67	17,70	23,95	11,47	8,31

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, respectivamente.

Tabela 4. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de citros em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses HF mol L ⁻¹	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	518,7	50,5	611,0c	134,7	82,2c	822,0b	2055b	181	2761	2096	580	330c
0,04	451,7	53,5	941,2b	139,7	122,5b	1127,5a	2171ab	193	2099	2441	598	637b
0,16	426,0	56,7	1312,7a	143,5	161,7a	1141,2a	2987a	207	2098	2037	609	1237a
Média	465,46	53,58	955	140,3	122,17	1030,2	2404	194	2319	2191	595	734,8
Teste F ⁽¹⁾	2,30 ^{ns}	0,19 ^{ns}	31,76**	0,02 ^{ns}	19,25**	11,17**	12,47 ^{ns}	1,38 ^{ns}	2,17 ^{ns}	1,92 ^{ns}	1,84 ^{ns}	51,1**
CV, %	15,70	27,10	13,04	27,76	14,83	10,48	22,68	9,40	10,31	15,59	13,35	17,58

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, respectivamente.

O efeito do F atmosférico nas plantas foi pronunciado, com ocorrência de sintomas visuais da toxicidade nas folhas do gladiolo, bioindicadora sensível, mesmo na menor dose de HF ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$), e em citros e café na maior dose ($0,16 \text{ mol L}^{-1}$).

Esses sintomas nas folhas foram reflexos das alterações ocorridas na fisiologia e anatomia das plantas expostas ao F. Houve danos no sistema bioquímico da fotossíntese das plantas, possivelmente por inativação da rubisco, por ser ativada pelo Mg, elemento que se liga facilmente ao F, formando MgF_2 , prejudicando a assimilação de CO_2 principalmente para o gladiolo. Também ocorreram alterações do tecido foliar, com perda no contorno celular, retração do parênquima, degeneração do citoplasma, colapso das células, danos a região vascular e da bainha do feixe, conforme observado sob microscopia de luz (item 4.1.4). Essas alterações foram associadas aos prejuízos ocorridos sobre a estrutura dos estômatos, observado na microscopia eletrônica de varredura (item 4.1.5) e que tiveram consequências nas medidas de trocas gasosas, com exceção do azevém e do citros (item 4.1.2). No café não houve limitação estomática no processo de fotossíntese, e mesmo que tenha havido aumento na assimilação de CO_2 durante o período de exposição ao F devido a maior condutância estomática, as plantas apresentaram queda na produção. Esses danos foram maiores nos tratamentos com a maior dose do F ($0,16 \text{ mol L}^{-1}$).

Variações sobre os teores de nutrientes minerais ocorreram para todas as plantas estudadas, com destaque para o aumento das concentrações de Ca e Mg nas folhas, principalmente para o gladiolo e citros, enquanto que o acúmulo dos nutrientes variou principalmente com o aumento ou diminuição da produção de massa seca das folhas, tendo efeito de diluição ou concentração dos nutrientes.

4.1.8 Flúor no solo

Não houve acréscimos de F no solo em função das nebulizações com HF (Prob. $F > 0,05$). O teor médio para amostras coletadas no início e no final do experimento foi de $223 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$ de F. O solo normalmente não é uma fonte de níveis tóxicos de F para a maioria das plantas, uma vez que ocorre formação de complexos de Al com F (WEINSTEIN & DAVISON, 2004). Essa formação de complexos aparece como importante forma para atenuar os efeitos tóxicos de Al sobre o desenvolvimento radicular, uma vez que o AlF_x apresenta menor fitotoxicidade às plantas do que Al^{+3} (CAMERON et al., 1986; RAIJ, 2008).

4.2 Experimento II: Respostas de Variedades de Citros e Café à Exposição ao Flúor Atmosférico

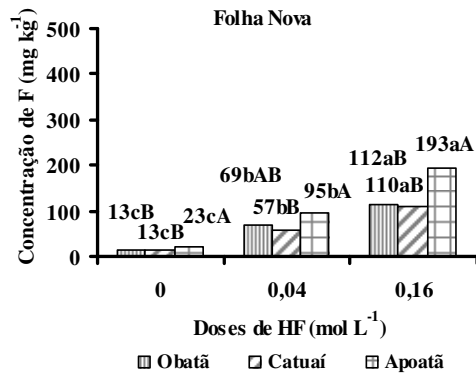
4.2.1 Teores de flúor nas folhas

A determinação do teor de F nas folhas indicou aumento da concentração do íon nas espécies estudadas, e esse aumento se deu em maior proporção quando comparado aos teores obtidos nas plantas do Experimento I (Figura 1 e 10). Esse efeito deveu-se a exposição das plantas ao ambiente contaminado por maior período, sendo conduzidas por 57 dias em casa de vegetação, ao contrário do experimento anterior que foi 28 dias, mostrando o efeito acumulador do elemento no tecido foliar.

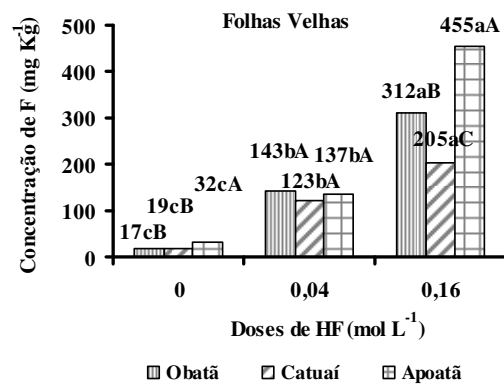
As variedades de café foram afetadas diferencialmente pelas doses de HF (Figura 10a, b), as maiores concentrações ocorreram nas folhas velhas, com maior valor para a variedade Apoatã, 455 mg kg⁻¹, seguida de Obatã, 312 mg kg⁻¹, e por último Catuaí, 205 mg kg⁻¹. Também, verificou-se interação entre espécies e doses para as plantas cítricas (Figura 10). As maiores concentrações de F ocorreram, em sua totalidade, nas folhas novas (Figura 10c), sendo o limoeiro o maior acumulador de F dentre as espécies cítricas utilizadas. Quando as espécies de citros foram nebulizadas com a maior dose, as concentrações nas folhas novas e velhas foram 243 mg kg⁻¹ e 190 mg kg⁻¹, respectivamente (Figura 10c, d). Laranja e tangerina não apresentaram diferenças significativas na concentração de F nas folhas velhas, porém nas folhas novas a tangerineira concentrou maior quantidade, 186 mg kg⁻¹, enquanto que na laranjeira foi 135 mg kg⁻¹, mostrando menor acúmulo dentre as espécies estudadas.

Comparando citros e cafeeiros quanto ao acúmulo de F, os maiores teores do elemento nas plantas de citros ocorreram nas folhas novas, enquanto que para as variedades de café os maiores teores foram notados nas folhas velhas. Essa diferença pode ter ocorrido pela anatomia mais sensível das folhas novas de citros, por terem menor espessura e quantidade de cera nessa fase e se tornam mais resistentes a fatores externos com a maturidade, já as folhas novas de café não diferem tanto na anatomia com a maturidade, o que facilitou esse acúmulo com as exposições.

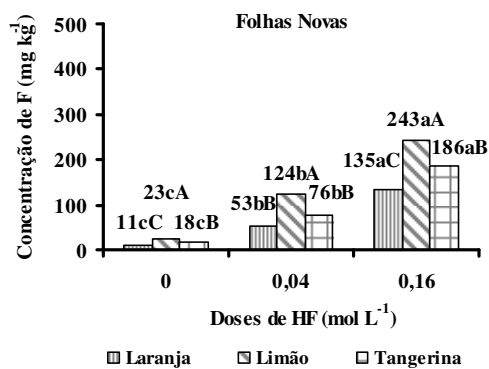
(a)



(b)



(c)



(d)

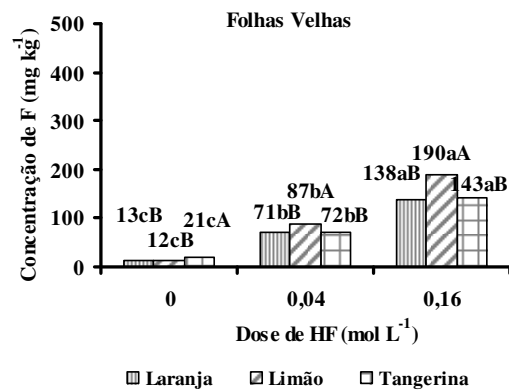


Figura 10. Teores de F nos tecidos vegetais de plantas de citros e café. As médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente para dose e maiúscula na linha para variedade, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

A quantidade de F acumulado e o grau de injúria nos tecidos podem variar com a idade da folha (SILVA et al., 2000), tempo de exposição e capacidade de absorção da espécie (VIKE, 1999). Segundo COULTER et al. (1985), o F se acumula nos tecidos na forma solúvel e inorgânica (F⁻), causando lesões quando altas concentrações são atingidas, sendo, portanto, um poluente de natureza cumulativa. Segundo WEINSTEIN & DAVISON (2004), teores de F no tecido foliar ao redor de 5-10 mg kg⁻¹ são considerados comuns, dada a quantidade natural de F que ocorre na atmosfera.

Essa diferença de teores de F nas plantas, expostas por um mesmo período de tempo e com a mesma concentração no ambiente contaminado, está relacionada a fatores morfológicos (pubescência e cerosidade) e fisiológicos (maior ou menor condutância estomática) que facilitam ou não a absorção do íon (JACOBSON et al., 1996). A quantidade de F acumulada pelas plantas e a severidade dos danos provocados por esse poluente depende, dentre outros fatores, da suscetibilidade geneticamente determinada, de fatores climáticos e edáficos, da interação entre poluentes, tempo de exposição e do estágio de desenvolvimento da planta (TRESHOW & ANDERSON 1989). A influência desses fatores entre as espécies analisadas, principalmente quanto à suscetibilidade genética foi evidenciada, pois o comportamento das variedades foi diferente tanto em relação aos sintomas quanto a quantidade de F acumulada. Não somente espécies, mas variedades ou cultivares de uma mesma espécie apresentam diferenças quanto ao grau de susceptibilidade ao F (WEINSTEIN, 1977; OLIVA & FIGUEIREDO, 2005).

4.2.2 Trocas gasosas

A assimilação de CO₂ (*A*) para as plantas de café mostrou diferenças entre variedades estudadas nos dois períodos avaliados. Os valores de *A* nas plantas controle foram similares à faixa de variação para cafeeiros, que está entre 2,5 μmol m⁻² s⁻¹ a 6 μmol m⁻² s⁻¹ (ALFONSI et al., 2005). A variedade Apoatã apresentou o menor valor de *A* quando as plantas não foram expostas ao F, porém foi a única variedade que não sofreu efeito da exposição ao F em qualquer dos períodos de avaliação (Tabela 5). O cafeeiro Obatã demonstrou redução em *A* quando submetido à nebulização com F nas duas avaliações do dia em relação ao controle, com redução de 42% e 22% nos períodos da manhã e da tarde, respectivamente (Tabela 5). O cafeeiro Catuaí mostrou redução de 50% em *A* pela manhã, naquelas nebulizadas com a maior dose de HF, enquanto que no período da tarde não houve efeito do tratamento para essa variedade (Tabela 5). O incremento da concentração de F nas folhas das variedades de café estudadas foi correspondente às doses de HF aplicadas, que teve esse efeito refletido pela queda na fotossíntese e conseqüente redução na produção das plantas com o aumento das doses (item 5.2.7).

Tabela 5. Efeito da nebulização com HF na assimilação de CO₂ em variedades de café em dois períodos do dia: Obatã, Catuaí e Apoatã.

Doses de HF mol L ⁻¹	Assimilação de CO ₂ (l)			Média
	Obatã	Catuaí	Apoatã	
	----- μmol m ⁻² s ⁻¹ -----			
	Manhã			
0	5,50 a A	5,82 a A	4,59 B	4,90
0,04	4,96 b A	4,73 b A	4,20 B	4,07
0,16	3,18 c B	2,89 c B	4,30 A	3,84
Média	4,55	4,48	4,03	-
Teste F				
Variedade (V)				4,87*
Dose (D)				22,68**
V x D				28,12**
	Tarde			
0	5,63 a A	6,40 A	3,40 B	6,37
0,04	4,54 b A	6,05 A	3,06 B	5,76
0,16	4,38 b B	6,30 A	3,11 C	6,16
Média	4,85	6,26	3,19	-
Teste F				
Variedade (V)				21045**
Dose (D)				0,88 ^{ns}
V x D				11,01**

(^l) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5% pelo teste de Duncan, respectivamente.

As médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente para dose e maiúscula na linha para variedade, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

As espécies cítricas apresentaram diferenças sobre a variável *A* na presença do HF somente nas medições realizadas durante a manhã (Tabela 6), cujos valores se apresentaram similares à faixa de variação constante na literatura para citros, 8 μmol m⁻² s⁻¹ a 12 μmol m⁻² s⁻¹ (RIBEIRO et al., 2007). Na ausência de HF, as plantas de laranja e de limão apresentaram valores médios similares de *A* pela manhã, e menores do que aqueles observados para a tangerineira. A laranjeira não apresentou efeito sobre *A* no período da manhã, já no período da tarde a queda foi de 55% nas plantas sob a maior dose de HF (Tabela 6). O limoeiro apresentou maior valor de *A* nas plantas não expostas ao F nos dois períodos avaliados, com redução de 23% nas plantas expostas a maior dose. Já no período da tarde a redução em *A* foi de 16% na dose intermediária e 14% na maior dose de HF (Tabela 6). As plantas de tangerina mostraram redução em *A* nas duas avaliações do dia, de 28% e 25%, nos períodos manhã e tarde, respectivamente (Tabela 6). No período da tarde, a exposição à menor dose de HF foi suficiente para promover redução de *A* nas três espécies, porém mais expressivo para a laranjeira e limoeiro. A concentração de F nas folhas das espécies cítricas foi crescente e de acordo com a dose

nebulizada nas plantas (item 4.2.1), tendo como consequência alterações em A, principalmente para o limoeiro que apresentou queda na produção nas plantas nebulizadas com a maior dose de HF (item 4.2.7)

Tabela 6. Efeito da nebulização com HF na assimilação de CO₂ em espécies de citros em dois períodos do dia: laranja, limão e tangerina.

Doses de HF mol L ⁻¹	Laranja	Limão	Tangerina	Média
	Assimilação de CO ₂ (¹) ----- μmol m ⁻² s ⁻¹ -----			
	Manhã			
0	10,59 B	11,40 a A	11,22 a A	11,07
0,04	10,91 A	9,40 b B	9,37 b B	9,89
0,16	10,27 A	8,76 c B	8,03 c B	9,02
Média	10,69	10,02	9,54	-
Teste F				
Variedade (V)				3,72*
Dose (D)				9,47**
V x D				17,22**
	Tarde			
0	4,64	9,84	7,91	7,46 a
0,04	2,55	8,28	5,73	5,52 b
0,16	2,07	8,51	5,90	5,49 b
Média	3,08 C	8,88 A	6,51 B	-
Teste F				
Variedade (V)				479,29**
Dose (D)				71,98**
V x D				2,06 ^{ns}

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5% pelo teste de Duncan, respectivamente.

As médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente para dose e maiúscula na linha para variedade, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Houve interação nos dois períodos para a variável g_s nas plantas de café. A variedade Obatã apresentou maior g_s nas plantas controle, e foi também a que mais sofreu redução com o aumento das doses de HF, em 75% pela manhã, e 17% à tarde (Tabela 7). Já para a Catuaí houve relação inversa entre essas variáveis pela manhã, enquanto A reduziu, g_s teve acréscimo de 50% na maior dose de HF pela manhã e redução de 24% à tarde (Tabela 7). A Apoatã apresentou redução nos dois períodos avaliados, de 33% pela manhã e 40% à tarde (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito da nebulização com HF na condutância estomática (g_s) em variedades de café dois períodos do dia: Obatã, Catuaí, Apatã.

Doses de HF mol L ⁻¹	Condutância estomática (¹) mol m ⁻² s ⁻¹			Média
	Obatã	Catuaí	Apatã	
Manhã				
0	0,130 a A	0,030 c C	0,050 a B	0,070
0,04	0,060 b A	0,040 b B	0,040 a B	0,050
0,16	0,032 c B	0,060 a A	0,030 b B	0,040
Média	0,078	0,044	0,040	-
Teste F				
Variedade (V)				139,21**
Dose (D)				140,12**
V x D				158,82**
Tarde				
0	0,060 a B	0,070 b B	0,091 a A	0,046
0,04	0,050 b C	0,092 a A	0,060 b B	0,067
0,16	0,050 b C	0,070 b A	0,061 b B	0,060
Média	0,050	0,070	0,07	-
Teste F				
Variedade (V)				206,2**
Dose (D)				52,25**
V x D				9,71**

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5% pelo teste de Duncan, respectivamente.

As médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente para dose e maiúscula na linha para variedade, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Houve interação sobre g_s para as variedades de citros nos dois períodos avaliados. As plantas controle de laranja e limoeiro mostraram valor médio 34% maior que o da tangerineira, 0,135 mol m⁻² s⁻¹ das primeiras e 0,089 mol m⁻² s⁻¹ das plantas de tangerina no período da manhã (Tabela 8). Esse efeito pode ter relação com o acúmulo de F nas folhas dessas plantas, facilitando a absorção do elemento nas folhas (Tabela 8). No período da tarde, o aumento das doses de HF causou queda de 50% em g_s para as plantas de laranja e limão, apresentando a mesma tendência que A (Tabela 8). A tangerina aumentou 38% o valor de g_s pela manhã, e reduziu 33% esse valor à tarde (Tabela 8).

Tabela 8. Efeito da nebulização com HF na Condutância estomática (g_s) em espécies de citros dois períodos do dia: laranja, limão e tangerina.

Doses de HF mol L ⁻¹	Laranja	Limão	Tangerina	Média
	Condutância Estomática (¹) mol m ⁻² s ⁻¹			
Manhã				
0	0,142 A	0,129 A	0,089 a B	0,121
0,04	0,131 A	0,129 A	0,102 b A	0,121
0,16	0,121 A	0,123 A	0,134 b A	0,125
Média	0,131	0,127	0,069	-
Teste F				
Variedade (V)				5,63*
Dose (D)				0,33 ^{ns}
V x D				3,97*
Tarde				
0	0,040 a C	0,123a A	0,091 a B	0,840
0,04	0,029 b B	0,064 b A	0,058 b A	0,051
0,16	0,021 c B	0,060 b A	0,059 b A	0,047
Média	0,030	0,082	0,07	-
Teste F				
Variedade (V)				247,14**
Dose (D)				140,47**
V x D				20,53**

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5% pelo teste de Duncan, respectivamente.

As médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente para dose e maiúscula na linha para variedade, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Para as variedades de café, a transpiração nas plantas controle foi maior para a variedade Catuaí nos dois períodos avaliados do dia. Catuaí e Obatã tiveram redução em E de 34% e 40%, respectivamente, pela manhã com o aumento das doses de HF, e de 26% e 21% no período da tarde (Tabela 9). No cafeeiro Apoatã o valor de E foi reduzido em 28% no período da manhã nas plantas expostas à concentração de 0,16 mol L⁻¹ de HF, não tendo efeito significativo à tarde (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito da nebulização com HF na Transpiração (E) em variedades de café dois períodos do dia: Obatã, Catuaí, Apoatã.

Doses de HF mol L ⁻¹	Transpiração (¹)			Média
	Obatã	Catuaí	Apoatã	
	----- mmol m ⁻² s ⁻¹ -----			
	Manhã			
0	1,28 a B	1,48 a A	1,10 a C	0,110
0,04	0,74 b B	1,45 a A	1,17 a AB	0,130
0,16	0,78 b B	0,98 b A	0,84 b B	1,020
Média	0,93	1,29	1,03	-
Teste F				12,61**
Variedade (V)				16,23**
Dose (D)				1,56 ^{ns}
V x D				16,32**
	Tarde			
0	1,60 a B	2,19 a A	1,20 B	1,66
0,04	1,20 b B	1,75 b A	1,23 B	1,39
0,16	1,26 b B	1,62 b A	1,15 B	1,34
Média	1,36	1,85	1,19	-
Teste F				17,32**
Variedade (V)				50,19**
Dose (D)				4,78*
V x D				7,15**

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5% pelo teste de Duncan, respectivamente. As médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente para dose e maiúscula na linha para variedade, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

As três espécies de citros não foram afetadas diferencialmente pelas doses de HF no período da manhã. Houve aumento da transpiração nas plantas expostas à maior concentração de HF (Tabela 10). No entanto, à tarde ocorreu interação entre espécie e dose e observou-se redução de E nas plantas expostas ao maior nível de contaminação por F para as três espécies (Tabela 10). Essa redução no período da tarde pode ser devido ao fechamento estomático nas horas mais quentes do dia, para evitar perda excessiva de água pela planta, já que o F não afetou o metabolismo dessas plantas (MACHADO et al., 2007).

Tabela 10. Efeito da nebulização com HF na transpiração (E) em espécies de citros dois períodos do dia: laranja, limão e tangerina.

Doses de HF mol L ⁻¹	Transpiração (¹)			Média
	Laranja	Limão	Tangerina	
	mmol m ⁻² s ⁻¹			
	Manhã			
0	1,52	1,18	1,41	1,37 b
0,04	2,68	3,22	2,54	2,81 a
0,16	4,58	2,58	3,23	3,46 a
Média	2,93A	2,33A	2,39A	-
Teste F				
Variedade (V)				0,43 ^{ns}
Dose (D)				9,16**
V x D				1,17 ^{ns}
	Tarde			
0	1,26 a B	3,07 a A	2,36 a A	1,37
0,04	0,89 b B	1,95 b A	0,69 c C	1,18
0,16	0,76 b C	1,88 b A	1,09 b B	124
Média	0,970	2,30	1,38	-
Teste F				
Variedade (V)				305,95**
Dose (D)				229,16**
V x D				25,53**

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5% pelo teste de Duncan, respectivamente.

As médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente para dose e maiúscula na linha para variedade, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Assim como no Experimento I, o tratamento com F no Experimento II não apresentou efeito sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila nas plantas café e citros, com valores de F_v/F_m de $0,86 \pm 0,03$. Portanto, o sistema fotoquímico da fotossíntese não foi afetado nessas plantas.

Como já reportado no experimento I os efeitos do F sobre as trocas gasosas estão diretamente ligados aos sintomas visuais, e os prejuízos à fotossíntese são proporcionais à lesão que as plantas apresentam principalmente em função do decréscimo da área fotossinteticamente ativa e também da ação do F na biossíntese de pigmentos fotossintéticos, o que está diretamente relacionado com a concentração da enzima carboxilase, que pode limitar a fotossíntese quando sua ação é interrompida.

Diferentes comportamentos para as variáveis de trocas gasosas também foram documentadas entre variedades/espécies de plantas quando expostas a outros contaminantes atmosféricos, como ozônio (O₃) (EISSENSTAT et al., 1991; IGLESIAS et al., 2006; SODA et al., 2000), dióxido de enxofre (SO₂) (OLSZYK et al., 1990), além de outros fatores abióticos que causam estresse em plantas, como salino (LLOYD et al.,

1989), hídrico (CERQUEIRA et al., 2004) e por excesso de alumínio (KONRAD et al., 2005).

Apesar de limitado os estudos varietais perante a contaminação com F, os resultados desse trabalho apontaram para a maior sensibilidade do limoeiro e do café Obatã dentre as espécies e variedades estudadas, pois se mostraram mais susceptíveis aos danos causados pelo F.

A única espécie de citros que apresentou sintomas visuais e menor produção de massa seca de folhas com a exposição ao F foi o limoeiro, a qual também apresentou menores valores de A com aumento das doses de HF nos dois períodos avaliados, além de aparente redução no número de cloroplastos e colapso celular.

O café Obatã, apesar de não ter apresentado sintomas visuais com a exposição ao F nesse Experimento, foi a variedade que mostrou maior redução de A com aumento das doses de HF, com maior acúmulo de material fenólico no parênquima paliádico, colapso celular, alteração no formato dos cloroplastos e do citoplasma das células (visto em microscópio de luz e MET; itens 4.2.4 e 4.2.5), comprovando o estresse que as plantas sofreram, o que pode ter contribuído para maximizar o dano ao sistema fotossintético dessas plantas. Alterações no formato dos cloroplastos também foram observados por WEI & MILLER (1972) e SANT'ANNA-SANTOS et al. (2006) em plantas expostas a contaminação por F. Segundo MILLER (1993), os cloroplastos são as organelas mais acumuladoras de fluoreto e tem sido citadas como as mais afetadas pela ação do poluente. PARRY et al. (1984) mostraram que concentrações de 200 mg kg⁻¹ de F no tecido foliar, resultaram em inibição da ação da rubisco, por reagir com metais ativadores da enzima, como o Mg, Mn, Co e Ni (NILSSON & BRADEN, 1983).

É provável que plantas resistentes ou tolerantes a estresses abióticos tenham capacidade de manter a integridade do sistema metabólico sem danos (TAYLOR & TINGEY, 1982). Assim aquelas adaptadas ao estresse devem possuir estrutura genética que confira homeostase suficiente para compensar efeitos da poluição no metabolismo, ou seja, as plantas teriam sistemas metabólicos com grande segurança operacional em termos de energia ou capacidade enzimática para manter a integridade e equilíbrio fisiológico e anatômico. Sendo assim plantas que possuem elevada flexibilidade metabólica para se manter em condições extremas teriam maior capacidade para mitigar o rompimento do metabolismo induzida por fatores abióticos (WILSON, 1995).

4.2.3 Sintomas visuais da toxicidade de flúor

Após três semanas de nebulizações, as plantas de limão nebulizadas com a maior dose de HF manifestaram clorose na região marginal das folhas novas, que se tornaram mais tenras e à medida que eram expostas ao ambiente contaminado, os sintomas progrediram para necrose, de coloração palha, e após alguns dias causava abscisão foliar, o que pode ser um mecanismo de defesa da planta ao acúmulo de F (Figura 11a-d). Sintomas similares foram observados por SILVA et al. (2000) em *Gallesia gorazema*, *Genipa americana*, *Joannesia princeps*, *Peltophorum dubium* e *Spondia dulcis* e por SANT'ANNA-SANTOS et al. (2007) em *Magnolia ovata*.

Das espécies cítricas estudadas nesse experimento o limão se mostrou a mais sensível ao F, por ter sido a única a manifestar sintomas visuais em folhas em desenvolvimento, e por ter apresentado queda na produção de massa seca da parte aérea nas plantas nebulizadas com a maior dose de HF, além de ter sido a espécie com maior concentração e acúmulo de F nas folhas (item 4.2.1).

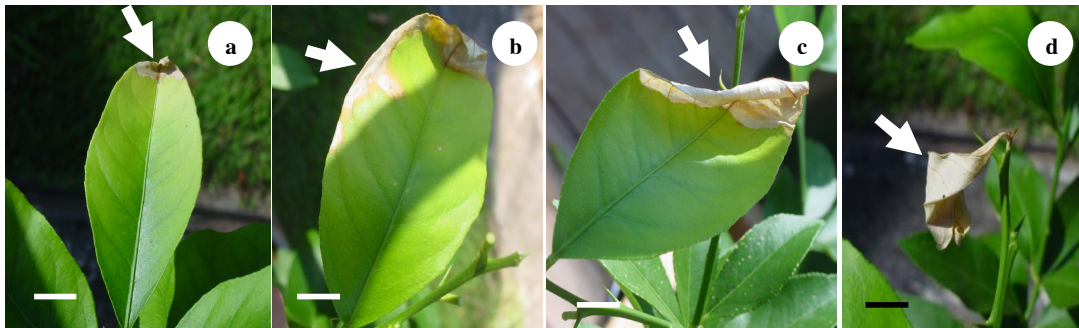


Figura 11. Sintomas visuais em folhas de gladiólo e limão em decorrência das nebulizações com alta dose de HF, iniciando do ponteiro das folhas em gladiólo (a) (barra = 0,2 cm), e progredindo para o interior da folha (b-e) (barra = 0,4 cm). No citros iniciando-se das margens foliares (e) (barra = 0,2), e progredindo para o interior da folha (f-i) (barra = 0,3).

4.2.4 Microscopia de luz

A coloração verde conferida pelo azul de toluidina no corte transversal do café Obatã (seta) provavelmente seja consequência da ruptura da membrana vacuolar e liberação de compostos fenólicos, seguida de intensidade da coloração e degradação do citoplasma observado ao microscópio de luz (ZOBEL & NIGHSWANDER, 1991) (Figura 12b), efeitos esses também observados para essa mesma espécie no Experimento I. O F provavelmente depositou-se na proximidade das terminações xilêmicas, o que explica o acúmulo de fenóis nessa região, e sugere a ocorrência de um mecanismo de

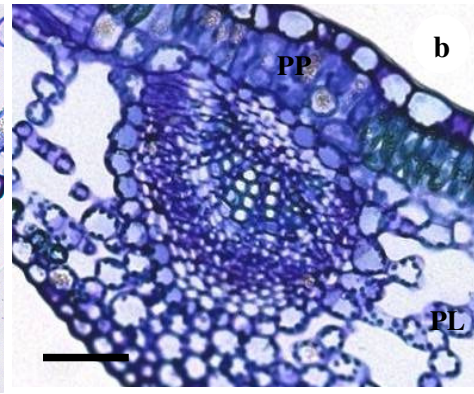
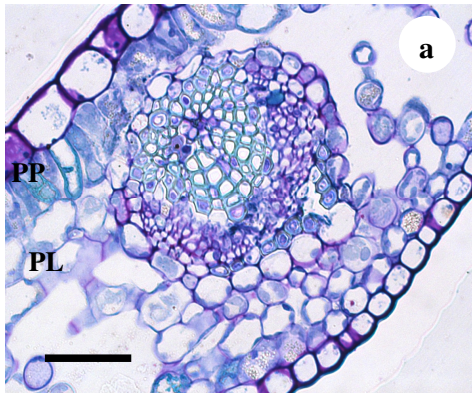
defesa das plantas (VAUGHN & DUKE, 1984; CHAVES et al., 2002; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2007). No café Catuaí observou-se compactação das células do floema e do xilema, alterando o formato da bainha do feixe. Houve espaços entre células, que provavelmente caracterizam danos à parede celular e à lamela média (Figura 12d). No café Aipoatã observou-se aumento nos espaços intercelulares do parênquima lacunoso em comparação com as plantas controle. As células do floema perderam o formato arredondado, ficando mais angulosas e as células do xilema ficaram degeneradas (Figura 12f).

O F ocasionou danos nas células epidérmicas nas espécies de citros avaliadas, além de alterações micromorfológicas na lâmina foliar, mesmo nas plantas que não manifestaram sintomas visuais, ou queda na massa seca de folhas. Na laranja observou-se pequena alteração no parênquima paliçádico e lacunoso, com pequena perda na coloração, indicando degeneração no citoplasma (Figura 13b). No limoeiro, além de alteração nas células do parênquima paliçádico, houve degeneração das células do xilema e do floema, o que provocou a formação de ângulo nessas células, perdendo o contorno circular, dando aspecto de células compactadas (Figura 13d). Na tangerineira verificou-se pequena degeneração das células vasculares, com formatos alterados das células da bainha do feixe, mostrando alguma desestruturação da parede celular (Figura 13f). Tais alterações provavelmente foram relacionadas com pontos de baixa resistência na parede celular, causado pela presença do F, o que poderia justificar os danos causados em todas as espécies estudadas.

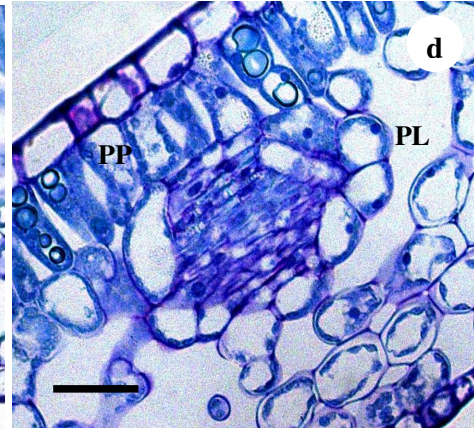
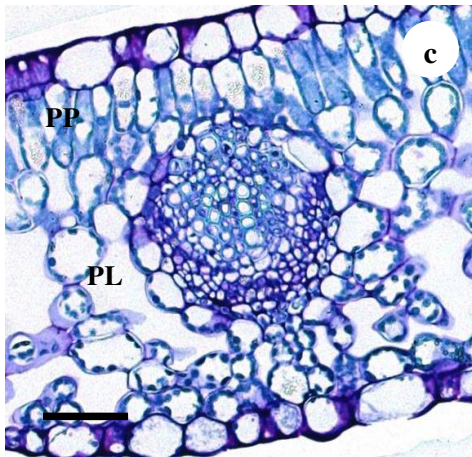
Figura 12. Secções transversais de folhas de plantas não exposta ao flúor (F) e expostas à maior dose do elemento obtidas sob microscopia de luz: a - Obatã não exposto ao flúor (F) (barra = 18 μm) - parênquima lacunoso com arranjo laxo; b - Obatã sob F (barra = 19 μm) - conteúdo fenólico no tecido celular do parênquima paliçádico; c - Catuaí sem F (barra = 19 μm) - parênquima lacunoso com 8-10 camadas; d - Catuaí sob F (barra = 20 μm) compactação das células do floema e do xilema; e - Apatã sem F (barra = 17 μm) - com três camadas de parênquima paliçádico próximo a epiderme adaxial; parênquima clorofiliano disposto irregularmente, e se compacta nas cinco últimas camadas; f - Apatã Sob F (barra = 19 μm) aumento nos espaços intercelulares do parênquima lacunoso. Legenda: parênquima paliçádico (PP); parênquima lacunoso (PL).

Controle (sem HF)

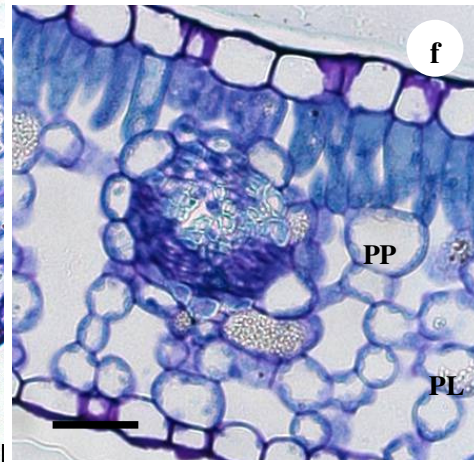
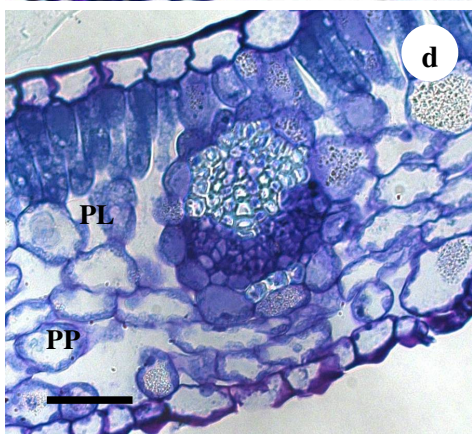
HF (0,16 mol L⁻¹)



Obatã



Catuaí

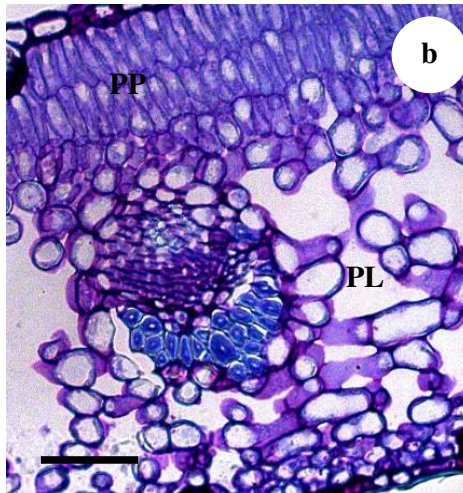
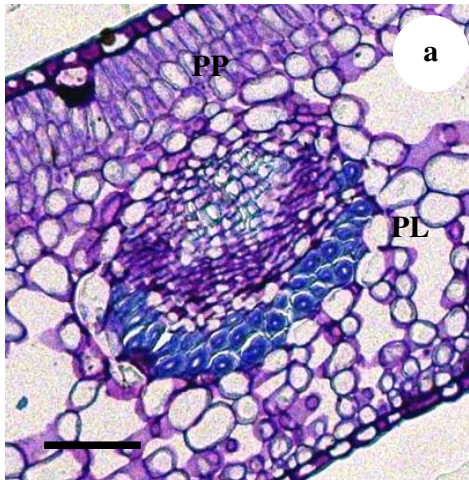


Apatã

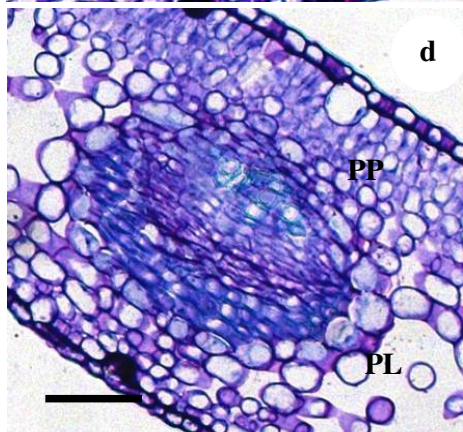
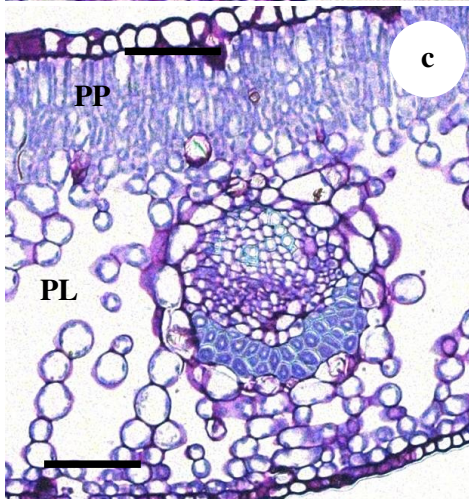
Figura 13. Secções transversais de folhas de plantas não exposta ao flúor (F) e expostas à maior dose do elemento obtidas sob microscopia de luz: a - laranja sem flúor (barra = 18 μm) - folha espessa, cutícula grossa; b - laranja com flúor (barra = 22 μm) - alteração no parênquima paliçádico e lacunoso; c - limão sem flúor (barra = 19 μm) parênquima paliçádico formado por 8-10 camadas; parênquima lacunoso com células maiores, que se tornam menores e mais compactadas próximo a epiderme abaxial; d - limão com flúor (barra = 20 μm) compactação das células do floema e do xilema; e - tangerina sem flúor (barra = 20 μm) - com 3 camadas de parênquima paliçádico próximo a epiderme adaxial; parênquima clorofiliano disposto irregularmente, e se compacta nas últimas camadas; f - tangerina com flúor (barra = 23 μm) colapso das células vasculares. Legenda: parênquima paliçádico (PP); parênquima lacunoso (PL).

Controle (sem HF)

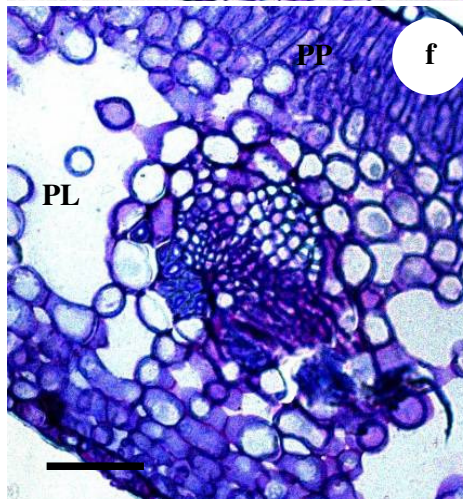
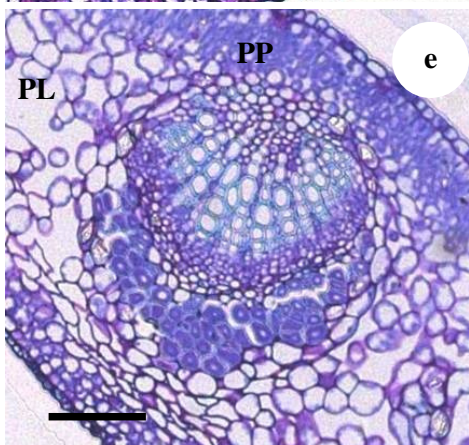
HF (0,16 mol L⁻¹)



Laranja



Limão



Tangerina

4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

Quando as plantas de café Obatã foram expostas a maior dose de HF, apresentaram degeneração das células da epiderme próximas aos estômatos o que deixou a epiderme nessa região com aspecto enrugado. Houve deformação do ostíolo, que permaneceu aberto (Figura 14b). Os mesmos danos foram observados para os cafeeiros Catuaí e Apatã, cujas células dos estômatos se danificaram, e permaneceram abertos (Figura 14d, f).

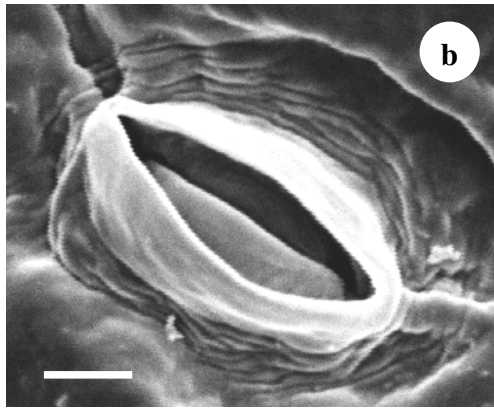
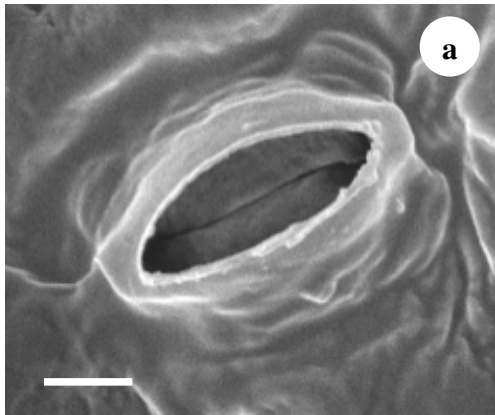
Na laranjeira houve alterações no contorno do ostíolo dos estômatos, que também ficaram abertos após a longa exposição ao F (Figura 15b). Já no limoeiro e na tangerineira, os ostíolos mantiveram-se fechado, com deformação das células da epiderme e conseqüentemente dos estômatos (Figura 15d, f). A tangerineira mostrou pequenos danos a epiderme, com pequena deformação nos estômatos.

Dos danos observados nas espécies tratadas, o estômato foi uma das estruturas foliares mais prejudicadas, talvez pelo fato de ser a via de absorção de F pelas plantas nessas condições de exposição.

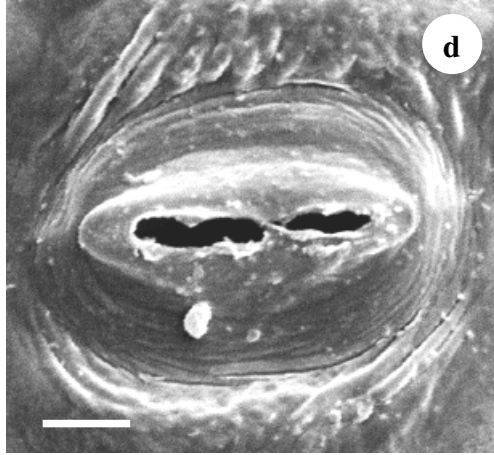
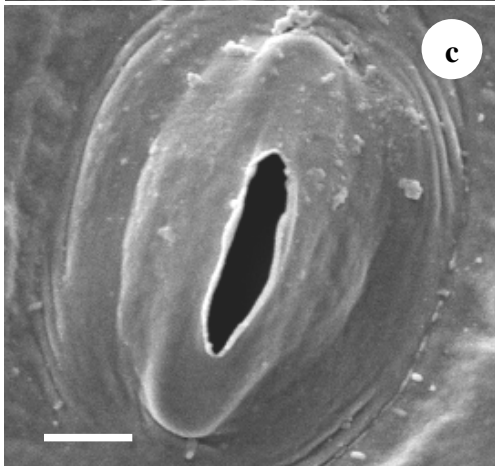
Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura de folhas das plantas não expostas ao flúor (F) e expostas à maior dose do elemento. a - Obatã sem flúor (barra = 3,14 μm) - ostíolo fechado. b - Obatã com flúor (barra = 1 μm) - reforço danificação a epiderme, ostíolo aberto; c - Catuaí sem flúor (barra = 1,2 μm) - uniformidade da epiderme; d - Catuaí com flúor (barra = 1,6 μm) - estômato danificado e aberto; e - Apatã sem flúor (barra = 1,8 μm) - ostíolo totalmente fechado; f - Apatã com flúor (barra = 2,1 μm) - total abertura estomática.

Controle (sem HF)

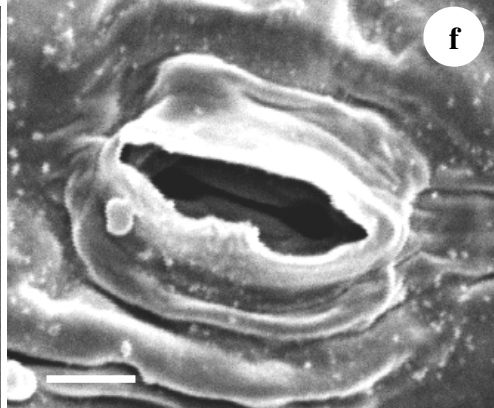
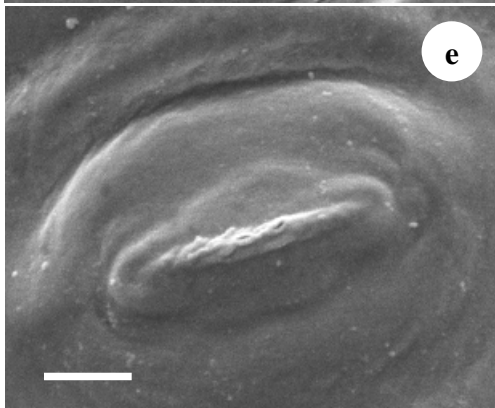
HF (0,16 mol L⁻¹)



Obatã



Catuaí

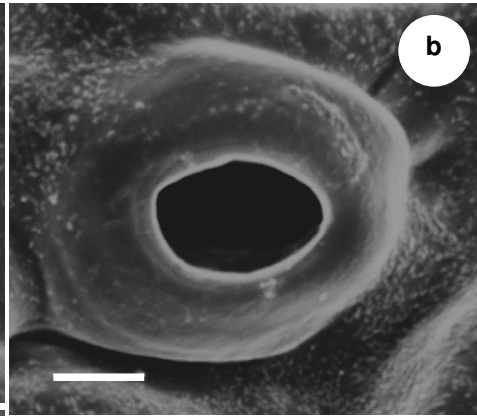
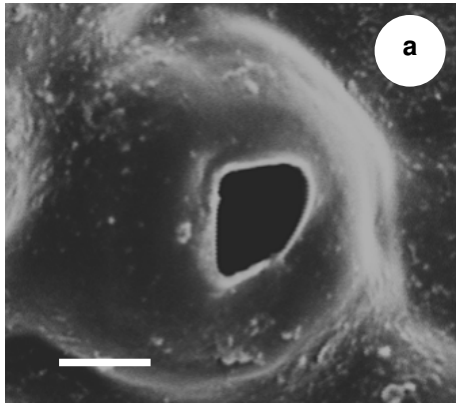


Aipoatã

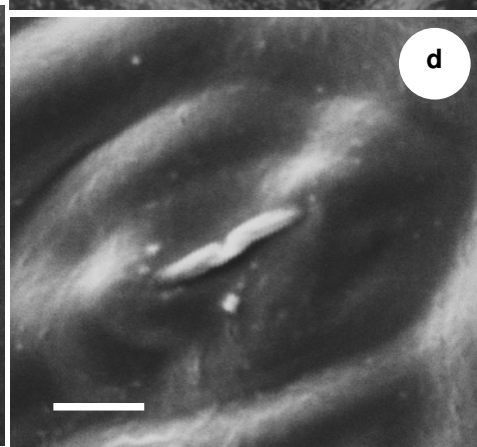
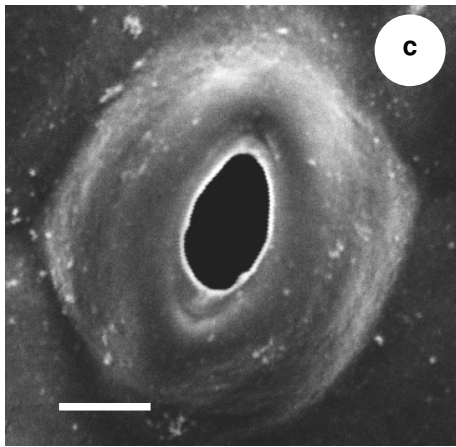
Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura de folhas das plantas não expostas ao flúor (F) e expostas à maior dose do elemento. a - laranja sem flúor (barra = 5,2 μm) - epiderme uniforme, ostíolo fechado; b - laranja com flúor (barra = 4,8 μm) - epiderme alterada, ostíolo com formato irregular e aberto; c - limão sem flúor (barra = 4,6 μm) - uniformidade da das células do estomato; d - limão com flúor (barra = 4,7 μm) - estômato totalmente fechado; e - tangerina sem flúor (barra = 3,9 μm) - ostíolo fechado; f - tangerina com flúor (barra = 5,6 μm) - escamação da epiderme e degeneração do estômato.

Controle (sem HF)

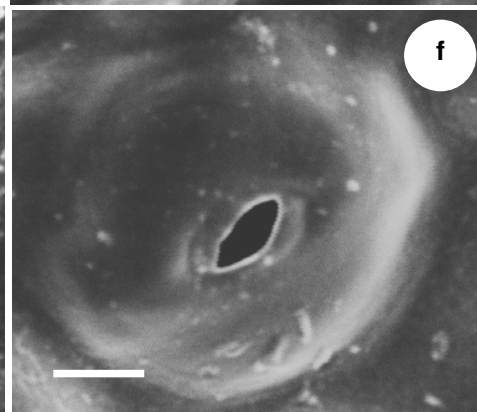
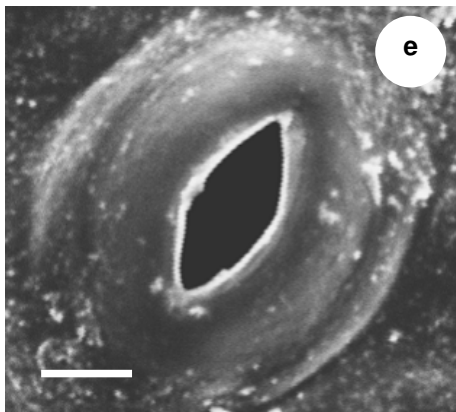
HF (0,16 mol L⁻¹)



Laranja



Limão



Tangerina

4.2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

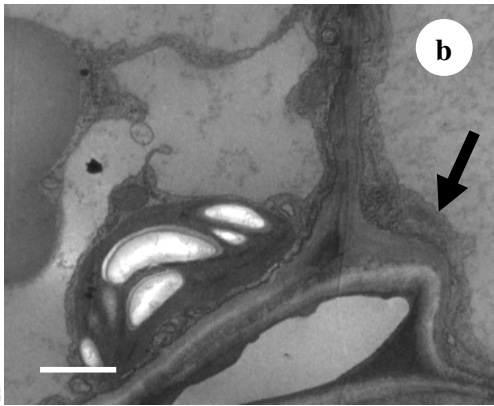
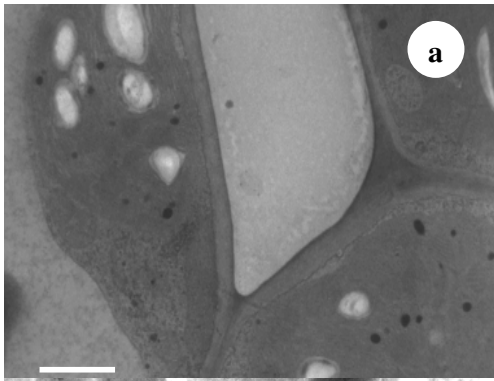
As observações feitas nas cultivares de café demonstraram que na variedade Obatã as paredes celulares apareceram mais delgadas e deformadas (seta), os cloroplastos e o citoplasma apresentaram aspecto senescente, com menor tamanho, e coloração mais escura, sugerindo oxidação dessa estrutura, além de grãos de amido volumosos. A lamela média, embora ainda visível, ficou fragmentada, com algumas partes seccionadas (Figura 16b). No café Catuaí os cloroplastos estavam com tamanho reduzido, com aspecto deformado (seta). As células mostraram degradação da lamela média. Os tilacóides mostraram-se alterados perdendo a organização dos grana que se tornaram sinuosos e esparsos. A parede celular se tornou elétron-densa e com aspecto granuloso (Figura 16d). No Apoatã foi observada pequena alteração na parede celular, com cloroplastos mais escurecidos (Figura 16f).

No citros, a laranja apresentou células pequenas e arredondadas, com grande número de cloroplastos em suas extremidades, com grãos de amido volumosos (Figura 17a). A parede celular da folha do limoeiro mostrou-se espessa e com formato alongado e citoplasma uniforme (Figura 17c). As células da tangerineira mostraram-se semelhantes as do limoeiro, também com parede celular espessa, e grande número de cloroplastos periféricos (Figura 17e). A laranja apresentou degeneração das paredes celulares, com algumas reentrâncias (seta) e o citoplasma mostrou-se alterado (Figura 17b). Houve aparente redução no número de cloroplastos nas células do limoeiro, além de parede celular mais delgada, com formato ondulado em algumas regiões (seta) (Figura 17d). Na tangerineira observou-se parede celular mais delgada, além da lamela média seccionada (seta) (Figura 17f).

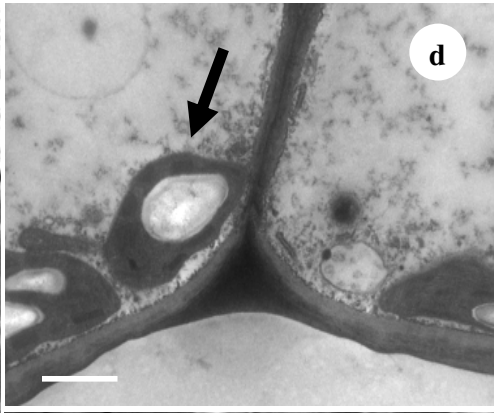
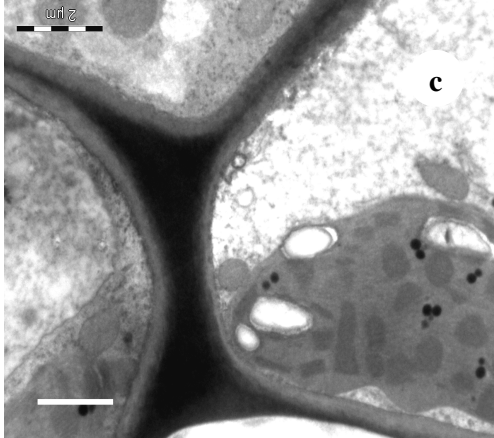
Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão de plantas de café. a - Obatã sem flúor (barra = 6,75 μm) - tonoplasto uniforme; b - Obatã com flúor (barra = 5,7 μm) - pequena alteração na parede celular (\rightarrow); c - Catuaí sem flúor (barra = 6 μm) - parede celular íntegra de formato arredondada; d - Catuaí com flúor (barra = 7,5 μm); cloroplastos com aspecto senescente (\rightarrow), de menor tamanho e grãos de amido maiores; e - Apatã sem flúor (barra = 6,9 μm) - cloroplastos com grãos de amido de formato lenticular; f - Apatã com flúor (barra = 6,5 μm) - deformação da parede celular, degradação da lamela média.

Controle (sem HF)

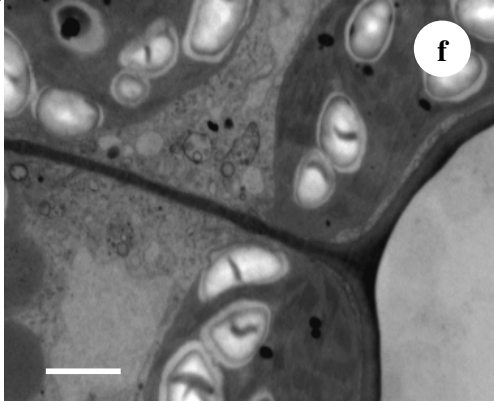
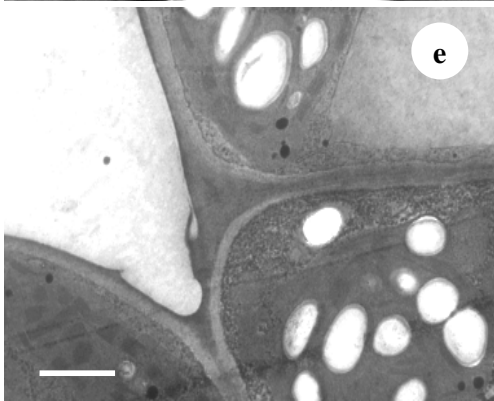
HF (0,16 mol L⁻¹)



Obatã



Catuaí

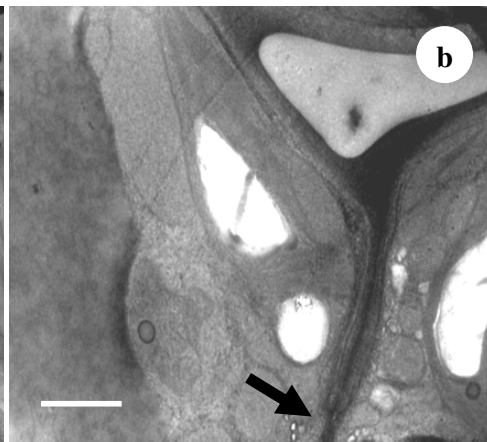
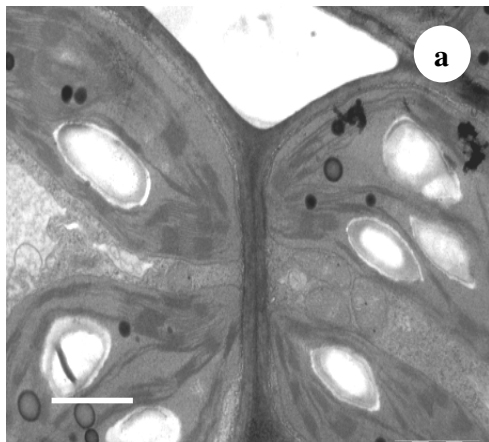


Apoatã

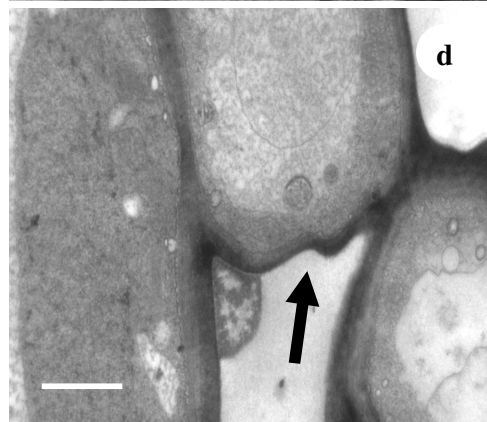
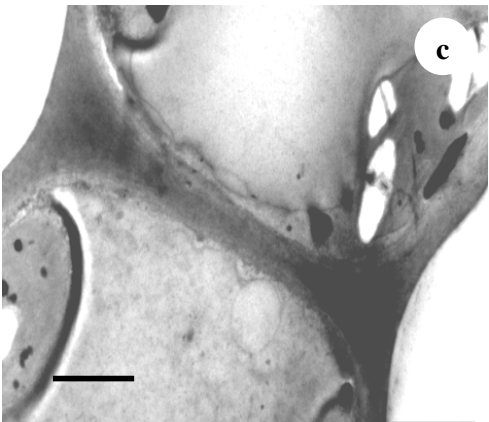
Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão de plantas de citros. a: laranja sem flúor (barra = 8 μm) - células pequenas e arredondadas, numerosos cloroplastos; b - laranja com flúor (barra = 5,5 μm) - reentrâncias na parede celular (\rightarrow); c - limão sem flúor (barra = 5,8 μm) - parede celular espessa de formato alongado, citoplasma uniforme; d - limão com flúor (barra = 5,9 μm) - aparente redução do número de cloroplastos, parede celular delgada, com reentrâncias (\rightarrow) e -tangerina sem flúor (barra = 5,4 μm) - numerosos cloroplastos periféricos; f - tangerina com flúor (barra = 6 μm) - lamela média seccionada (\rightarrow).

Controle (sem HF)

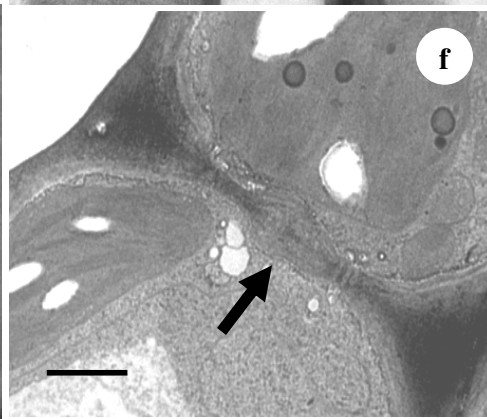
HF (0,16 mol L⁻¹)



Laranja



Limão



Tangerina

O cloroplasto é a organela que mais acumula fluoreto e tem sido citada como a mais afetada pela ação do F (BUSTAMANTE et al., 1993). Alterações no formato dos cloroplastos foram também citadas por WEI & MILLER (1972) em *Glycine max*. O aumento no volume dos grãos de amido nos cloroplastos de plantas de *S. dulcis* também ocorreu em resposta à chuva ácida com F (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006). A ocorrência de células com quantidades anormais de amido está relacionada com o efeito inibidor de poluentes sobre a translocação de carboidratos das folhas para as raízes, causando acúmulos de grãos de amido nos cloroplastos (RENNENBERG et al., 1996; SODA et al., 2000). Alterações na partição de carbono também fazem com que haja desequilíbrio da relação parte aérea raiz (GRULKE & BALDUMAN, 1999).

A parede celular das células das plantas foi um dos componentes mais afetados pelo F. Devido à abundância de ácidos urônicos ionizáveis presentes nas paredes celulares, estas normalmente possuem cargas negativas (BRETT & WALDRON, 1990). O principal cátion associado a estas cargas negativas é o cálcio, que pode ser deslocado pelo F ocorrendo como resultado um acúmulo de CaF_2 , além de modificações estruturais na parede das células. Com a formação de CaF_2 ocorre a liberação de sítios de fixação de cálcio e uma conseqüente deficiência desse íon, fisiologicamente ativo nos tecidos, tornando as paredes frágeis e propensas ao colapso (GARREC & CHOPIN, 1982).

4.2.7 Produção de massa seca foliar

A produção de massa seca das plantas diminuiu com a exposição ao F nas três variedades de café e no limoeiro, enquanto para as outras espécies cítricas não houve efeito dos tratamentos. As plantas foram expostas ao F por um período maior comparado ao Experimento I, e mesmo no tratamento controle, elas apresentaram menor produção de massa das folhas no Experimento II, devido, provavelmente, às menores temperaturas, máxima e mínima, durante a condução do experimento, o que fez diminuir o metabolismo das plantas, desacelerando o desenvolvimento delas. Efeitos semelhantes foram observados no café Catuaí e no Apoatã, que reduziram a produção em 25% e 28%, respectivamente, com a primeira dose, comparado às plantas controle (Tabela 11).

No limoeiro e no cafeeiro Obatã essa menor produção de massa seca foliar se deu com os tratamentos de maior dose, com redução de 23% e 24%, respectivamente (Tabelas 11 e 12). BREWER et al. (1969) mostraram que exposições contínuas de árvores de limoeiro Lisboa ao gás HF resultou em retardo no crescimento, além de redução da área fotossinteticamente ativa, devido a necroses e menor tamanho das folhas, com aumento

na queda delas, o que afetou a fotossíntese dessas plantas. Ainda, várias alterações metabólicas podem estar associadas ao efeito inibitório de fluoreto sobre o crescimento de plantas (YANG & MILLER, 1963). O F reduz o número de ribossomos e danifica a estrutura das proteínas ribossomais, com prejuízo para a síntese de proteína e, conseqüentemente, para o processo de crescimento (CHANG, 1973). O fluoreto interfere também na síntese de polissacarídeos da parede celular, particularmente pela inibição da conversão da glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato, o que altera sua estrutura, prejudicando o crescimento da planta (CHUNG & NICKERSON, 1954).

As plantas de laranja e tangerina não apresentaram efeito significativo na produção de massa seca, sugerindo maior tolerância dessas espécies ao F. Por outro lado, as plantas de azevém mostraram uma tendência em aumentar a produção de massa seca com o aumento das doses de HF, efeitos semelhantes foram encontrados por OLIVA & FIGUEIREDO (1994) para o capim-colonião e o capim-rhodes nebulizado com 10 g m^{-3} de F. O fluoreto não é reconhecido como elemento essencial, mas tem efeitos favoráveis diretos e indiretos sobre o metabolismo da planta (MURRAY & WILSON, 1990). Evidências têm mostrado que a exposição de plantas a baixas concentrações de F estimula o seu crescimento (BUNCE, 1985). Ainda segundo esse autor, a exposição de plantas a baixas concentrações de F pode estimular o seu crescimento, uma vez que o flúor teria a capacidade de inibir a enzima adenosina trifosfatase, que degrada o ATP, alterando, assim, o balanço ADP-ATP, que regula a respiração (LORDS & McNULTY, 1965).

Tabela 11. Efeito da nebulização com HF na produção de massa seca foliar em variedades de café após 57 dias de exposição das plantas: Obatã, Catuaí, Apoatã

Doses de HF	Massa Seca (¹)			Média
	Obatã	Catuaí	Apoatã	
mol L^{-1}	----- g -----			
0	5,33	3,49	3,32	4,05 a
0,04	4,65	2,72	2,83	3,40 ab
0,16	4,28	2,70	2,40	3,12 b
Média	4,75 A	2,97 B	2,85 B	-
Teste F				
Variedade (V)				135,34**
Dose (D)				26,50**
V x D				0,68 ^{ns}

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, respectivamente. As médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente para dose e maiúscula na linha para variedade, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Tabela 12. Efeito da nebulização com HF na produção de massa seca foliar em variedades de citros após 57 dias de exposição das plantas: laranja, limão, tangerina.

Doses de HF mol L ⁻¹	Laranja	Limão	Tangerina	Média
	Massa Seca (¹) ----- g -----			
0	17,64	16,66	12,25	15,52 a
0,04	16,38	16,36	11,70	14,81 a
0,16	14,83	13,58	11,54	13,32 b
Média	16,13 A	15,53 A	11,83 B	-
Teste F				
Variedade (V)				16,32**
Dose (D)				3,65*
V x D				0,65 ^{ns}

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, respectivamente. As médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente para dose e maiúscula na linha para variedade, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

4.2.8 Análise química de folhas e acúmulo de nutrientes minerais

Menores variações ou efeitos não significativos para vários outros nutrientes foram verificados para as variedades de citros e café (Tabelas 13-15 e 16-18). O acúmulo dos nutrientes variou principalmente com o aumento ou diminuição da produção de massa seca das folhas.

O conteúdo de Ca nas plantas pode ser um mecanismo de defesa, que consiste na captura do fluoreto na forma de CaF₂ insolúvel, o que aponta para o papel deste elemento na desintoxicação do F (BEN ABDALLAH et al., 2006), verificou-se menores teores e acúmulo desse elemento pelo limoeiro dentre as variedades de citros estudadas, o que pode justificar sua maior susceptibilidade à contaminação pelo F, manifestado por alterações nas variáveis de trocas gasosas, danos visuais, anatômicos e ultraestruturais, além de queda na produção de massa seca.

Contudo, não se identificou novamente mecanismo específico que pudesse explicar essas variações ou que auxiliasse na interpretação da variação do estado nutricional das plantas.

Tabela 13. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de laranja em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
mol L ⁻¹	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	374	38,25	487,75	56,75	59,00	664	961	37	1610	979b	214	145,5c
0,04	377	42,75	468,25	55,00	63,25	610	979	35	1667	1225a	233	1368,2b
0,16	313	32,25	432,00	48,25	73,00	546	849	23	1525	948b	209	1553,8c
Média	354	37,75	462,67	53,33	65,25	606	930	32	1600	1051	219	689,2
Teste F ⁽¹⁾	0,54 ^{ns}	1,69 ^{ns}	0,63 ^{ns}	2,08 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,54 ^{ns}	1,62 ^{ns}	0,33 ⁿ	4,25 ^{ns}	0,24 ^{ns}	125,9 ^{**}
CV, %	27,75	21,49	15,37	11,68	22,71	24,18	20,68	38,91	15,54	20,67	23,37	19,58

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Tabela 14. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de limão em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
mol L ⁻¹	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	148,50	10,75	148,25	17,25	18,00	231,25	352	8,00	411a	326	77	128,5c
0,04	158,75	9,50	141,75	15,25	15,75	235,25	358	9,50	431ab	349	81	654,5b
0,16	166,00	10,75	144,25	16,50	17,25	231,50	351	9,25	531a	312	74	1555,8a
Média	157,75	10,33	144,75	16,33	17,00	232,67	354	8,92	457	329	78	779,6
Teste F ⁽¹⁾	0,63 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,59 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	1,69 ^{ns}	3,69 ^{ns}	2,00 ^{ns}	0,46 ^{ns}	108,7 ^{**}
CV, %	14,09	16,60	16,44	16,89	17,48	10,55	13,13	13,86	14,69	16,44	13,82	17,76

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Tabela 15. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de tangerina em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses ^F	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
mol L ⁻¹	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	162,25	15,00	233,50	30,50	24,50	254,75	515	17	1195a	499	146	147,3c
0,04	158,25	14,50	220,25	26,25	20,25	265,50	504	18	1037ab	422	128	515,3b
0,16	138,00	13,75	193,25	25,25	22,00	224,25	432	13	816b	430	116	1061,8a
Média	152,83	14,42	215,67	27,33	22,25	248,17	484,25	16	1016	450	130	574,5
Teste F ⁽¹⁾	1,50 ^{ns}	0,38 ^{ns}	2,26 ^{ns}	2,11 ^{ns}	1,96 ^{ns}	2,97 ^{ns}	1,73 ^{ns}	1,53 ^{ns}	7,32**	2,30 ^{ns}	1,93 ^{ns}	38,75**
CV, %	13,87	14,20	12,66	14,04	13,71	10,01	14,16	28,31	13,86	12,58	16,56	25,72

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Tabela 16. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de Obatã em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
mol L ⁻¹	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	54,75a	3,00	46,00	10,75a	4,50	76,00	87	6,25	338	252	21	57,0c
0,04	47,75a	3,00	40,25	10,25a	4,00	68,25	85	5,25	280	294	20	444,5b
0,16	39,00b	2,75	39,25	8,75b	3,95	63,50	76	4,50	285	260	19	789,5a
Média	47,17	2,92	41,83	9,67	4,15	69,25	83	5,33	301	269	20	430,3
Teste F ⁽¹⁾	10,91**	1,00 ^{ns}	3,57 ^{ns}	4,98 ^{ns}	4,14 ^{ns}	1,31 ^{ns}	3,49 ^{ns}	4,11 ^{ns}	3,67 ^{ns}	5,94 ^{ns}	1,41 ^{ns}	34,93**
CV, %	10,13	9,90	18,52	13,58	11,26	15,93	15,54	32,63	14,70	10,11	9,64	28,81

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Tabela 17. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de Catuaí em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
mol L ⁻¹	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	54,25a	3,75	26,00a	7,75a	3,50	49,25a	77	10	175	189	25	39,8c
0,04	42,00b	2,00	19,25b	6,25b	2,75	40,75ab	72	8	165	192	16	211,8b
0,16	43,75b	2,75	19,00b	6,00b	3,00	38,25b	69	12	168	123	30	334,5a
Média	47,67	2,50	21,42	6,67	3,08	42,75	73	10,10	169	168	24	195,3
Teste F ⁽¹⁾	9,11**	0,30 ^{ns}	6,77*	5,86*	3,00 ^{ns}	4,67**	3,50 ^{ns}	3,38 ^{ns}	2,19 ^{ns}	1,83 ^{ns}	1,42 ^{ns}	17,9**
CV, %	9,41	19,76	19,11	11,73	14,30	12,48	11,0	33,72	41,73	34,47	49,79	35,78

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Tabela 18. Acúmulo de macro, micronutrientes e F nas folhas de Apatã em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn	F
mol L ⁻¹	----- mg/g de folha -----						----- µg/g de folha -----					
0	42,50a	3,75a	24,75a	8,50a	3,75a	54,25a	73	3	147a	97	17	51,5c
0,04	31,50b	2,00b	20,50b	7,00a	3,00ab	44,75b	63	3	125b	85	15	162,8b
0,16	25,50b	1,75b	17,75b	4,75b	2,25b	38,75c	60	4	112b	87	14	474,2c
Média	33,17	2,50	22,00	6,75	3,00	45,92	65	4	128	90	13	229,5
Teste F ⁽¹⁾	15,29**	12,21**	24,95**	10,91**	5,79*	28,84**	3,69 ^{ns}	3,00 ^{ns}	7,15*	0,84 ^{ns}	3,02 ^{ns}	99,2**
CV, %	13,29	24,94	9,40	16,93	20,79	6,34	14,63	17,79	10,51	15,54	12,49	19,17

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos do F foram similares nos Experimentos I e II quanto à concentração de F nas folhas, que tiveram aumentos proporcionais às doses nebulizadas, porém como no Experimento II as plantas foram expostas por maior número de dias ao ambiente contaminado pelo F, as folhas apresentaram concentrações maiores. Mesmo assim o Experimento I apresentou danos mais evidentes, principalmente visuais e estruturais nas plantas e esse agravamento provavelmente ocorreu devido às condições ambientais, com danos mais pronunciados em épocas mais quentes, em que as plantas apresentam maior metabolismo e desenvolvimento e a presença do F afetou negativamente o crescimento dessas plantas. O surgimento de sintomas visuais em ambos os experimentos ocorreram nas plantas de gladiolo e foram ausentes no azevém. Já para as demais espécies os Experimentos I e II se diferiram quanto a ocorrência de sintomas visuais no cafeeiro, que não manifestaram sintomas quando foram expostos por um maior número de dias e em um período com temperatura mais amena (Experimento II).

As alterações observadas pelos microscópios de luz e eletrônico de varredura foram mais pronunciadas nos tratamentos com a maior dose de HF ($0,16 \text{ mol L}^{-1}$) e foram associadas aos prejuízos sobre as paredes celulares das células do parênquima, da bainha do feixe, à estrutura estomática e à epiderme, e apresentaram as mesmas alterações nos dois experimentos. No Experimento II observaram-se ainda danos à ultraestrutura das folhas causados pela fitotoxicidade do F, tendo maior efeito sobre o limoeiro que apresentou aparente redução no número de cloroplastos e do cafeeiro Obatã que mostrou alterações no tamanho e na coloração dos cloroplastos, visto em microscopia eletrônica de transmissão.

Embora tenha observado aumento da fotossíntese do cafeeiro, no Experimento I, quando as plantas foram expostas a maior número de dias ao ambiente contaminado pelo F (Experimento II) esse parâmetro diminuiu, e mostrou que não houve limitação estomática para o efeito do F. Tanto os danos anatômicos, quanto os fisiológicos causados pelo F refletiram na produção de massa seca das folhas das plantas, que foi menor com aumento das doses de HF. Essa queda na produção ocorreu principalmente para o gladiolo e para o café nos experimentos I e II e para o limoeiro no Experimento II.

No Experimento II, as variedades de citros e café mostraram comportamento diferencial diante da contaminação pelo F, tanto em relação aos danos anatômicos e

ultraestruturais, quanto fisiológicos, com maior susceptibilidade ao contaminante para o limoeiro e para o cafeeiro Obatã, que tiveram esses efeitos refletidos na produção de massa seca nas folhas dessas espécies, que reduziram diante dos danos que estavam tendo.

Nos Experimentos I e II as variações sobre os teores de nutrientes minerais tiveram destaque para o aumento nas concentrações de Ca, Mg, K e N, principalmente para o gladiolo. Entretanto, não se identificou mecanismo específico que pudesse explicar essas variações ou auxiliasse na interpretação da variação do estado nutricional das plantas.

6 CONCLUSÕES

A exposição das plantas ao F atmosférico causou redução na produção de massa seca das folhas de gladiolo e de café nos Experimentos I e II, e do limoeiro no Experimento II, cujo efeito deveu-se às alterações fisiológicas e estruturais.

Houve variações nos parâmetros de trocas gasosas causados por prejuízos indiretos à exposição ao F, os quais foram associados aos processos bioquímicos e fotoquímicos da fotossíntese das plantas, danos estruturais e ultraestruturais nas folhas principalmente na alta exposição ao F. Esses efeitos também foram associados ao aumento da concentração e do acúmulo de F nas folhas das espécies estudadas, que teve efeito cumulativo em ambos os experimentos.

Os sintomas visuais da toxicidade de F ocorreram no gladiolo, já à baixa exposição, e no citros no Experimento I e II, e no café no Experimento I.

Confirmando a hipótese do trabalho, no Experimento II foram observadas respostas diferenciadas para as medidas de trocas gasosas entre espécies cítricas e variedades de café em função da exposição ao ambiente contaminado por F, sendo o limoeiro e o café Obatã os mais susceptíveis ao elemento;

O efeito do F nas plantas foi agravado devido a condições ambientais, verificado pela condução dos Experimentos I e II em diferentes épocas do ano;

A análise química de nutrientes nas folhas mostrou haver um aumento das concentrações de Ca e Mg para algumas espécies estudadas à alta exposição ao F, enquanto o acúmulo de nutrientes ocorreu principalmente em função da variação da matéria seca de plantas produzida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.F.; HENDRIX, J.W.; APPLGATE, H.G. Relationship among exposure periods, foliar burn, and fluorine content of plants exposed to hydrogen fluoride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.5, p.108-116, 1957.

ALFONSI, E.L.; FAHL, J.L.; CARELLI, M.L.C.; FAZUOLI, L.C. Crescimento, fotossíntese e composição mineral em genótipos de *Coffea* com potencial para utilização como porta-enxerto. **Bragantia**, Campinas, v.64, p.1-13, 2005.

ALLMENDINGER, D.F., MILLER, V.L.; JOHNSON, F. Control of fluorine scorch of gladiolus with foliar dusts and sprays. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.56, p.427-432, 1950.

ALLOWAY, B.J.; AYRES, D.C. Chemical Principles of Environmental Pollution, **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v.102, p.216-218, 1998.

AMARAL, F.C.S. **Efeito do flúor sobre o alumínio e o fósforo em um podzólico vermelho-amarelo e sua acumulação em algumas espécies vegetais**. 1997. 118p. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

ANDA. Associação Nacional para Difusão de Adubos em: <<http://anda.com.br>>. Consultado em <12 dez. 2009>.

APPLGATE, H.B.; ADAMS, D.F. Nutritional and water effect on fluoride uptake and respiration in bean seedlings. **Phyton**, Buenos Aires, v.14, p.111-120, 1960a.

APPLGATE, H.B.; ADAMS, D.F.; CARRIKER, R.C. Effects of aqueous fluoride solutions on respiration of intact bush bean seedlings. **American Journal of Botany**, Columbus, v.47, p.339-345, 1960b.

ARNDT, U.; FLORES, F.; WEINSTEIN, L.H. **Fluoride effects on plants, diagnose of injury in the vegetation of Brazil**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1995. 155 p.

ASPACER. Associação Paulista das Cerâmicas de Revestimento. Disponível em: <<http://aspacer.com.br>>. Consultado em <26 mar. 2008>.

ASTHIR, B.; BASRA, A.S.; BATTA, S.K., Fluoride-induced alteration of carbon and nitrogen metabolism in developing wheat grains. **Biologia Plantarum**, Praha, v.41, p.287-292, 1998.

AZEVEDO, A.A. **Ação do flúor em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Glycine max* (L.) Merrill**. 1995. 95f. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO J.R. **Métodos de análise químicas de plantas**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1983: 48p, (Boletim Técnico 78).

BEN ABDALLAH, F.; ELLOUMI, N.; MEZGHANI, I.; GARREC, J.P.; SFAX, M.B. Industrial fluoride pollution of jerbi grape leaves and the distribution of F, Ca, Mg, and P in them. **Reserch Report Fluoride**, v.39, p. 43-48, 2006.

BENNETT, J.H.; HILL, A.C. Inhibition of apparent photosynthesis by air pollution. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.2, p.526-553, 1973.

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

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

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman Ltd., p.44-48, 1990.

BREWER, R.F.; GUILLERMET, F.B.; SUTHERLAND, F.H. The atmospheric fluoride on gladiolus growth, flowering and corn production. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.88, p.634-644, 1965.

BREWER, R.F.; SUTHERLAND, F.H.; GUILLEMET, F.B. Effects of various fluoride sources on citrus growth and fruit production. **Environmental Science and Technology**, Easton, v.3, p.378-381, 1969.

BRYAN, O.C. **Malnutrition symptoms of citrus with practical methods of treatment**. Tallahassee: Department of Agriculture, 1957. 64p. (Bulletin 93)

BUNCE, H.W.F. Fluorides in air, grass, and cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p.1706-1711, 1985.

BUSTAMANTE, M.; OLIVA, M.A.; SANT'ANNA, R.; LOPES, N.F. Sensibilidade da soja ao flúor. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.5, n.2, p.151-157, 1993.

CAMERON, R.S.; RITCHIE, G.S.P.; ROBSON, A.D. Relative toxicities of inorganic aluminum complexes to barley. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.50, p.1231-1236, 1986.

CATI. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Disponível em: <www.cati.sp.gov.br>. Consultado em: <25 mar. 2008>.

CEPA/FPAC. National ambient air quality objectives of hydrogen fluoride (HF). **Science Assessment Document**. Report by the CEPA/FPAC Working Group on Air Quality Objectives and Guidelines. Canadian Environmental Protection ACT. Toronto, Ontário: 1996. 104p.

CERQUEIRA, E.C.; CASTRO-NETO, M.T.; PEIXOTO, C.P.; SOARES-FILHO, W.S.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, J.G. Resposta de porta-enxerto de citros ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, p.515-519, 2004.

CETESB. **Revisão da metodologia de monitoramento ativo de fluoreto com o bioindicador *Cordyline terminalis***. Relatório EQSE. São Paulo: 1998. 41p.

CONOVER, C.A.; POOLE, R.T. Influence of fluoride on foliar necrosis of *Cordyline terminalis* cv. Baby Doll during propagation. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Alexandria, v.84, p.380-383, 1971.

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

CHANG, C.W. Biochemical and biophysical investigation into growth and aging of corn seedlings treated with fluoride. **Fluoride**, Detroit, v.6, n.3, p.162-178, 1973.

CHANG, L.S. Fluoride. In: MUDD, J.B.; KOZLOWSKI, T.T. (Eds.). **Responses of plants to air pollution**. New York: Academic Press, p.57-95, 1975.

CHAVES, A.L.F.; SILVA, E.A.M.; AZEVEDO, A.A.; CANO, M.A.O.; MATSUOKA, K. Ação do flúor dissolvido m chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-rhodes) - Poacea. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v.16, p.395-406, 2002.

CHUNG, C.W.; NICKERSON, W.J. Polysaccharide synthesis in growing yeast. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v.208, p.395-407, 1954.

CRONIN, S.J.; MANOHARAN, V.; HEDLEY, M.J.; LOGANATHAN, P. Fluoride: a review of its fate, bioavailability, and risks of fluorosis in grazed-pasture systems in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.43, p.295-321, 2001.

DAMATTA, F.M.; MAESTRI, M.; BARROS, R.S. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. **Photosynthetica**, Prague, v.34, p.257-264, 1997.

DIVAN Jr., A.M. **Impactos das emissões de flúor em Ouro Preto-MG, avaliados mediante bioindicadores vegetais ativos e passivos**. Viçosa: UFV, 2002, 80p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, 2002.

DIVAN Jr., A.M.; OLIVA, M.A.; MARTINEZ, C.A.; CAMBRAIA, J. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum*, cv. Colonião. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.67, p.247-253, 2007.

DOLEY, D. Fluoride-induced enhancement and inhibition of photosynthesis in four taxa of *Pinus*. **New Phytologist**, Cambridge, v.110, p.21-31, 1988.

DOMINGOS, M.; KLUMPP, A.; KLUMPP, G. Air pollution impact on the Atlantic forest in the Cubatão region, SP, Brazil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.50, p.230-236, 1998.

EISSENSTAT, D.M.; SYVERTSEN, J.P.; DEAN, T.J.; JOHNSON, J.D.; YELENOSKY, G. Interaction of simulated acid rain with ozone on freeze resistance, growth, and mineral nutrition in citrus and avocado. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.116, p.838-845, 1991.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Tradução Berta Lange de Morretes. Ed. Edgard Blucher, São Paulo, 1976, 293p.

FAÇANHA, A.R.; de MEIS, L. Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. **Plant Physiology**, Washington, v.108, p.241-246. 1995.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods **American Journal of Botany**, Columbus, v.1, p.123-142, 1968.

FLAGER, R.B. **Recognition of air pollution injury by vegetation: a pictorial atlas**. 2.ed. Pittsburgh: Air & Waste Management Association, Pittsburgh, 1998. 10 p.

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

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

FORTES, C.; DUARTE, A.P.; MATSUOKA, S.; HOFFMANN, H.P.; LAVORENTI, N.A. Toxicidade de flúor em culturas de milho em áreas próximas a uma indústria cerâmica, Araras-SP. **Bragantia**, Campinas, v.62, p.275-281, 2003.

FRANKENBERGER Jr., W.T.; TABATABAI, M.A.; ADRICANO, D.C.; DONER, H.E. Bromine, chlorine, and fluorine. p.833-867. In: BINGHAM, J.M. (Ed.). **Methods of Soil Analysis**. Part 3. Chemical Methods. Madison: Soil Science Society of America. 1996. 139 p. (SSSA Book Series, 5).

FRANT, M.S.; ROSSE Jr., J.W. Use of a total ionic strength adjustment buffer for electrode determination of fluoride in water supplies. **Science**, London, v.40, p.1169-1171, 1968.

FRANZARING, J.; KLUMPPA, A.; FANGMEIER, A. Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardized grass cultures. **Atmospheric Environment**, Oxford, v.41, p.4828-4840, 2007.

GARREC, J.P.; OBERLIN, J.C.; LIGEON, C.; BISCH, A.M.; FOURCY, A. Fluoride-calcium interaction in polluted fir needles. **Fluoride**, Detroit, v.7, p.78-84, 1974.

GARREC, J.P.; CHOPIN, S. Calcium accumulation in relation to fluoride pollution in plants. **Fluoride**, Detroit, v.15, p.144-149, 1982.

GRULKE, N.E., BALDUMAN, L. High N deposition and O₃ exposure effects on growth and biomass allocation in ponderosa pine. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v.116, p.235-48, 1999.

HAN, S.; TANG, R.; ANDERSON, L.K.; WOERNER, T.E.; PEI, Z.M. A cell surface receptor mediates extracellular Ca²⁺ sensing in guard cells. **Nature**, London, v.425, p.196-200, 2003.

HILL, A.C.; PACK, M.R. Effects of atmospheric fluorides and various types of injury on the respiration of leaf tissue. **Plant Physiology**, Washington, v.34, p.11-16, 1959.

HORVATH, I.; KLASOVA, A.; NAVARA, J. Some physiological and ultrastructural changes of *Vicia faba* after fumigation with hydrogen fluoride. **Fluoride**, Detroit, v.11, p. 89-99, 1978.

IGLESIAS, D.J.; CALTAYUD, A.; BARRENO, E.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Responses of citrus plants to ozone: leaf biochemistry antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.44, p.125-131, 2006.

IVINSKIS, M.; MURRAY, F. Associations between metabolic injury and fluoride susceptibility in two species of *Eucalyptus*. **Environmental Pollution**, Barking, v.34, p.207-223, 1984.

JACOBSON, J.S.; HILL, A.C. **Recognition of air pollution injury to vegetation. A pictorial atlas**. Air Pollution Control Association, Pittsburg: Pennsylvania, 1970. 106 p.

JHA, S.K.; NAYAK, A.K.; SHARMA, Y.K.; MISHRA, V.K.; SHARMA, D.K. Fluoride accumulation in soil and vegetation in the vicinity of Brick Fields. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.80, p.369-373, 2008.

KANNAN, S. Physiology of foliar uptake of inorganic nutrients. **Proceeding of the Indian Academy of Science**, India, v.96, p.457-70, 1986.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p.137-138, 1965.

KONRAD, M.L.F.; SILVA, J.A.B.; FURLANI, P.R.; MACHADO, E.C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.3, p. 339-347, 2005.

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

KLUMPP, A.; ANSEL, W.; KLUMPP, G.; FOMIN, A. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, p.511-518, 2001. (Suplemento)

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

LEECE, D.R.; SCHECTEMA, J.H.; WEIR, R.G. The use of leaf analysis to diagnose fluoride toxicity in grapes. In: MURRAY (Ed.). **Fluoride emissions**. Academic Press, New York, p. 24-101, 1982.

LLOYD, J.; KRIEDEMANN, P.E.; ASPINALL, D. Comparative sensitivity of Prior Lisbon lemon and Valencia orange trees to foliar sodium and chloride concentrations. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.12, p.529-540, 1989.

LORDS, J.L.; McNULTY, I.B. Estimation of ATP in leaf tissue employing the fly luminescent reactions. **Utah Academy of Sciences, Arts, and Letters**, Salt Lake City, v.42, p.163-164, 1965.

MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; RIBEIRO, R.V.; MEDINA, C.L; STUCHI, E.S.; PAVANI, L.C. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranja 'Natal'. **Bragantia**, Campinas, v.66, p.373-379, 2007.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**, 2.ed. Academic Press, London: 1995. 889 p.

McCUNE, D.C.; MACLEAN, D.C.; SCHNEIDER, R.E. Experimental approaches to the effects of airborne fluoride on plants. In: MANSFIELD, T.A. (Ed.) **Effects of air pollutants on plants**. Cambridge University Press, Cambridge: p. 31-43, 1976.

McLAUGHLIN, S.B.; BARNES, R.L. Effects of fluoride on photosynthesis and respiration of some south-east American forest trees. **Environmental Pollution**, Barking, v.8, p.93-96, 1975.

MILLER, J.E.; MILLER, G.W. Effects of fluoride on mitochondrial activity in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.32, p.115-121, 1974.

MILLER, G.W. The effect of fluoride on higher plants. **Fluoride**, Detroit, v.26, p.3-22, 1993.

MIRLEAN, N.; CASSARTELLI, M.R.; GARCIA, M.R.D. Propagação da poluição atmosférica por flúor nas águas subterrâneas e solos de regiões próximas as indústrias de fertilizantes (Rio Grande, RS). **Química Nova**, São Paulo, v.25, p.191-195, 2002.

MURRAY, F.; WILSON, S. Yield responses of soybean, maize, peanut, and navy bean exposed to SO₂, HF and their combination. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.80, p.215-223, 1990.

NILSSON, T.; BRADEN, R. Kinetic study of the interaction between ribulosebiphosphate/carboxylase/oxigenase and inorganic fluoride. **Biochemistry**, New York, v.22, p.1641-1645, 1983.

OGUCHI, R.; HIKOSAKA, K.; HIROSE, T. Leaf anatomy as a constraint for photosynthetic acclimation: differential responses in leaf anatomy to increasing growth

irradiance among three deciduous trees. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.28, p.916-927, 2005.

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

OLSZYK, D.M.; KATS, G.; MORRISON, C.L; DAWSON, P.J.; GOCKA, I.; WOLF, J.; THOMPSON, C.R. Valencia orange fruit yield with ambient oxidant or sulfur dioxide exposures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, p.848-883, 1990.

OTTO, R.; FARIA, M.R.M.; QUEIROZ, F.E.C.; MOURA, T.A.; VITTI, G.C.; CANTARELLA, H. Rendimento da cana-de-açúcar é afetado por flúor. **Bragantia**, Campinas, v.66, p.505-509, 2007.

PARRY, M.A.J.; SCHMIDT, C.N.G.; GUTTERIDGE, S. Inhibition of ribulose-P₂ carboxylas/oxygenase by fluoride. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.35, p.161-198, 1984.

PEITER, E.; MAATHUIS, F.J.M.; MILLS, L.N.; KNIGHT, H.; PELLOUX, J.; HETHERINGTON, A.M.; SANDERS, D. The vacuolar Ca²⁺-activated Channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. **Nature**, London, v.434, p.404-408, 2005.

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

RAIJ, B. van. **Gesso na agricultura**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. 233p.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. p.285.

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

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH an electron opaque stain in electron. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.17, p.208-212, 1963.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C. Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: re-visiting photosynthesis under natural conditions. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v.19, p. 393-411, 2007.

ROHÁCEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, Prague, v.40, p.13-29, 2002.

RUETZE, M.; SCHMITT, V. Glykol-metacrylat (GMA) als einbettungssystem is histologische untersuchungen Von 'Koniferen – Nadeln. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.16, p. 21-324, 1986.

SANDERS, D.; PELLOUX, J.; BROWNLEE, C.; HARPER, J.F. Calcium at the crossroads of signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, p. 401-417, 2002.

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

SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; SILVA, L.C.; AZEVEDO, A.A.; ARAÚJO, J.M.; ALVES, E.F.; SILVA, E.A.M.; AGUIAR, R. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of three tropical species. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.58, p.158-168, 2006.

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

SAS INSTITUTE, Inc. The SAS System - Release 6.12. Cary, NC. 1996.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: SCHULZE, E.D.; CALDWELL, M.M. (Eds.). **Ecophysiology of photosynthesis**. Berlin: Springer, p.49-70. 1994. (Ecological Studies, 100)

SIDHU, S.S. Fluoride levels in air, vegetation and soil in the vicinity of a phosphorus plant. **Journal of the Air Pollution Control Association**, Pittsburgh, v.29, p.1069-1072, 1979.

SILVA, L.C.; AZEVEDO, A.A.; SILVA, E.A.M.; OLIVA, M.A. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.23, p.285-393, 2000.

SMITH, F.A. Overview of fluorides in everyday life. In: SHUPE, J.L.; PETERSON, H.B.; LEONE, N.C. (Eds.) **Fluorides – effects on vegetation, animals and humans**. Salt Lake City: Paragon Press, 1983. 368p.

SOIKKELI, S. Comparison of cytological injuries in conifer needles from several polluted industrial environments in Finland. **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v.18, p.47-61, 1981.

SODA, C.; BUSSOTTI, F.; GROSSONI, P.; BARNES, J.; MORI, B.; TANI, C. Impacts of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.44, p.69-82, 2000.

SUPHARUNGSUN, S.; WAINWRIGHT, M. Determination, distribution, and absorption of fluoride in atmospheric-polluted soils, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.28, p.632-636, 1982.

TAYLOR, G.E.; TINGEY, D.T. Flux of ozone to *Glycine max*: sites of regulation and relationship to leaf injury. **Oecologia**, Berlin, v.53, p.179-186, 1982.

THOMAS, M.D. Gas damage to plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.2, p.293-322, 1965.

THOMAS, M.D.; HENDRICKS, W. Effects of air pollution on plants. In: MAGILL, P.L.; HOLDREN, F.R.; ACKLEY, C. (Ed.). **The pollution handbook**. McGraw-Hill, New York, p. 1-44, 1956.

TRESHOW, M.; ANDERSON, F.K. **Plant stress from air pollution**. New York: Ed. Wiley, 1989, 294p.

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

VIKE, E. Air-pollutant dispersal patterns and vegetation damage in the vicinity of three aluminum smelters in Norway. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.236, p.75-90, 1999.

WANDER, I.W.; McBRIDE Jr., J.J. A chlorosis produced by fluorine on citrus. **Science**, London, v.123, p.933-934, 1956.

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

WEINSTEIN, L.H. Effects of atmospheric fluorides on metabolic constituents of tomato and bean leaves. **Contributions from the Boyce Thompson Institute**, United States, v.21, p.215-231, 1961.

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

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

WEINSTEIN, L.H.; DAVISON, A. **Fluoride in the environment**, London: Cabi, 2004. 287p.

WILSON, S.A. Are Mediterranean plant species likely to have a distinctive response to SO₂ pollution? **Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.55, p.71-93, 1995.

YAMAUCHI, M.; CHOI, W.K.; YAMADA, Y. Fluoride Inhibition of photosynthesis in certain crop plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.29, p.549-553, 1983.

YANG, S. F.; MILLER, G. W. Biochemical studies on the effect of fluoride on higher plants – metabolism of carbohydrates, organic acids and amino acids. **Biochemical Journal**, London, v.88, 505-509, 1963.

YU, M.H.; MILLER, G.W. Effect of fluoride on the respiration of leaves from higher plants. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.8, p.483-493, 1967.

ANEXOS

Anexo I. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de azevém em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF-Experimento I.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----						----- mg/kg -----				
0	24,85	1,70	9,35	3,70	5,19	21,38	8,10b	15,39b	85,55	243,89	82,26b
0,04	29,80	2,09	8,43	4,55	6,20	25,72	12,23a	18,41a	82,70	302,50	102,22a
0,16	27,33	1,90	7,64	4,10	5,50	22,33	10,25a	15,45b	75,52	279,17	83,83b
Média	27,32	1,90	8,47	4,11	5,63	23,14	10,19	16,42	81,25	275,19	89,43
Teste F ⁽¹⁾	1,02 ^{ns}	0,90 ^{ns}	1,45 ^{ns}	0,45 ^{ns}	1,09 ^{ns}	2,22 ^{ns}	4,71*	5,01*	0,85 ^{ns}	2,40 ^{ns}	6,22*
CV, %	10,86	9,35	11,72	6,56	15,88	10,85	18,3	16,57	11,50	7,85	14,82

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Anexo II. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de gladiólo em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF - Experimento I.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----						----- mg/kg -----				
0	40,35	1,65	6,30b	1,85a	2,05	25,55	52,65	8,05	193,50a	81,75	25,87
0,04	40,45	1,92	8,22a	2,15ab	2,17	25,35	60,86	8,25	156,30	99,00	27,95
0,16	46,97	20,5	8,80a	2,32b	2,55	26,62	55,48	7,55	153,00	104,25	29,65
Média	42,59	1,87	7,77	2,10	2,25	25,84	56,33	7,95	167,6	95,00	27,82
Teste F ⁽¹⁾	1,72 ^{ns}	1,19 ^{ns}	3,79**	5,10*	3,35 ^{ns}	0,28 ^{ns}	2,71 ^{ns}	0,87 ^{ns}	0,32 ^{ns}	1,56 ^{ns}	0,82 ^{ns}
CV, %	13,59	20,01	17,30	10,09	12,59	10,1	31,88	9,69	12,04	19,83	14,96

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Anexo III. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de café em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF - Experimento

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----					----- mg/kg -----					
0	27,52	1,07c	15,32	4,67	2,40	27,20a	83,15	6,75	138	237,75	7,77
0,04	29,97	1,25b	13,70	4,40	2,47	35,47a	87,40	6,72	123	259,50	8,10
0,16	27,62	1,37a	15,92	4,10	2,57	38,20b	69,25	7,60	150	268,50	8,22
Média	28,37	1,23	14,94	4,39	2,48	33,64	7,93	7,02	137,4	255,25	8,03
Teste F ⁽¹⁾	1,66 ^{ns}	18,17 ^{**}	2,63 ^{ns}	1,63 ^{ns}	2,92 ^{ns}	43,17 ^{**}	2,20 ^{ns}	0,91 ^{ns}	1,89 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,95 ^{ns}
CV, %	7,58	5,73	9,46	10,26	4,14	5,2	15,96	14,86	17,58	20,68	5,83

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Anexo IV. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de citros em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF - Experimento I.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----					----- mg/kg -----					
0	18,30a	1,87	25,87b	4,75	3,35	35,55	70,68	7,60	114,25a	95,75	20,57
0,04	11,47b	1,20	37,32a	5,25	4,15	34,47	81,55	6,55a	140,25a	73,75	21,67
0,16	13,87b	1,82	38,82a	4,65	4,47	33,32	97,22	5,76	149,25b	72,25	20,65
Média	14,55	1,84	34,00	4,88	3,99	34,45	83,15	6,60	134,58	80,58	20,97
Teste F ⁽¹⁾	4,93*	0,06 ^{ns}	9,1**	0,32 ^{ns}	4,21 ^{ns}	0,43 ^{ns}	4,14 ^{ns}	0,51 ^{ns}	17,08**	3,94 ^{ns}	0,35 ^{ns}
CV, %	20,70	12,31	13,80	23,15	14,14	9,80	15,77	39,5	6,53	16,44	9,94

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Anexo VII. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de laranja em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF - Experimento II.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----					----- mg/kg -----					
0	20,95	2,15b	27,90	3,30	3,40a	37,05	56	2,15	92,5	49,75b	12,02
0,04	23,22	2,70a	29,27	3,45	3,95ab	38,12	61	2,22	104,0	76,75a	14,7
0,16	20,82	2,15b	28,97	3,22	4,87a	36,82	57	1,57	102,5	56,5b	14,0
Média	21,67	2,33	28,72	3,32	4,08	37,33	57,58	1,96	99,67	61,00	13,55
Teste F ⁽¹⁾	0,94 ^{ns}	5,5**	0,57 ^{ns}	0,30 ^{ns}	4,61*	0,11 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,89 ^{ns}	2,16 ^{ns}	17,5**	2,43 ^{ns}
CV, %	12,87	11,60	6,64	12,67	17,03	11,28	13,81	41,39	8,54	11,02	13,03

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Anexo VIII. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de limão em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF - Experimento II.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----					----- mg/kg -----					
0	24,20b	1,75	24,02	2,82	2,92	37,05	61	1,27b	67b	53b	13
0,04	27,15ab	1,67	24,22	2,62	2,75	38,12	61	1,62a	74b	82a	14
0,16	28,72a	1,87	24,85	2,90	2,97	36,82	58	1,62a	92a	52b	13
Média	26,69	1,76	24,36	2,78	2,88	37,33	59,96	1,51	77	62,5	13,03
Teste F ⁽¹⁾	5,95*	1,79 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,62 ^{ns}	7,26*	23,81**	17,79**	2,57 ^{ns}
CV, %	7,06	8,54	7,56	14,74	11,93	11,28	9,14	9,94	6,76	12,82	6,58

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Anexo IX. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de tangerina em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF - Experimento II.

Doses ^F	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----						----- mg/kg -----				
0	19,30	1,82ab	26,92	3,65ab	2,90b	31,00	62	2,05	143a	60	17
0,04	19,50	1,75b	28,05	3,22b	2,50c	32,50	62	2,28	128ab	52	17
0,16	20,42	2,02a	28,45	3,75a	3,27a	33,05	64	1,92	120b	64	16
Média	19,79	1,87	27,81	3,54	2,89	32,04	62,51	2,07	130	58	16,79
Teste F ⁽¹⁾	0,26 ^{ns}	3,23 ^{ns}	0,43 ^{ns}	3,22 ^{ns}	11,57**	2,81 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,21 ^{ns}	4,00*	2,51 ^{ns}	0,78 ^{ns}
CV, %	11,96	8,47	8,71	8,76	7,88	4,84	12,29	34,70	9,01	13,45	11,65

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Anexo X. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de Obatã em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF - Experimento II.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----						----- mg/kg -----				
0	20,6	1,12	17,15	3,97ab	1,65ab	28,42	33	1,67b	127	94b	8
0,04	20,6	1,37	17,35	4,40a	1,80a	29,17	37	2,25b	119	140a	8
0,16	18,2	1,20	14,95	3,72b	1,52b	29,72	31	3,80a	121	103a	9
Média	19,8	1,23	16,48	4,03	1,66	29,11	33	2,57	122	112	8,45
Teste F ⁽¹⁾	2,75 ^{ns}	2,76 ^{ns}	2,10 ^{ns}	5,27*	4,96*	0,17 ^{ns}	0,97 ^{ns}	11,16**	0,47 ^{ns}	20,54**	1,83 ^{ns}
CV, %	8,63	12,53	11,16	7,37	7,45	11,04	17,23	25,55	9,56	9,46	7,88

⁽¹⁾ ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Anexo XI. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de Catuaí em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF - Experimento II.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----						----- mg/kg -----				
0	31,2a	1,52b	14,80	4,5	2,10	28,2	44	5,62ab	159	109	14
0,04	31,1a	1,65b	14,22	4,4	2,12	28,4	48	4,85b	122	139	12
0,16	32,3a	1,95a	14,10	4,6	2,20	29,7	47	8,77a	125	90	20
Média	31,5	1,71	14,37	4,50	2,14	28,8	46	6,42	136	113	15,33
Teste F ⁽¹⁾	0,17 ^{ns}	5,97*	0,08 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,16 ^{ns}	1,33 ^{ns}	1,32 ^{ns}	4,22 ^{ns}	0,54 ^{ns}	1,59 ^{ns}	1,57 ^{ns}
CV, %	10,34	10,46	18,11	9,49	12,13	5,13	8,41	31,53	40,76	34,81	49,37

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Anexo XII. Teores de macro, micronutrientes e F nas folhas de Apoatã em função da exposição das plantas à doses crescentes de HF - Experimento II.

Doses HF	K	P	Ca	Mg	S	N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mol L ⁻¹	----- g/kg -----						----- mg/kg -----				
0	25,82a	2,30a	16,57	5,03	2,30	32,77	44	2b	89a	59b	10,3a
0,04	22,40ab	1,37b	14,52	5,00	2,00	32,10	44	2b	89a	60b	8,8ab
0,16	21,02b	1,50b	15,02	3,97	1,87	32,42	41	5a	93b	72a	7,3b
Média	23,08	1,72	15,37	4,66	2,05	32,43	43	3	90	64	8,8
Teste F ⁽¹⁾	3,45 ^{ns}	7,77**	1,60 ^{ns}	3,13 ^{ns}	2,50 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,43 ^{ns}	83,3**	0,30 ^{ns}	3,88*	4,76*
CV, %	11,53	20,87	10,99	14,55	13,43	7,43	12,84	12,54	8,41	11,72	15,63

(¹) ns, ** e *: não significativo, significativo a 1 e a 5%, pelo teste de Duncan respectivamente.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)