

ELIZA LOUBACK COELHO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO AR NO PARQUE
ESTADUAL DO ITACOLOMI (PEI-MG) UTILIZANDO
Spondias dulcis FORST F. (ANACARDIACEAE) COMO
ORGANISMO BIOINDICADOR**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Botânica,
para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S237a
2013

Santos, Eliza Louback Coelho dos, 1987-
Avaliação da qualidade do ar no Parque Estadual do
Itacolomi (PEI-MG) utilizando *Spondias dulcis* Forst F.
(Anacardiaceae) como organismo bioindicador / Eliza Louback
Coelho dos Santos. – Viçosa, MG, 2013.
xi, 44 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luzimar Campos da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 38-44.

1. *Spondias dulcis*. 2. Química atmosférica. 3. *Spondias
dulcis* - Anatomia. 4. Stress (Fisiologia). 5. Monitorização
biológica. 6. Ar - Qualidade. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação
em Botânica. II. Título.

CDD 22 ed. 583

ELIZA LOUBACK COELHO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO AR NO PARQUE
ESTADUAL DO ITACOLOMI (PEI-MG) UTILIZANDO
Spondias dulcis FORST F. (ANACARDIACEAE) COMO
ORGANISMO BIOINDICADOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30/08/2013

Aristéa Alves Azevedo

Sílvia Ribeiro de Souza

Juraci Alves de Oliveira
(Coorientador)

Luzimar Campos da Silva
(Orientadora)

*Aos meus amados pais,
Por sempre darem bons conselhos e indicarem o melhor caminho para que, no fim,
eu firmasse o bom caráter que sempre admirei em vocês!*

DEDICO

*“Nossa maior fraqueza está em desistir.
Mas o caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”
(Thomas Edison)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me dado tanta força para continuar seguindo em frente e cumprir o Seu propósito. Agradeço ainda, por ter colocado pessoas tão maravilhosas na minha vida, sem as quais, Viçosa não teria o menor sentido.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), em particular ao Departamento de Biologia Vegetal, e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À minha querida orientadora Prof^ª Luzimar Campos da Silva pelos ótimos momentos de convivência, ensinamentos, paciência e principalmente por confiar a mim esse trabalho. Muitos dizem que trabalho de campo é loucura, mas a recompensa já está por vir!

À Prof^ª Aristéa Alves Azevedo pela ótima convivência e os mais valiosos ensinamentos.

Ao Prof^º Juraci Alves de Oliveira pela coorientação, pela compreensão, pelas ideias e por permitir que eu executasse grande parte deste trabalho sob sua supervisão.

Ao Prof^º Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos, pela coorientação e pelos toques para que a execução deste trabalho fosse a mais criteriosa possível.

À Prof^ª Silvia Ribeiro de Souza do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt) pelo apoio quase incondicional a esse trabalho, pela hospedagem no IBt, pelos ensinamentos, correções desse trabalho e pelas risadas e fofocas da vida amorosa.

À Prof^ª Marisa Domingos do IBt pela disponibilidade de olhar todas as fotos do experimento e auxílio na interpretação dos sintomas.

À Prof^ª Adalgisa Fornaro do Instituto de Astronomia e Geociências (IAG) da Universidade de São Paulo (USP) pelas análises da água da chuva.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, nas pessoas de Gilmar Valente, Karla Ribeiro e Artur, pelos ensinamentos, pela agradável convivência, pelo auxílio no aprimoramento técnico e utilização dos equipamentos.

Aos Funcionários do Parque Estadual do Itacolomi Juarez e Mônica pela autorização para que este trabalho fosse executado.

Aos professores Fábio da Matta e Wagner Araújo pela autorização da utilização da estrutura da Unidade de Crescimento de Plantas e pelos técnicos Rogério Gomide e Antônio Teixeira, pelo apoio sempre que precisei.

Aos irmãos de orientação da “Luzis” que por muitas vezes, mesmo sem saber, me ajudaram... Nosso grupo é muito unido e vai longe! Vocês são dez!

Ao Álvaro Couto, vulgo Alvinho, sem você muita coisa desse trabalho não teria existido! Muito obrigada pelo apoio, pela compreensão e gambiarras nas horas mais oportunas!

Aos colegas de laboratório Narah, Sarão, Andrea, Luana, Valéria, Carol, Thaline, Pedrão, Victor, Dya, Ítalo, Dani, Talita, Larisse, Gui, Naiara, Ivan, Samara e Priscila, vocês tornaram essa jornada muito mais prazerosa do que eu imaginei. Muito obrigada pelas risadas, pelas ajudas e pela fantástica convivência!

Às Técnicas Aurora e Patrícia pela paciência, pelas risadas, pelo apoio e pelas palavras de sabedoria que só vocês sabem dar!

Às minhas amigas, que Viçosa fez irmãs, Deborah, Laísa, Lays e Sara. Vocês foram fundamentais para que me firmasse nesta cidade, vocês são as melhores amigas que alguém pode ter. Nosso grupo, o mais heterogêneo do mundo, fez de nós amigas para a vida toda! Sinto muita falta de vocês por aqui, mas mesmo assim, nunca me senti desamparada! Muito Obrigada!

Ao Tiago (Tica). Somente Deus pra saber o quanto você é especial para mim! Antes de te agradecer, devo agradecer ao mestrado por nos apresentar... O que começou numa amizade cresceu e hoje faz de você o futuro homem da minha vida! Muito obrigada por fazer parte disso tudo comigo, você fez tornar prazeroso mesmo os momentos mais difíceis! Te amo.

Aos amigos do Espírito Santo: Izaura, Marquinhos, Amanda, Valderes e Larissa pelo apoio e palavras de incentivo. Sempre é bom voltar pra casa... Como não pode faltar: em especial à Larissa Furlan. Como foi difícil vir e deixar você pra trás, muito obrigada por ter me dado tanto apoio, mesmo longe, você sempre será a minha Lalá!

Aos meus padrinhos Leila e Cilas por serem meus segundos pais, exemplo de vida e de pesquisadores. Muito obrigada pelo amor, carinho e preocupação. Vocês são verdadeiros pontos de apoio para mim!

À minha maravilhosa família, meu porto seguro. Ao Ricardinho pelas palavras de encorajamento e admiração, à Aninha pelas ótimas risadas à meia noite (muito obrigada por voltar para o Brasil) e ao Aidan, meu amado sobrinho e afilhado, que me faz querer ser seu exemplo e inspiração! E principalmente aos meus pais que são o meu exemplo de esforço e sabedoria, cada dia mais eu tento ser mais parecida com vocês. Querida família, muito obrigada por me amarem e fazerem dessa caminhada algo tão engrandecedor!

E mais uma vez a Deus, meu pai e amigo, que sem Ele, nada seria possível!

SUMÁRIO

1. Resumo.....	viii
2. Abstract.....	x
3. Introdução.....	1
4. Objetivos.....	5
5. Material e Métodos.....	6
5.1. Área de Estudo.....	6
5.2. Material Botânico.....	6
5.3. Exposição das plantas.....	7
5.4. Análises Microambientais.....	7
5.5. Monitoramento da Poluição Atmosférica do PEI.....	7
5.5.1. Delineamento amostral.....	7
5.5.2. Descrição e preparo dos sistemas de amostragem.....	8
5.5.2.1. Amostragem de gases oxidantes.....	8
5.5.2.2. Amostragem da água da chuva.....	8
5.5.2.3. Metodologia analítica.....	8
5.6. Interpretação dos Sintomas.....	9
5.7. Determinação do Teor de Flúor.....	9
5.8. Análises Anatômicas.....	10
5.9. Análises Micromorfológicas - Microscopia Eletrônica de Varredura....	11
5.10. Análises Fisiológicas.....	12
5.10.1. Determinação da Atividade de Enzimas Antioxidantes.....	12
5.10.1.1. Peroxidases.....	12
5.10.1.2. Catalase.....	12
5.10.1.3. Superóxido Dismutase.....	12
5.10.1.4. Quantificação de Proteínas.....	13
5.10.2. Determinação da Peroxidação de Lipídios.....	13

5.10.3. <i>Determinação de Fenóis Totais</i>	14
5.11. <i>Análises Estatísticas</i>	14
6. Resultados	15
6.1. <i>Análises Microambientais</i>	15
6.2. <i>Monitoramento da Poluição Atmosférica do PEI</i>	15
6.3. <i>Sintomatologia</i>	16
6.4. <i>Determinação do Teor de Flúor</i>	17
6.5. <i>Análises Anatômicas</i>	17
6.6. <i>Análises Micromorfológicas - Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	18
6.7. <i>Análises Fisiológicas</i>	19
7. Discussão	20
Figuras	26
Tabelas	34
8. Referências Bibliográficas	39

1. RESUMO

SANTOS, Eliza Louback Coelho dos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Avaliação da qualidade do ar no Parque Estadual do Itacolomi (PEI-MG) utilizando *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae) como organismo bioindicador.** Orientadora: Luzimar Campos da Silva. Coorientadores: Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos e Juraci Alves de Oliveira.

Dentre os poluentes atmosféricos, o flúor é o de maior fitotoxicidade. Próximo ao Parque Estadual do Itacolomi (PEI) situado no município de Ouro Preto, MG, encontra-se uma fábrica de alumínio, potencial liberadora de flúor na região. Como as massas de ar podem conduzir o flúor liberado pela fábrica para o PEI, é importante verificar a qualidade do ar deste importante parque. *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae), popularmente conhecida como cajá-mirim, foi indicada como bioindicadora de flúor por ter demonstrado elevada sensibilidade em resposta a este poluente. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das imissões de flúor de uma fábrica de alumínio em Ouro Preto, em biomonitoramento ativo utilizando *S. dulcis* como organismo bioindicador. Para tal estudo, indivíduos foram expostos em quatro pontos no PEI (Portaria, Capela, Início da Trilha e Lagoa Seca) e em um ponto na Universidade Federal de Viçosa, como ponto referência (Casa de Vegetação) durante 5 dias. O surgimento de sintomas visuais foi avaliado diariamente ao longo do período de exposição, assim como variáveis ambientais como velocidade do vento, temperatura, umidade relativa e altitude. Foram instalados coletores de água da chuva e filtros coletores de oxidantes nas estantes de exposição durante o período experimental. Ao final das exposições, foram coletados folíolos com e sem sintomas visuais para estudos anatômicos em microscopia de luz, eletrônica de varredura, histoquímica e microanálise de raios-X. Nos folíolos sadios foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidativas, a peroxidação de lipídios e quantificação de fenóis totais. Foi realizada, ainda, a quantificação de flúor na matéria seca das folhas. O flúor se mostrou presente em todos os pontos do PEI, mostrando que o vento pode levar este poluente para as áreas adjacentes. O ponto Portaria foi considerado o mais poluído pelas análises da água da chuva, microanálise de raios-X e quantificação de flúor na matéria seca, pois é o ponto mais próximo à usina. No entanto, as plantas do ponto Lagoa Seca foram as que apresentaram maiores sintomas visuais, devido, provavelmente, aos fortes ventos encontrados nesta localidade que provocaram quebra nas folhas, tornando-se porta de entrada para o poluente. O ponto Início da Trilha foi considerado um ponto menos impactado e com poucos sintomas visuais, apresentando concentrações de poluentes semelhantes ao ponto de referência Casa de Vegetação. Foram visualizados dois tipos de

sintomas nos folíolos: um escurecimento da face adaxial e uma ampla necrose amarronzada. As análises anatômicas mostraram três padrões de danos: necroses superficiais, atingindo apenas o parênquima paliçádico ou o lacunoso, necroses profundas, atingindo todo o mesófilo e necroses pontuais observadas apenas nas nervuras centrais. Em microscopia eletrônica de varredura foram observados perda de turgor e achatamento da parede periclinal externa das células. Nas regiões onde o dano foi mais conspícuo, houve erosão da cera epicuticular com consequente escamação, culminando na ruptura da epiderme e exposição dos tecidos internos. Nos pontos mais poluídos do PEI houve um aumento da atividade enzimática, síntese e acúmulo de compostos fenólicos, com consequente peroxidação de lipídios estruturais devido à grande produção de espécies reativas de oxigênio causadas pelos poluentes. Pelos dados atmosféricos, os poluentes gerados pela fábrica de alumínio estão atingindo o PEI. *Spondias dulcis* mostrou ser uma importante espécie bioindicadora, pois com poucos dias apresentou sintomas visuais e acúmulo de flúor em seus tecidos foliares. A anatomia foliar e a fisiologia vegetal foram importantes biomarcadores para a detecção de alterações causadas pelos poluentes.

2. ABSTRACT

SANTOS, Eliza Louback Coelho dos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, August 2013. **Evaluation of air quality in the Itacolomi State Park (PEI-MG), using *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae) as bioindicator organism.** Adviser: Luzimar Campos da Silva. Co-advisers: Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos and Juraci Alves de Oliveira.

Of all air pollutants, fluoride has the most fitotoxicity. Nearby Itacolomi State Park (PEI-MG), located in the city of Ouro Preto, MG, there's an aluminum plant which might be releasing fluoride in that region. It's important to verify the air quality at the PEI, as the air might conduct the fluoride released by the factory onto the site. *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae), commonly known as cajá-mirim, was selected as a bio-indicator of fluoride for showing a high level of sensitivity in response to that pollutant. This research had the intent to evaluate the fluoride effects of the Ouro Preto plant, with an active bio-monitor utilizing *S. dulcis* as the bio-indicator organism. For such study, the plants were exposed in four areas of the park (Portaria, Capela, Início da Trilha and Lagoa Seca) and at Universidade Federal de Viçosa, as a reference point (Casa de Vegetação). The emerging of visual symptoms was evaluated daily during the exposure, as well as environmental changes such as wind speed, temperature, humidity and altitude. There were installed rain water collectors and oxidant gathering filters on the exposition shelves during the trial period. By the end of the exposure, there were collected leaflets with and without visual symptoms for anatomic studies in light microscopy, scanning electron microscopy, histochemistry and x-ray microanalysis. The activities of the antioxidant enzymes, lipids peroxidation and quantification of phenolic compounds were analyzed on the healthy leaflets. The fluoride quantification on the dry leaf matter was also analyzed. Fluoride was existent in all PEI areas, meaning that the wind might be spreading the pollutant to the nearby land. The front desk area was considered the most polluted by the rain water analysis, x-ray microanalysis and fluoride quantification on the dry leaf matter. However, the plants at the Lagoa Seca area were the ones with the most visual symptoms, probably due to strong winds at that location, breaking the leaves and enabling the pollutant to enter the plants. The trail start area was considered a clean spot, with few visual symptoms, plants showing as much pollution as the ones at the reference point Greenhouse. It was noticed two types of

symptoms on the leaflets: a darkening at the adaxial face and a wide brownish necrosis. The anatomic analysis showed three damage patterns: superficial necrosis, reaching just the palisade and spongy parenchyma, deep necrosis, reaching the entire mesophyll and a punctual necrosis perceived only at the central veins. With scanning electron microscopy it was detected a turgor loss and a flattening of the cell's external periclinal wall. In the areas where the damage was more noticeable, there was an erosion of the epicuticular wax that led to delayering, resulting on the epidermis rupture and internal tissue exposure. At PEI's most polluted areas there were increases of enzyme activity, synthesis and accumulation of phenolic compounds, that led to peroxidation of structural lipids due to the massive production of reactive oxygen species caused by the pollutants. By atmospheric data, the pollutants generated by the aluminum plant are reaching PEI. *Spondias dulcis* was an important bio-indicator species, because in a few days it showed visual symptoms and accumulation of fluoride in their leaf tissues. The anatomy and vegetal physiology were important biomarkers for detecting changes caused by pollutants.

3. INTRODUÇÃO

Nas proximidades de áreas industriais, a vegetação está constantemente exposta a elevados níveis de poluentes gasosos e particulados que são lançados na atmosfera e que podem ser depositados na superfície das folhas e acumulados nos tecidos vegetais (Klumpp *et al.*, 1998).

Dentre os poluentes atmosféricos, o flúor não é o de maior importância com relação aos danos provocados na vegetação, mas é o de maior fitotoxicidade, pois pode causar injúrias em espécies susceptíveis em concentrações atmosféricas 10 a 1.000 vezes menor que os demais poluentes (Weinstein & Davison, 2004). Os principais responsáveis pelo aumento da concentração de flúor na atmosfera são as fundições de alumínio, as fábricas de vidros, cerâmicas e adubos minerais (Weinstein & Davison, 2004).

Nas plantas, o flúor é absorvido principalmente pelas folhas. Quando na forma gasosa, penetra nos tecidos, sobretudo, através dos estômatos e, em menor proporção, pela cutícula (Miller, 1993). Em solução aquosa, o flúor é absorvido por toda a superfície foliar (Chaves *et al.*, 2002), e move-se via apoplasto no interior da folha, chegando até as margens e o ápice por meio da corrente transpiratória, onde é acumulado, promovendo injúrias (Miller, 1993).

As cloroses costumam ser o primeiro sintoma foliar visível em resposta ao flúor, sendo o aumento na concentração deste elemento e o tempo de exposição ao mesmo, os principais responsáveis pelo surgimento de necroses marginais e apicais (Arndt *et al.*, 1995; Fornasiero, 2001; Divan Junior *et al.*, 2007).

As análises microscópicas têm sido utilizadas em conjunto com a sintomatologia tanto para assegurar o diagnóstico correto quanto para esclarecer os mecanismos de fitotoxicidade (Silva *et al.*, 2000; Soda *et al.*, 2000; Fornasiero, 2001; 2003; Vollenweider *et al.*, 2003; Furlan *et al.*, 2006; Sant'Anna-Santos & Azevedo 2007; 2010). Em algumas espécies já foi demonstrado que as alterações na estrutura foliar antecedem o surgimento dos sintomas visuais indicando o valor prognóstico da análise microscópica (Soda *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007). Da mesma forma, podem ocorrer alterações fisiológicas mesmo em concentrações abaixo da capaz de promover tais sintomas. Dentre os danos fisiológicos causados pelo flúor destacam-se a redução da taxa fotossintética, da fluorescência da clorofila 'a' e do teor dos

pigmentos fotossintéticos (Murray, 1984; Ballantyne, 1991; Fornasiero, 2003; Oliva & Figueiredo, 2005; Peixoto *et al.*, 2005; Divan Junior *et al.*, 2007).

O flúor possui a capacidade de inibir a atividade de enzimas fotossintéticas como a ATPase do cloroplasto, a rubisco e a sacarose sintase, afetando os mais importantes processos metabólicos como a fotossíntese, a respiração e o metabolismo de carboidratos (Boese *et al.*, 1995; Oliva & Figueiredo, 2005; Divan Junior *et al.*, 2007).

O flúor apresenta ação direta sobre o metabolismo oxidativo das plantas (Peixoto *et al.*, 2005) e causa a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são comumente formadas nas plantas, durante o processo de respiração celular (Soares & Machado, 2007) na forma de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot^-$) (Mittler, 2002) e são as principais fontes de danos peroxidativos aos componentes celulares (Scandalios, 1993).

Para isto, as plantas apresentam mecanismos de defesa em suas células e compartimentos subcelulares que reduzem os efeitos citotóxicos das ERO com o auxílio de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) (Mittler, 2002). Segundo Cakmak & Horst (1991), em plantas mantidas sob condições de estresse, a degradação inadequada de H_2O_2 faz com que esse excesso participe de processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios de membrana.

O acúmulo de compostos fenólicos tem sido interpretado como um mecanismo de defesa não enzimático das plantas, ativado por fatores bióticos e abióticos que induzem ao estresse (Vaughn & Duke, 1984). De modo geral, os polifenóis possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, pois é um importante doador de prótons H^+ (Barreiros *et al.*, 2006).

O gênero *Spondias* L., pertencente à família Anacardiaceae, possui 18 espécies (Mitchell & Daly, 1995) que se encontram distribuídas em quase todo o Brasil. A espécie *Spondias dulcis* Forst F., popularmente conhecida como cajá-mirim, é uma espécie comercializável no Brasil e seus frutos são utilizados na confecção de polpas, sucos, picolés, sorvetes, néctares e geléias de excelente qualidade e valores nutritivo e comercial (Sacramento & Souza, 2009).

Silva *et al.* (2000), Sant'Anna-Santos & Azevedo (2007) e Sant'Anna-Santos *et al.* (2012) realizaram estudos em que espécies arbóreas tropicais foram submetidas à chuva simulada com fluoreto e perceberam que *S. dulcis* apresentou uma sensibilidade

superior às demais espécies analisadas, destacando assim o seu potencial bioindicador e também seu potencial para o biomonitoramento ambiental.

Entende-se por biomonitoramento o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antropogênicas (Matthews *et al.*, 1982). A utilização de organismos de espécies diferentes para indicar certas condições ambientais tem se tornado bastante frequente ao longo dos anos (Buss *et al.*, 2003). *S. dulcis* vem, então, recebendo destaque como espécie bioindicadora de flúor, devido à rapidez com que responde ao poluente e à facilidade de interpretar sua sintomatologia em relação às demais espécies arbóreas, quando expostas ao flúor.

No município de Ouro Preto, MG, está instalada uma fábrica beneficiadora de alumínio, fonte emissora de fluoreto na atmosfera (Arndt *et al.*, 1995; Weinstein & Davison, 2004). Divan Junior *et al.* (2008) realizaram experimentos com plantas avaliadas no local em que ocorrem (bioindicação passiva) e Divan Junior *et al.* (2008) e Sant'Anna-Santos & Azevedo (2010), com plantas expostas em locais selecionados (bioindicação ativa) no município de Ouro Preto com diversas espécies. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que a concentração interna do flúor, nestas plantas, foi elevada em relação às plantas controle (distante da fonte emissora) e que quanto mais próximas à fonte emissora, maiores os danos às plantas. Tais acúmulos implicaram na formação de amplas necroses e disfunções fisiológicas nas plantas situadas próximas à fonte emissora de flúor.

Próximo à fábrica há uma importante Unidade de Conservação, o Parque Estadual do Itacolomi (PEI). Os campos rupestres abrangem grande parte da área do PEI (Peron, 1989) e apresentam alto índice de endemismo, uma vez que ocorre em locais de condições ecológicas muito particulares (Romero & Nakajima, 1999). A vegetação em torno do parque evidencia sinais visíveis de contaminação por exposição ao flúor, mas a vegetação do PEI não foi avaliada devido ao difícil acesso (Divan Junior *et al.*, 2007). Devido a estes fatos, ressalta-se a importância da verificação da qualidade do ar no PEI, uma vez que a massa de ar pode conduzir o flúor liberado pela fábrica de alumínio e atingir as áreas desta importante área de preservação ambiental.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito das emissões de flúor provenientes de uma fábrica beneficiadora de alumínio, sobre parâmetros macro, microscópicos e bioquímicos em indivíduos de *Spondias dulcis* Forst. F. expostos no Parque Estadual do Itacolomi.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e quantificar os sintomas visuais ocasionados por flúor nos indivíduos de *S. dulcis*;
- Analisar as alterações estruturais e micromorfológicas nos indivíduos submetidos aos poluentes oriundos da fábrica de alumínio situada no entorno do PEI;
- Avaliar a atividade de enzimas do estresse antioxidativo e a peroxidação de lipídios estruturais;
- Avaliar a composição da atmosfera do PEI nos pontos de amostragem a fim de determinar e quantificar o flúor e os oxidantes totais presentes na atmosfera;
- Avaliar a composição da água da chuva no PEI nos pontos de amostragem.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDO

O Parque Estadual do Itacolomi (PEI), regulamentado pela Lei nº 4465 de 19 de julho de 1967, situa-se nos municípios de Ouro Preto e Mariana, no Estado de Minas Gerais, entre os meridianos 43°32'30" e 43°22'30" W e os paralelos 20°22'30" e 20°30'00" S. A área ocupada pelo parque compreende 7000 ha e o ponto mais elevado é o Pico do Itacolomi, com 1772 m de altitude (Messias *et al.*, 1997).

A maior extensão da área do PEI é ocupada pelos Campos Rupestres, que abrangem toda a área acima da cota de 900 m, onde predominam os solos claro-arenosos associados a quartzito (Messias *et al.*, 1997), e se identificam seis tipos básicos de formações vegetais: afloramentos rochosos quartzíticos, campos graminosos, campos brejosos, capões de mata, capões de galeria (Peron, 1989) e campos ferruginosos (Vicent, 2004).

O clima do PEI, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwb, subtropical/tropical de altitude, com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos. A precipitação média anual é de 2018 mm, concentrada nos meses de outubro a março, e a temperatura média anual é de 21°C, com máxima de 33°C e mínima de 4°C (Messias *et al.*, 1997).

5.2. MATERIAL BOTÂNICO

Foram utilizados indivíduos da espécie *Spondias dulcis* Forst. F (Anacardiaceae), espécie tropical sensível ao flúor (Silva *et al.*, 2000). O material testemunho está depositado no herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob o número de registro 19840. Os indivíduos foram obtidos a partir de propagação seminífera provenientes de um único indivíduo adulto, localizado no Sítio Palmital em Viçosa- MG.

Mudas com aproximadamente 3 nós (6 folhas), foram transferidas para casa de vegetação localizada na Unidade de Crescimento de Plantas da UFV, localizada a 649 m de altitude, 20°45'20" de latitude sul e 42°52'40" de longitude oeste. As mudas foram transplantadas em vasos plásticos de 1,0 L, contendo mistura de solo, conforme análise nas tabelas 1 e 2, e devidamente aclimatadas. Após uma semana do transplântio, as plantas receberam solução nutritiva de Hoagland a 1/4 de força iônica (Hoagland &

Arnon, 1950), a cada cinco dias, durante o período de aclimação até atingirem 40 cm de altura e cerca de 7 nós por planta (14 folhas).

5.3. EXPOSIÇÃO DAS PLANTAS

Os experimentos consistiram na exposição ativa dos indivíduos aclimatados de *S. dulcis* em quatro localizações distintas no PEI: Portaria (portaria do PEI), Capela (Capela do PEI), Início da Trilha (início da trilha para o Pico do Itacolomi, no interior da mata) e Lagoa Seca (Campo Rupestre, no caminho para o Pico) (Figura 1). As coordenadas geográficas das localizações encontram-se na tabela 3. Uma estação referência foi montada na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), na Universidade Federal de Viçosa (UFV), cujas coordenadas geográficas se encontram na tabela 3. Em cada local de exposição foram utilizados seis indivíduos (n=6) a 1,5 m do solo, organizados em estações padronizadas, de acordo com os padrões internacionais de controle da qualidade do ar para bioindicadores (Arndt & Schluter, 1985) (Figura 2A). A exposição ocorreu entre os dias 07 a 12/03/2013, totalizando 5 dias de exposição.

5.4. ANÁLISES MICROAMBIENTAIS

As avaliações microambientais foram realizadas durante as exposições no PEI, e as medições foram realizadas próximas aos indivíduos nas estantes, entre 10:00 e 13:00 h.

Os parâmetros avaliados foram: velocidade do vento ($m\ s^{-1}$), temperatura ($^{\circ}C$), umidade relativa (%) e altitude (m). Os dados foram obtidos por meio do equipamento Kestrel (modelo 4300, Nielsen-Kellerman, USA).

5.5. MONITORAMENTO DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA DO PEI

5.5.1. Delineamento amostral

A rede de amostragem foi realizada nos mesmos pontos em que os indivíduos de *S. dulcis* foram expostos. Em cada ponto de amostragem, foi colocado um amostrador passivo contendo um filtro para gases oxidantes gerais. Durante a exposição, os amostradores foram adaptados a placas plásticas com bordas côncavas, semelhante a funis, para protegê-los contra chuva e sol, a uma altura aproximada de 1,5 m do solo.

Concomitantemente à amostragem da coleta de gases, foi realizada a coleta de água da chuva em recipiente específico. O tempo de exposição do amostrador passivo para gases oxidantes gerais e da água da chuva foi de 2 dias.

5.5.2. Descrição e preparo dos sistemas de amostragem

5.5.2.1. Amostragem de gases oxidantes

Foram utilizados filtros de celulose cortados com 5 cm de diâmetro para adaptação no fundo do amostrador passivo (suporte escuro com apenas um orifício de entrada para o gás). Alíquotas de 500 μL da solução de impregnação para oxidantes gerais ($\text{KI } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionadas aos filtros, sendo posteriormente secos em dessecador contendo sílica gel por 48 h (Ferm et al. 1997).

5.5.2.2. Amostragem da água da chuva

As amostras dos eventos de chuva ocorridos no período foram coletadas em sistema constituído de frascos de plástico de 2,5 L, funil de plástico de 30 cm de raio e tela de poliéster entre o frasco e o funil para remoção de resíduos sólidos.

5.5.2.3. Metodologia analítica

Os filtros dos amostradores passivos dos gases oxidantes foram transferidos para uma placa de petri e foram adicionados 10 mL de água deionizada. Foi produzido um composto amarelado, que foi lido em espectrofotômetro (modelo Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis, Madison, USA) em comprimento de onda de 352 nm.

Medidas de volume, pH (Hanna Instruments pH/mV, São Paulo, Brasil) e condutividade (Micronal modelo B331, São Paulo, Brasil) foram realizadas nas amostras dos eventos de chuva. A análise de cátions e ânions foi feita em amostras de 50 mL de água de chuva, por cromatografia de troca iônica, utilizando-se o cromatógrafo (modelo 761, Metrohm, Herisau, Suíça) acoplado a um detector condutométrico. O controle da instrumentação e o tratamento das informações analíticas foram efetuadas com o software Metrohm 761 PC V.1.1. As condições analíticas para determinação dos ânions foram: coluna aniônica Metrosep A-Supp5 (250mmx4mm), solução eluente de Na_2CO_3 4,0 mmol L^{-1} / NaHCO_3 1,0 mmol L^{-1} ; vazão de 0,7 mL min^{-1} ; volume da amostra de 20 μL , coluna supressora Metrohm e regenerante solução

de H_2SO_4 50 mmol L^{-1} - água desionizada sob vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Para determinação dos cátions, as condições analíticas foram: coluna catiônica Metrosep modelo C2 150 (150 x 4 mm) da Metrohm, eluente solução de ácido tartárico 4 mmol L^{-1} / ácido dipicolínico $0,75 \text{ mmol L}^{-1}$ em 5% de acetona, volume de amostra de $100 \mu\text{L}$, fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e sistema de supressão eletrônico Metrohm. As determinações analíticas foram feitas utilizando-se curva analítica de calibração na faixa de concentração de 5 a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Souza *et al.*, 1999). Os procedimentos foram realizados no Instituto de Astronomia e Geociências (IAG) da Universidade de São Paulo (USP).

5.6. INTERPRETAÇÃO DOS SINTOMAS

Durante o período de exposição das plantas no PEI, todas as folhas de cada um dos indivíduos ($n=6$), em todos os locais, foram fotografadas diariamente, com o objetivo de registrar o início e a evolução dos sintomas ocasionados pelo poluente. Para a estimativa da porcentagem de área foliar afetada todas as folhas de todos os indivíduos foram analisadas individualmente e receberam um valor correspondente à sua área foliar afetada. Foi realizada, então, uma média de fitotoxicidade para cada indivíduo de cada ponto de exposição no PEI.

Para a classificação da fitotoxicidade dos poluentes atmosféricos do PEI, foi utilizada a seguinte escala: levemente injuriada (com manchas necróticas e cloróticas esparsas), moderadamente injuriada (de 30 a 50% da área foliar necrosada), muito injuriada (de 50 a 70% da área foliar necrosada) e extremamente injuriada (com mais de 70% da área foliar necrosada) conforme utilizada por Silva *et al.* (2000).

5.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLÚOR

Para a quantificação do teor de flúor, folhas dos indivíduos de todos os tratamentos foram secas em estufa, a $65 \text{ }^\circ\text{C}$, e reduzidas em moinho analítico portátil (Quimis modelo Q298A, São Paulo, Brasil). Posteriormente, alíquotas de $0,5 \text{ g}$, de cada repetição, foram submetidas à extração em ácido perclórico $0,1 \text{ M}$ (Garcia-Ciudad *et al.*, 1985), utilizando-se o ajustador de força iônica (Larsen & Widdowson, 1971), para determinação potenciométrica do flúor, com eletrodo específico (Thermo Scientific Fluoride Ions Selective Electrode, Massachusetts, EUA) ligado ao aparelho analisador de íons (Orion Research Incorporated EA 920, Massachusetts, EUA).

5.8. ANÁLISES ANATÔMICAS

Após o término da exposição, foram coletadas folhas com folíolos completamente expandidos, do terceiro nó, a partir da gema apical, de indivíduos de todos os locais de exposição no PEI, contendo necroses visuais e folíolos dos indivíduos do ponto de referência. Os fragmentos foram retirados de regiões sem sintomas visíveis, de folíolos com sintoma, para a caracterização de alterações anatômicas (prévias aos sintomas visuais) e de regiões com sintomas visuais para caracterização de necroses.

Para os estudos anatômicos, as amostras foliares foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (10%), em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio 5 mM (Karnovsky, 1965). Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica crescente e incluído em historresina glicol-metacrilato, segundo Gerrits (1964). Para a detecção de compostos fenólicos, amostras foliares foram fixadas em formaldeído a 4% e sulfato ferroso a 10% (Johansen, 1940) e em metanol PA como extrator de compostos fenólicos para o branco do teste. Após as fixações, os fragmentos foram desidratados em série butílica terciária crescente e incluídos em parafina histológica Histosec. A desparafinização dos materiais foi realizada utilizando-se xilol.

Cortes transversais e paradérmicos com 5 μ m de espessura foram obtidos tanto para materiais incluídos em historresina quanto em parafina. Os materiais incluídos em historresina foram seccionados com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e corados em Azul de Toluidina (pH 4,4) (O'Brien & McCully, 1981). Os materiais incluídos em parafina foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo de avanço manual (modelo 820 Spencer, American Optical Corporation, USA). As lâminas permanentes foram montadas em Permout.

Para avaliar a morte celular foi realizado teste com azul de Evans em amostras foliares imediatamente após a finalização dos tratamentos. Este teste consiste na imersão das amostras foliares durante 1 min numa mistura de fenol, ácido láctico, glicerol e água destilada contendo 20 mg mL⁻¹ de azul de Evans (1:1:1:1). A mistura foi preparada imediatamente antes da utilização. As amostras foram então clarificadas durante a noite numa solução de 2,5 g mL⁻¹ de cloridrato e água (Iriti *et al.*, 2003, modificado de Keogh *et al.*, 1980). As células mortas ficaram coradas variando de azul

claro a escuro, dependendo da fase da degradação da membrana celular tal como mencionado por Faoro & Iriti (2005).

Todas as imagens foram capturadas utilizando-se um microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema de captura de imagens (modelo Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

5.9. ANÁLISES MICROMORFOLÓGICAS – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As mudanças estruturais provenientes da exposição ao flúor foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e em MEV com sonda EDS acoplada, com a qual também foram realizadas microanálises de raios-X a fim de identificar os elementos químicos presentes na superfície foliar das plantas.

Logo após o término da exposição no PEI, amostras foliares do 3º nó das plantas foram coletadas com e sem sintomas visuais para análise em MEV. Para isto, foram fixadas em solução de Karnovsky (solução de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio pH 7,2, acrescido de cloreto de cálcio 5 mM) (Karnovsky, 1965). As amostras de folíolos foram desidratadas em série etílica e secas ao ponto crítico com auxílio do equipamento Critical Point Dryer (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A superfície dos folíolos foi coberta com ouro em metalizador (Sputter Coater modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein).

A análise qualitativa da composição química elementar dos compostos presentes na superfície foliar dos indivíduos expostos foi realizada a partir da técnica de microanálise por energia dispersiva de raios-X (EDS). Para isto, amostras foliares coletadas do 3º nó, logo após o término da exposição, com e sem sintomas visuais, foram desidratadas em sílica e, posteriormente, submetidas à vaporização com carbono (Quorum Technologies Q150T-E, Reino Unido).

Para o registro das imagens, ambos os procedimentos foram fotodocumentados em microscópio eletrônico de varredura (modelo 1430 VP, LEO, Cambridge, Inglaterra) acoplado à sonda EDS (IXRF systems X-EDS, 1430 LEO, Houston, EUA) utilizando o software Iridium Ultra, pertencente ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

5.10. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.10.1. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

A extração enzimática foi obtida pela homogeneização de 0,3 g de folíolos de *S. dulcis* sem sintomas aparentes macerados em nitrogênio líquido. A seguir, foram adicionados 2 mL de meio de extração (EDTA 0,1 M, PMSF 1 mM e PVPP 1%) e seguido de centrifugação a 12.000g, por 15 min, à temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram executadas a 4°C.

5.10.1.1. Peroxidases (POX EC1.11.1.7): a atividade das POX foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 6,8, pirogalol 20 mmol L⁻¹ e H₂O₂ 20 mmol L⁻¹ (Kar & Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25°C em espectrofotômetro UV/Visível (modelo CARY-100, Varian, Australia) e analisado pelo software Kinetics. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance, 1955) e expressa em μmol de H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ proteína.

5.10.1.2. Catalase (CAT EC1.11.1.6): a atividade da CAT foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mmol L⁻¹ (Havir & Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm, a 25°C em espectrofotômetro UV/Visível (modelo CARY-100, Varian, Australia) e analisado pelo software Kinetics. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson *et al.*, 1995) e expresso em μmol de H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ proteína.

5.10.1.3. Superóxido dismutase (SOD EC1.15.1.1): a atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 5 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 7,8, contendo metionina 13 mmol L⁻¹, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μmol L⁻¹, EDTA 0,1 mmol L⁻¹ e

riboflavina $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. A reação foi conduzida a 25°C , numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm em espectrofotômetro UV/Visível (Hitachi modelo U-5100, California, EUA). A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis & Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

5.10.1.4. Quantificação de Proteínas: A quantificação de proteínas foi feita segundo a metodologia de Bradford (Bradford, 1976), utilizando BSA como padrão. Foram adicionados 50 μL do sobrenadante da amostra previamente obtida para extração enzimática, 150 μL de água e 1000 μL de reagente de Bradford em um tubo eppendorf. Esta substância foi lida em leitor de placa de Elisa (modelo UVM 340, Asys HiTech, Austria) num comprimento de onda de 595 nm e analisado por software Mikronwin 2000.

5.10.2. Determinação da peroxidação de lipídios

O grau de peroxidação de lipídios foi medido com a quantificação de malondialdeído (MDA), considerado um indicador geral de peroxidação lipídica.

Amostras de 0,3 g de folíolos de *S. dulcis* sadios e sem sintomas aparentes maceradas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v). Os homogeneizados foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 12.000g por 15 min. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C . Alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 1,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v) e os tubos de ensaio fechados foram incubados em banho-maria a 95°C . Após 2 h, a reação foi paralisada transferindo-se os tubos de ensaio para banho de gelo. Posteriormente, foram centrifugados a 9.000g por 10 min e a absorvância dos sobrenadantes, determinada a 532 nm. A absorvância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi

calculada usando-se o coeficiente de absorvidade molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath & Packer, 1968).

5.10.3. Determinação de Fenóis Totais

A extração para a determinação dos fenóis totais foi obtida pela homogeneização de 0,3 g de folha macerada em nitrogênio líquido de folíolos de *S. dulcis* sem sintomas aparentes. A seguir, foram adicionados 2 mL de metanol 80% e posterior centrifugação a 10.000 g, por 15 min, à temperatura de 4°C. Foram utilizados 5 µL do sobrenadante desta extração e adicionados a 205 µL de água, mais 1050 µL de reagente de Folin Ciocalteu 1:1 e 630 µL de Na_2CO_3 20%. Após o preparo da reação, esperou-se 30 min e posteriormente, foi lido em leitor de placa de Elisa em 725 nm (Bialeski & Turner, 1966).

5.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizados, sendo seis repetições por tratamento (n=6). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISES MICROAMBIENTAIS

Os resultados da velocidade do vento, temperatura, umidade relativa e altitude avaliados no PEI ao longo do período de exposição encontram-se na Tabela 3. Destaca-se o ponto Lagoa Seca, o mais distante da fonte emissora e o ponto mais amplo e de maior altitude, inserido na região de campo rupestre no PEI e que, conseqüentemente, apresenta os maiores valores médio da velocidade do vento ($1,2 \text{ m s}^{-1}$).

6.2. MONITORAMENTO DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA DO PEI

O monitoramento da poluição atmosférica no PEI foi realizado concomitantemente ao período de exposição dos indivíduos de *Spondias dulcis*, constituindo análises pontuais.

O pH da água da chuva apresentou valores normais para água de chuva em todos os pontos de exposição do PEI, variando de 5,55 no ponto Capela a 6,31 no ponto Início da Trilha. A condutividade variou de $10,65 \mu\text{S}$ no ponto Capela a $20,00 \mu\text{S}$ no ponto Início da Trilha (Tabela 4).

Quanto aos valores dos gases oxidantes encontrados no PEI, o menor valor foi encontrado no ponto referência Casa de Vegetação, e o maior valor foi registrado no ponto Lagoa Seca. Os pontos Portaria, Capela e Início da Trilha apresentaram valores intermediários, de $27,03 \mu\text{mol L}^{-1}$; $22,56 \mu\text{mol L}^{-1}$; $0,66 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 4).

Com a quantificação dos íons da água da chuva, foram encontrados os cátions Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} e os ânions F^- , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , Acetato, Formiato e Oxalato. Mesmo havendo maior variedade de ânions em relação aos cátions, os valores encontrados revelaram uma grande quantidade de cátions totais em relação à quantidade de ânions. Dentre os elementos encontrados, destacam-se os ânions fluoreto (F^-), nitrato (NO_3^-) e sulfato (SO_4^{2-}). As concentrações de F^- , NO_3^- e SO_4^{2-} foram maiores no ponto Portaria em comparação aos demais locais, seguidos do ponto Capela, que apresentou quantidades de F^- e NO_3^- maiores que os pontos Início da Trilha e Lagoa Seca, porém foi o ponto que apresentou menores valores de SO_4^{2-} . Logo depois do ponto Capela, o ponto Lagoa Seca apresentou o terceiro maior valor de F^- e NO_3^- porém, apresentou quantidades de SO_4^{2-} tão altos quanto o ponto Portaria. Quanto ao ponto Início da

Trilha, em exceção ao SO_4^{2-} que apresentou valores levemente maiores que os do ponto Capela, foi o ponto considerado menos afetado pela poluição, devido aos baixos valores de F^- e NO_3^- (Tabela 5).

6.3. SINTOMATOLOGIA

Os sintomas visuais começaram a surgir 48 h após o início da exposição no ponto da Lagoa Seca. Após 72 h, todas as localizações no PEI já mostravam sintomas visíveis nas folhas dos indivíduos de *S. dulcis* (Figura 2B-F).

Foram visualizados dois tipos de sintomas nos folíolos: um escurecimento da face exposta (em geral a adaxial), sem um padrão específico, surgindo entre as nervuras de segunda ordem e culminando no escurecimento de toda a superfície foliar (Figura 2B e C); e uma ampla necrose amarronzada (Figura 2E). O primeiro tipo de injúria foi o sintoma mais abundante entre os indivíduos de *S. dulcis* e ocorreu em todos os pontos, exceto nas plantas do ponto referência. Já o segundo tipo foi encontrado com maior frequência nos indivíduos localizados no ponto Lagoa Seca e raramente nas localidades Portaria e Capela. Ao avaliar a porcentagem da área foliar danificada, foram considerados os dois tipos de injúrias, na mesma folha analisada, gerando um único valor referente aos danos visuais.

Em geral, os indivíduos expostos no ponto Lagoa Seca foram os que mais apresentaram sintomas aparentes, com 43,44 % de área foliar injuriada, sendo classificados como injurias moderadas, seguidos dos indivíduos localizados nos pontos Portaria, com 25,05 %, e Capela, com 23,59 % de área foliar injuriada, que receberam a classificação sintomática de injúrias leves. Os indivíduos expostos no ponto Início da Trilha, com 3,58 % e no ponto da Casa de Vegetação, com 0 % de área foliar injuriada, mostraram menos sintomas aparentes, sendo classificados como sem injúrias aparentes (Tabela 6).

6.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLÚOR

De acordo com a quantificação do flúor na matéria seca, o ponto Portaria apresentou maior acúmulo de flúor nas folhas, com $2,74 \mu\text{g g}^{-1}$, seguidos dos pontos Lagoa Seca, com $1,82 \mu\text{g g}^{-1}$, e Capela, com $1,65 \mu\text{g g}^{-1}$. O ponto Início da Trilha apresentou $1,37 \mu\text{g g}^{-1}$, e não diferiu estatisticamente do ponto referência Casa de Vegetação, com $1,09 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 7).

6.5. ANÁLISES ANATÔMICAS

Os folíolos de *S. dulcis* são glabros (Figura 8A-B), com epiderme unisseriada, anfi-hipostomáticos, com os estômatos na face adaxial limitados à nervura central. O mesofilo é dorsiventral, apresentando idioblastos cristalíferos contendo drusas (Figura 3B). O parênquima paliçádico é formado por uma camada de células, e o lacunoso por quatro a cinco camadas de células braciiformes (Figura 3C-F). A nervura central é constituída por feixes colaterais (Figura 5G) e observam-se canais secretores, presentes também nas margens dos folíolos, sendo evidenciados ainda idioblastos acompanhando todo o sistema vascular e no entorno dos canais secretores (Figuras 3 A-B e 4A-C e G-D). A presença de gotículas de compostos fenólicos foi marcante nos indivíduos expostos em todas as localizações do PEI. Essas gotículas localizam-se nas proximidades dos feixes vasculares, nos canais secretores, nos parênquimas paliçádico e lacunoso (Figuras 3E-H e 4B-C, E-F e H-I).

Foram encontrados três padrões de danos anatômicos causados pela poluição: necroses superficiais, atingindo apenas o parênquima lacunoso (Figura 5A-C) ou o paliçádico (Figura 5D-F), necroses profundas, atingindo todo o mesofilo (figura 6 A-F) e necrose pontual observada apenas nas nervuras centrais (Figura 5G-I). Entre as necroses superficiais, foi mais comum o aparecimento de necroses iniciadas na face adaxial do que as que se iniciaram na face abaxial.

Os danos encontrados no mesofilo, em geral, se desenvolveram com um adensamento do citoplasma e acúmulo de compostos fenólicos nas células (Figura 5A-I), seguidos de retração de todo o protoplasto (Figura 5D) e deformação da parede celular (Figuras 5A-C e E e 6A-B e D-E). Posteriormente, o dano se acentuou, tornando as células colabadas (Figuras 5F e 6C e F). Este dano pode se alastrar por todo o mesofilo, chegando a atingir as duas faces da folha (Figura 6A-F). No caso do dano

encontrado na nervura central, ocorre um acúmulo de compostos fenólicos nas células do colênquima voltado para a face abaxial, seguido de uma pequena atividade mitótica dessas células, culminando na formação de uma estrutura intumescida rica em compostos fenólicos (Figura 5G-I).

A morte celular foi detectada positivamente em azul pelo teste de Azul de Evans em todos os tratamentos, incluindo o ponto referência (Figuras 7A, C e E), mas o número de conjuntos de células mortas foi maior nos pontos Portaria (Figuras 7B, D e F), Capela e Lagoa Seca, sendo o último mais fortemente corado de azul. Os grupos celulares estão normalmente associados próximos às terminações xilemáticas, e o corante se associa aos cloroplastos dos parênquimas paliçádico e lacunoso (Figura 7D-F).

6.6. ANÁLISES MICROMORFOLÓGICAS – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Em todas as localidades do PEI observaram-se danos micromorfológicos na epiderme em ambas as faces dos folíolos de *S. dulcis*.

As células da epiderme da face adaxial apresentaram perda de turgor e achatamento da parede periclinal externa, conferindo a muitas células um aspecto enrugado, alteração do relevo das células e a formação de concavidades em algumas regiões da lâmina foliar (Figura 8C). A cera apresentou aspecto pulverulento, mas nas regiões onde o dano foi mais conspícuo, houve ruptura da epiderme e exposição dos tecidos internos (Figura 8E e G).

Na epiderme da face abaxial da folha, ocorreram os mesmos padrões de danos que o descrito para a epiderme da face adaxial, porém houve colonização de algumas regiões da superfície foliar por fungos (Figura 8H).

Para a microanálise por energia dispersiva de raios-X, os elementos selecionados foram os mesmos previamente detectados na análise da água da chuva.

Os elementos quantificados foram abundantes em todos os pontos, muitas vezes em grandes quantidades como foi o caso do Ca e do K. Entretanto, estes elementos não mostraram um padrão de distribuição entre as faces abaxial (ABA) e adaxial (ADA). O flúor apresentou um padrão de distribuição entre as faces adaxial e abaxial das folhas, pois nos indivíduos expostos nos pontos Portaria, Capela e Lagoa Seca, foram encontrados valores de 5,85 %; 5,46 %; 5,93 %, respectivamente, na face ADA e em

torno de 1,5% na face ABA. Nos indivíduos expostos no Início da Trilha e no ponto referência Casa de Vegetação, os valores entre as faces não apresentaram diferença (Tabela 8).

6.7. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Com a análise das atividades das enzimas do sistema antioxidativo dos indivíduos de *S. dulcis*, pode-se perceber que, os pontos Portaria e Capela apresentaram, no geral, maiores valores de CAT, SOD e POX e os pontos Início da Trilha, Lagoa Seca e Casa de vegetação, os menores valores, sendo que o na Lagoa Seca os níveis de POX foram elevados em relação ao ponto de referência Casa de Vegetação. (Tabela 9).

A determinação dos fenóis totais evidenciou que os indivíduos de *S. dulcis* presentes no ponto Portaria apresentaram os maiores valores de compostos fenólicos, seguidos dos pontos Lagoa Seca e Capela, em relação aos indivíduos presentes na Casa de Vegetação. Os indivíduos do ponto Início da Trilha apresentaram valores de compostos fenólicos muito próximos aos indivíduos do ponto Casa de Vegetação (Tabela 9).

Quanto à determinação da peroxidação de lipídios, foi observado em *S. dulcis* que os indivíduos presentes no ponto Portaria apresentaram os maiores valores de MDA, seguidos dos pontos Capela, Início da Trilha e Lagoa Seca, em relação aos indivíduos no ponto de referência Casa de Vegetação (Tabela 9).

7. DISCUSSÃO

A composição da água da chuva é uma combinação da composição química das gotículas que formam as nuvens e das substâncias que se incorporam às gotas de chuva durante a precipitação (Souza *et al.*, 2006). Sendo assim, a água da chuva, de certa forma, retrata as características da massa de ar, no que diz respeito ao conteúdo de partículas e gases solúveis em água, através da qual atravessam as gotas de chuva durante a precipitação (Seinfeld, 1986).

Uma vez que os íons de sódio, potássio, magnésio e cloro são provenientes de origem natural e em geral são espécies benéficas em baixas concentrações nas chuvas, estes íons têm um significado ambiental relativamente menor que os demais compostos encontrados (vanLoon & Duffy, 2005). Quanto ao enxofre e nitrogênio, suas fontes podem ser tanto de origem natural quanto antropogênica, e, portanto, são de particular interesse, pois juntos criam o fenômeno conhecido como chuva ácida (vanLoon & Duffy, 2005).

O pH da chuva é naturalmente ácido, em torno de 5,6 (Schindler, 1988), e em valores menores pode-se considerar como chuva ácida devido principalmente às elevadas concentrações dos ânions SO_4^{2-} e NO_3^- . Como os valores de pH da chuva no Parque Estadual do Itacolomi (PEI) se encontravam acima de 5,6 considera-se que as concentrações de SO_4^{2-} e NO_3^- ainda não são preocupantes nos arredores do PEI.

Os valores de flúor encontrados na água da chuva, mesmo sendo relativamente inferiores às concentrações dos outros elementos, devem ser levados em consideração, pois dentre os poluentes atmosféricos, o flúor é o de maior fitotoxicidade, podendo causar injúrias em espécies suscetíveis em concentrações atmosféricas 10 a 1.000 vezes menor que outros poluentes (Weinstein, 1977). No ponto Portaria, os valores de fluoreto encontrados foram os maiores, devido, provavelmente, à proximidade deste ponto da fonte emissora, seguido dos pontos Capela e Lagoa Seca. O ponto Lagoa Seca, apesar de ser o mais afastado da fonte emissora, apresentou os altos valores de fluoreto na chuva o que pode ser explicado pelos fortes ventos no local, que podem deslocar as imissões para as regiões mais altas do PEI. No ponto Início da Trilha, os valores foram ligeiramente mais baixos, provavelmente, devido à sua localização no interior da mata.

Apresença de ânions carboxílicos acetato, formiato e oxalato na água da chuva do PEI mostra que a fábrica está liberando poluentes primários e estes podem estar reagindo entre si. Isto se dá pois, os maiores valores de ânions carboxílicos foram

encontrados afastados da fonte emissora, presumindo-se, então, que estes poluentes apresentam origem secundária, uma vez que, na atmosfera, os ácidos carboxílicos carregados pelo vento são formados por reação fotoquímica (Souza & Carvalho, 2001).

A poluição do ar por oxidantes fotoquímicos consiste numa mistura de espécies como ozônio, dióxido de nitrogênio, peroxiacetilnitrato e peróxido de hidrogênio. Esses e outros poluentes são produzidos como resultado da ação da luz solar nos óxidos de nitrogênio e hidrocarbonetos reativos, sendo que, em geral, esses poluentes não são de origem primária, mas sim resultado de reações na atmosfera, depois da sua emissão principalmente devido à queima de combustíveis (vanLoon & Duffy, 2005). No PEI, o ponto Lagoa Seca apresentou maiores quantidades de oxidantes, uma vez que sua área ampla e aberta e, principalmente de maior altitude, favorecem estes altos níveis (Bobbink, 1998). Em compensação, o ponto Início da Trilha apresentou níveis extremamente baixos quando comparados às demais localidades do PEI, devido ao fato desse ponto estar protegido no interior da mata.

Vale salientar que os dados atmosféricos obtidos no PEI foram resultados de análises pontuais, ou seja, uma única análise foi realizada para cada parâmetro durante o experimento, sendo estes dados preliminares para a caracterização da atmosfera do PEI.

A susceptibilidade ao flúor varia com a espécie (Weinstein & Davison, 2004). No campo, a sintomatologia vem sendo utilizada para monitorar os efeitos do estresse causado por diversos fatores bióticos e abióticos (Vollenweider *et al.*, 2003). Ao serem expostos em vários pontos no PEI, os indivíduos de *Spondias dulcis* apresentaram rápido acúmulo de fluoreto em seus tecidos, como ocorreu com indivíduos desta espécie expostos nas proximidades desta mesma fábrica, na cidade de Ouro Preto (Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2010).

A necrose típica causada por flúor descrita na literatura para a espécie (Silva *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006a, 2012) ocorreu de forma escassa nos pontos do PEI Portaria e Capela, porém, foi amplamente visualizada nos indivíduos do ponto Lagoa Seca, mesmo não sendo o local no PEI que apresentou maior concentração de flúor na água da chuva. Isto provavelmente ocorreu devido à forte incidência de ventos no ponto Lagoa Seca e a maior quantidade de oxidantes no local. A elevada velocidade do vento causou quebras em muitas folhas, sendo assim, porta de entrada dos poluentes para o interior dos seus tecidos. Isto foi evidenciado pela quantificação do flúor na matéria seca das plantas, uma vez que houve

grande acúmulo de flúor nos tecidos destes indivíduos, mesmo o local apresentando valores menores na quantificação da água da chuva em relação aos demais pontos.

O escurecimento observado na face adaxial das folhas de *S. dulcis*, neste trabalho, é visualmente semelhante às injúrias causadas por ozônio (Vollenweider *et al.*, 2003). Entretanto, o padrão desenvolvido nos folíolos foge da descrição dos padrões encontrados para necroses causadas por este poluente, uma vez que os sintomas surgem e se estabelecem entre as nervuras de segunda ordem (Vollenweider *et al.*, 2003) e o observado em *S. dulcis* foi um bronzeamento generalizado em toda a superfície foliar. Presume-se, então, que este sintoma pode ter ocorrido em função de outros poluentes ou até mesmo da combinação de poluentes, resultantes das reações químicas entre os poluentes primários lançados na atmosfera (Runeckles, 1984), oriundos da usina implantada próximo ao PEI e encontrados na água da chuva.

O flúor na sua forma gasosa adentra o interior dos tecidos vegetais através dos estômatos (Miller, 1993; Peixoto *et al.*, 2005). Algumas necroses se iniciaram pela face abaxial, porém houve muito mais injúrias que se iniciaram a partir da face adaxial. Isso pode ter ocorrido devido às chuvas que ocorreram durante o período de exposição das plantas e assim, o poluente se encontrava mais diluído na precipitação do que livre na forma gasosa (Weinstein & Davison, 2004). O acúmulo de gotas de chuva na superfície foliar, principalmente na face adaxial, mais exposta, favorece a remoção da camada de ceras epicuticulares e a desestruturação da cutícula (Sant'Anna-Santos, 2008). A remoção destas camadas, conforme observado nas eletromicrografias de varredura de *S. dulcis*, neste estudo, facilitou a entrada do poluente no interior dos tecidos adjacentes, gerando as injúrias.

A presença de grupos celulares corados de azul pelo teste de Azul de Evans indica que houve morte celular em regiões da folha de *S. dulcis*. O depósito de células mortas na face abaxial das folhas, próximo aos estômatos, neste trabalho, pode ser um indício de que a morte celular ocorreu devido aos gases dos poluentes (Gerosa *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011) e progressivamente atingiram os tecidos subsequentes. Este teste mostrou ser um importante prognóstico para a detecção de morte celular, mesmo quando injúrias ainda não são visualizadas (Faoro & Iriti, 2005).

Os danos micromorfológicos nas faces adaxial e abaxial da folha dos indivíduos de *S. dulcis* expostos em todas as localidades do PEI ocorreu, em parte, devido à perda de turgidez das células epidérmicas, causando modificações do contorno das paredes

anticlinais, em ambas as faces da folha (Sant'Anna-Santos *et al.*, 2012). A plasmólise das células epidérmicas foi mais acentuada na face adaxial da folha, provavelmente, devido ao período chuvoso durante a execução do experimento.

O surgimento de hifas fúngicas em *S. dulcis* já foi relatado anteriormente em experimento de simulação (Sant'Anna-Santos & Azevedo, 2007). Com a erosão da cutícula, esta camada hidrofóbica é, em parte, perdida, facilitando a formação de um filme de água, importante para os processos vitais da patogênese (Pascholati & Leite, 1995; Pozza *et al.*, 2004), facilitando então o desenvolvimento de fungos e outros patógenos.

Mesmo sendo uma análise qualitativa, a microanálise por energia dispersiva de raios-X foi um bom suporte para determinar que houve deposição de material particulado na superfície foliar. Os elementos encontrados apresentaram distribuição homogênea entre as faces adaxial e abaxial, indicando que estes elementos são constituintes comuns da atmosfera local. Entretanto, o flúor estava em maior abundância na face adaxial, indicando que este elemento foi depositado por um evento específico, provavelmente a chuva. Quando ocorre chuva, as gotículas tendem a se adensar na face adaxial mais do que na face abaxial, causando injúrias à superfície foliar.

Quando se analisa o flúor como poluente em questão, poucos são os trabalhos que relatam a quantificação da atividade das enzimas do estresse antioxidativo provocado por ele em plantas, sendo geralmente estudada a relação entre essas enzimas e animais expostos (Wang, 1995; Ghosh *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2003).

No Parque Estadual do Itacolomi, mesmo com os altos valores observados no ponto Portaria para SOD, CAT e compostos fenólicos, houve peroxidação lipídica, confirmada pelos altos valores de MDA, o que pode ser resultado da ação direta do flúor e agentes oxidantes. Já no ponto Capela, as enzimas CAT e a POX apresentaram alta atividade antioxidante, mas, provavelmente, não foram suficientes para eliminá-lo, pois mesmo com altos valores de compostos fenólicos, houve peroxidação de lipídios. Estes dados confirmam que as plantas expostas nestes pontos se encontravam estressadas pela poluição.

No ponto Início da Trilha apenas a enzima SOD apresentou incremento na atividade, o que não foi suficiente para impedir os danos decorrentes da peroxidação lipídica evidenciado pelo aumento nas concentrações de MDA. Mesmo assim, não

foram suficientes para gerar grandes danos visuais. Os baixos valores de compostos fenólicos também são um indicativo que as plantas deste ponto não se encontravam estressadas.

No ponto Lagoa Seca ocorreu uma provável inibição ou degradação da SOD e da CAT, pois seus valores foram os mais baixos em comparação a todos os pontos, inclusive ao ponto referência Casa de Vegetação, contudo os níveis de POX foram altos. A POX é a enzima mais resistente entre as enzimas do sistema antioxidativo (Kar & Mishra, 1976), sendo este um indício que as demais enzimas podem ter sido degradadas, uma vez que este é o ponto onde as plantas mais apresentaram danos visuais. A baixa concentração de MDA pode ser relacionada à utilização de folíolos mais jovens para esta análise neste ponto, visto que os fortes ventos no local levaram à perda de muitas folhas, limitando assim a disponibilidade de folíolos para as análises. Deste modo, utilizando-se um folíolo jovem, não completamente expandido, suas funções fisiológicas não corresponderiam à de um folíolo adulto (Taiz & Zeiger, 2009), havendo então baixa peroxidação lipídica. Quanto aos fenóis, os altos valores foram próximos aos valores do ponto Portaria, sendo este outro indício de que as plantas encontravam-se estressadas neste ponto.

O acúmulo de fenóis tem sido interpretado como um mecanismo de defesa das plantas, ativado por fatores bióticos e abióticos que induzem ao estresse (Vaughn & Duke, 1984). Além da quantificação dos compostos fenólicos, a anatomia mostrou, em todas as localizações, acúmulo de compostos fenólicos, conforme evidenciado pelo teste histoquímico com sulfato ferroso. Em *S. dulcis*, é natural encontrar compostos fenólicos em seus tecidos, principalmente devido ao fato de haver idioblastos contendo taninos acompanhando o sistema vascular (Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006b). Este incremento na síntese destes compostos ocorreu devido, primeiramente, aos poluentes que estão atingindo o PEI e secundariamente, ao excesso de luminosidade, pois há uma correlação positiva entre a intensidade luminosa e a produção de compostos fenólicos (Tattini *et al.*, 2004), evidenciando uma resposta de proteção à lâmina foliar.

Os poluentes oriundos das emissões de uma fábrica de alumínio estão atingindo o Parque Estadual do Itacolomi, uma vez que as massas de ar transportam estes poluentes para as adjacências desta importante unidade de conservação ambiental. Isto pôde ser comprovado pela identificação de elementos oriundos de atividades industriais na água da chuva, como o flúor, e de oxidantes na atmosfera. *Spondias dulcis* mostrou ser uma importante espécie bioindicadora, apresentando sintomas visuais e acúmulo de fluoreto em

seus tecidos em poucos dias de exposição. Mesmo antes de apresentar sintomas visuais, puderam ser detectadas alterações anatômicas como acúmulo de compostos fenólicos e retração de protoplasto. As necroses surgiram em poucos dias de exposição, gerando deformações nas paredes celulares da epiderme e nos estômatos, chegando a erodir a cutícula e expor os tecidos internos. No mesofilo, as necroses foram caracterizadas, principalmente, pela plasmólise das células, levando à morte celular. O acúmulo de fluoreto, além dos gases oxidantes, gerou a formação de espécies reativas de oxigênio, levando ao aumento das atividades enzimáticas e acúmulo de compostos fenólicos. A má degradação destes agentes oxidantes culminou na peroxidação de lipídios estruturais. A anatomia e a fisiologia vegetal, desta forma, se mostraram importantes biomarcadores para a detecção de alterações causadas pelos poluentes.

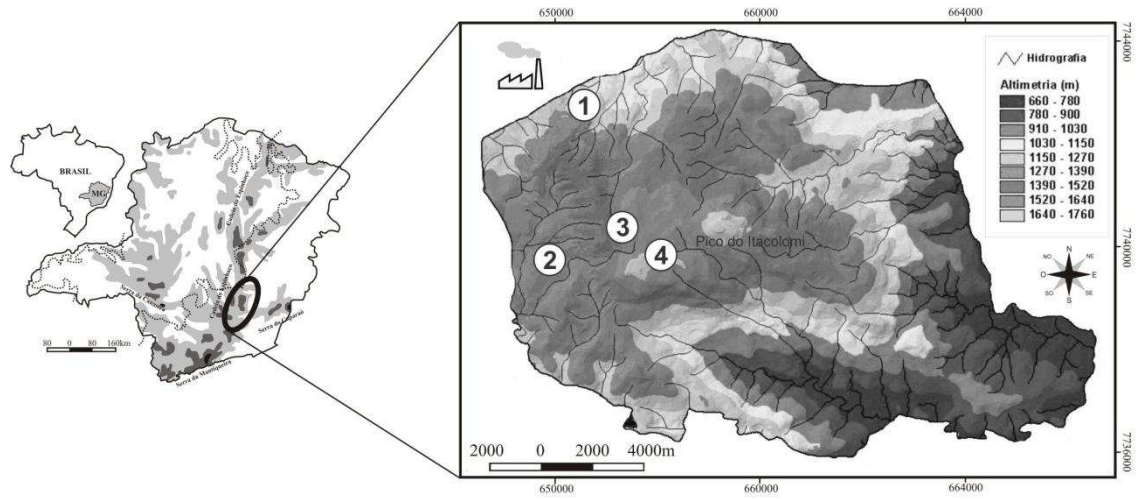


Figura 1: Localização do Parque Estadual do Itacolomi (PEI) e dos pontos onde as plantas de *Spondias dulcis* foram expostas. 1. Portaria. 2. Capela. 3. Início da Trilha. 4. Lagoa Seca, incluindo, externamente ao PEI, a fonte emissora. Modificado de Coser *et al.* (2010).

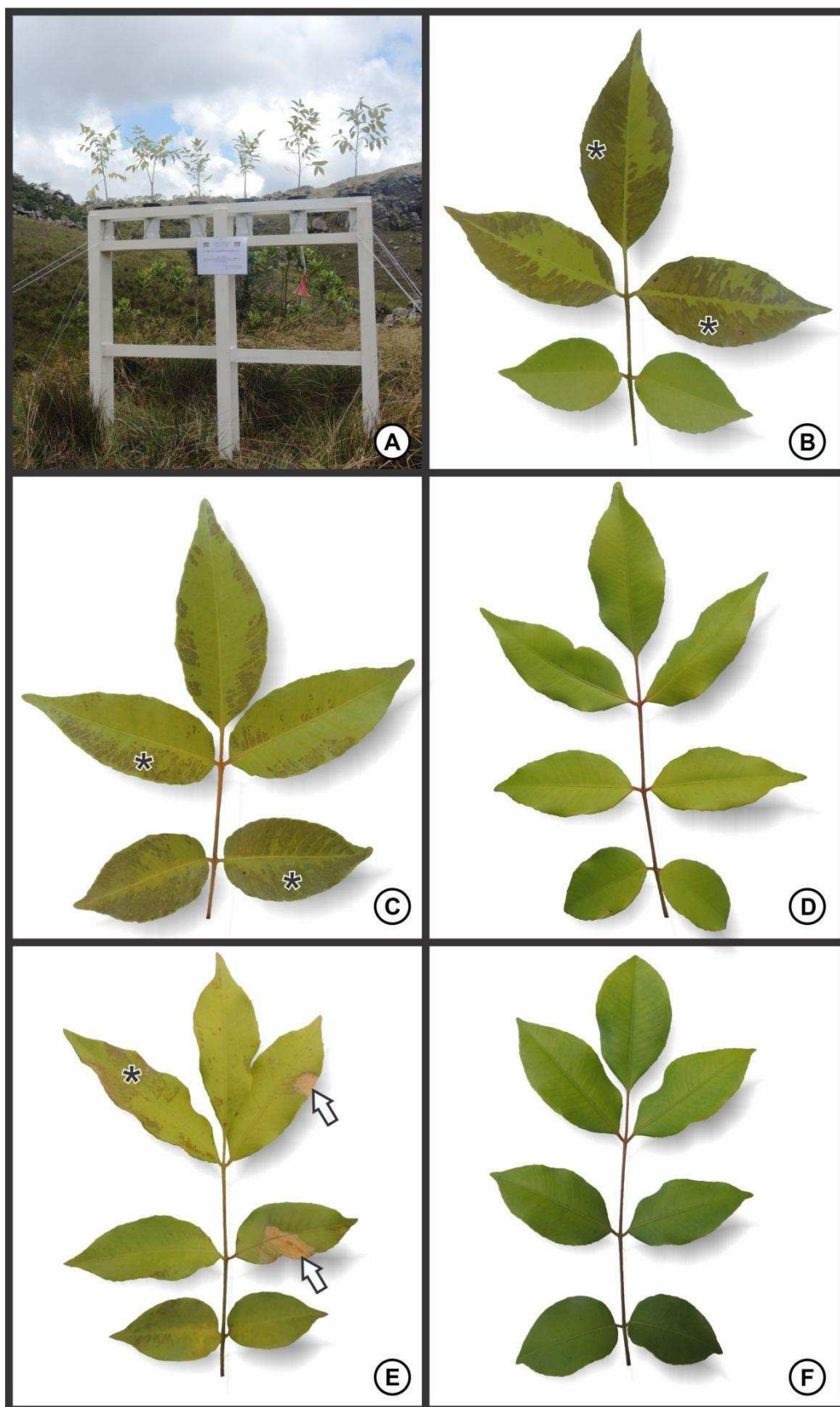


Figura 2: Experimento de exposição ativa no Parque Estadual do Itacolomi utilizando plantas de *Spondias dulcis*. A. Sistema de estantes utilizadas para a exposição ativa no PEI. B. Ponto de exposição Portaria. C. Capela. D. Início da Trilha. E. Lagoa Seca. F. Casa de Vegetação. (*) Escurecimento foliar. (seta) Necrose foliar.

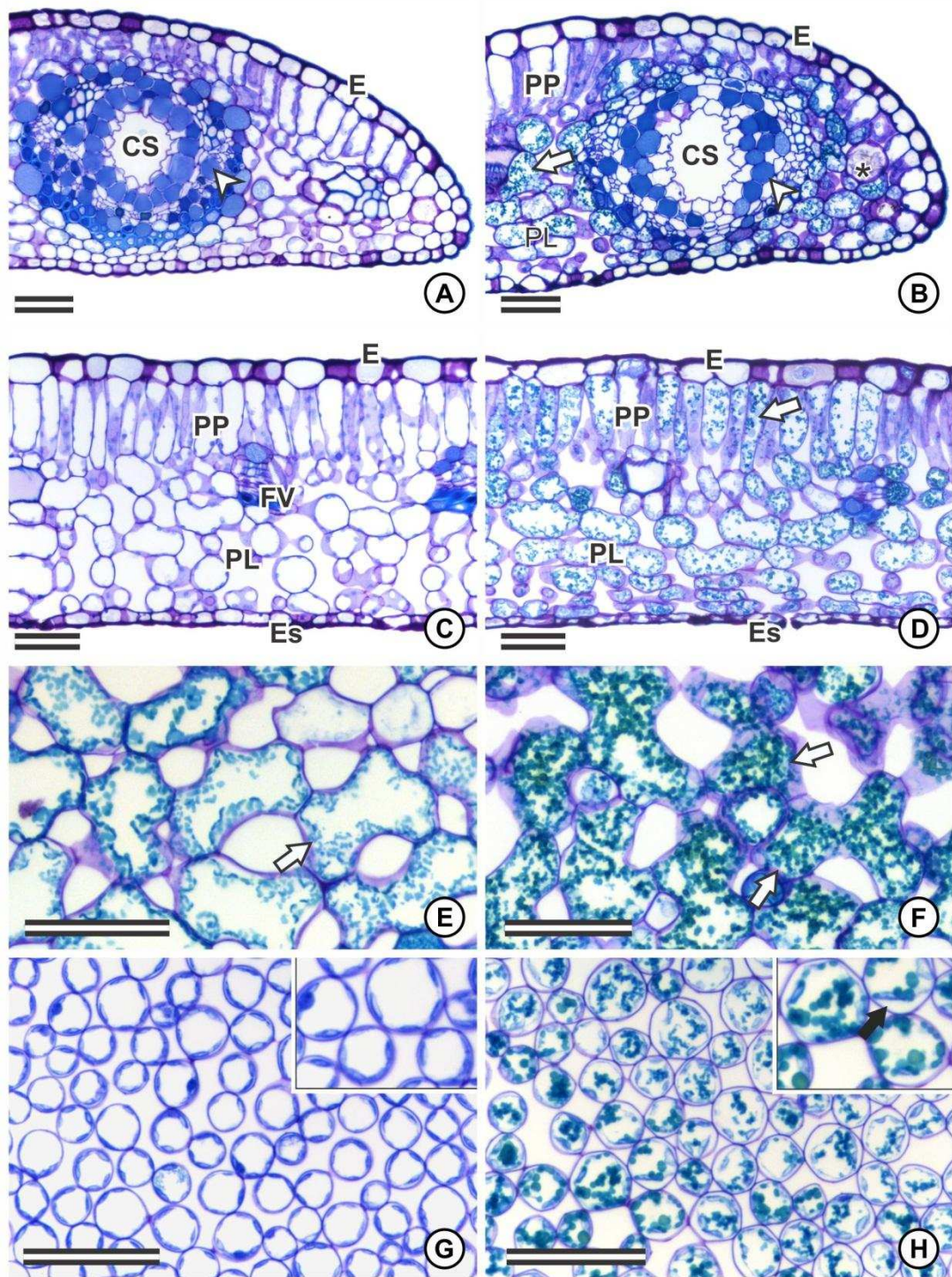


Figura 3: Alterações na lâmina foliar de *Spondias dulcis* causadas pela exposição às emissões de uma usina no Parque Estadual do Itacolomi em secção transversal (A-D) e paradérmica (E-H). A, C, E e G. Ponto referência Casa de Vegetação. B, D, F e H. Ponto Lagoa Seca. A e B. Margem foliar evidenciando o canal secretor envolto de idioblastos taníferos (ponta de seta). B, D, F e H. Acúmulo de compostos fenólicos nas células que envolvem o canal secretor e nos parênquimas paliçádico e lacunoso. E e F. Parênquima lacunoso. G e H. Parênquima paliçádico. (*) Drusa. (seta branca) Compostos fenólicos. (seta preta) Retração do protoplasto. CS. Canal Secretor. E. Epiderme. Es. Estômato. FV. Feixe Vascular. PP. Parênquima Paliçádico. PL. Parênquima Lacunoso. Escalas = 50 μm .

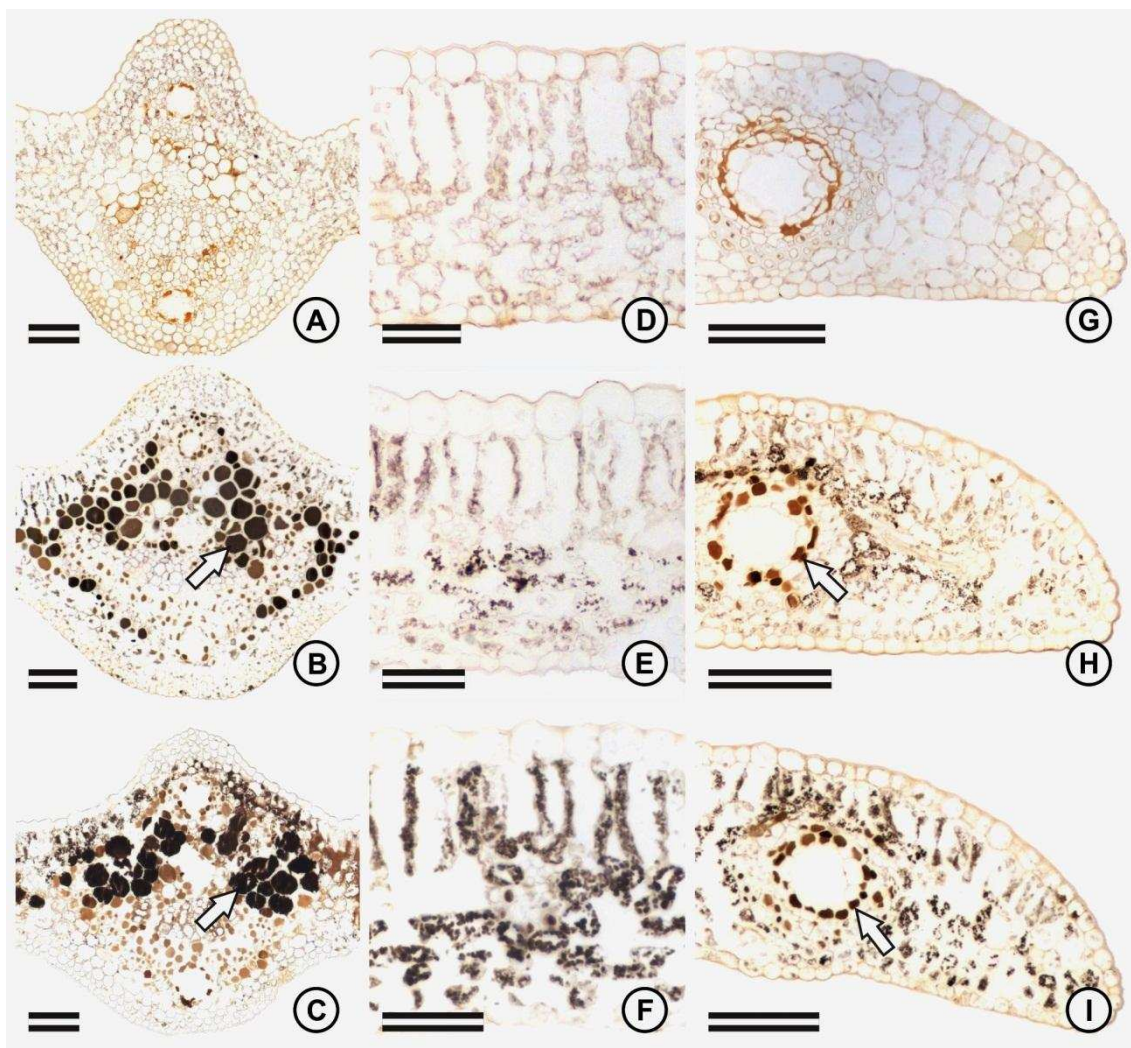


Figura 4: Estrutura foliar de *Spondias dulcis* expostas às emissões de uma usina no Parque Estadual do Itacolomi (teste histoquímico com sulfato ferroso para evidenciar compostos fenólicos, secção transversal). A, D e G. Controle do teste com extração fenólica com metanol. B, E e H. Ponto referência Casa de Vegetação. C. Ponto Portaria. F. Ponto Lagoa Seca. I. Ponto Capela. Os compostos fenólicos são evidenciados pela cor marrom escuro. (seta) Idioblastos taníferos. Escalas A-C e G-I = 100 μ m e D-F = 50 μ m.

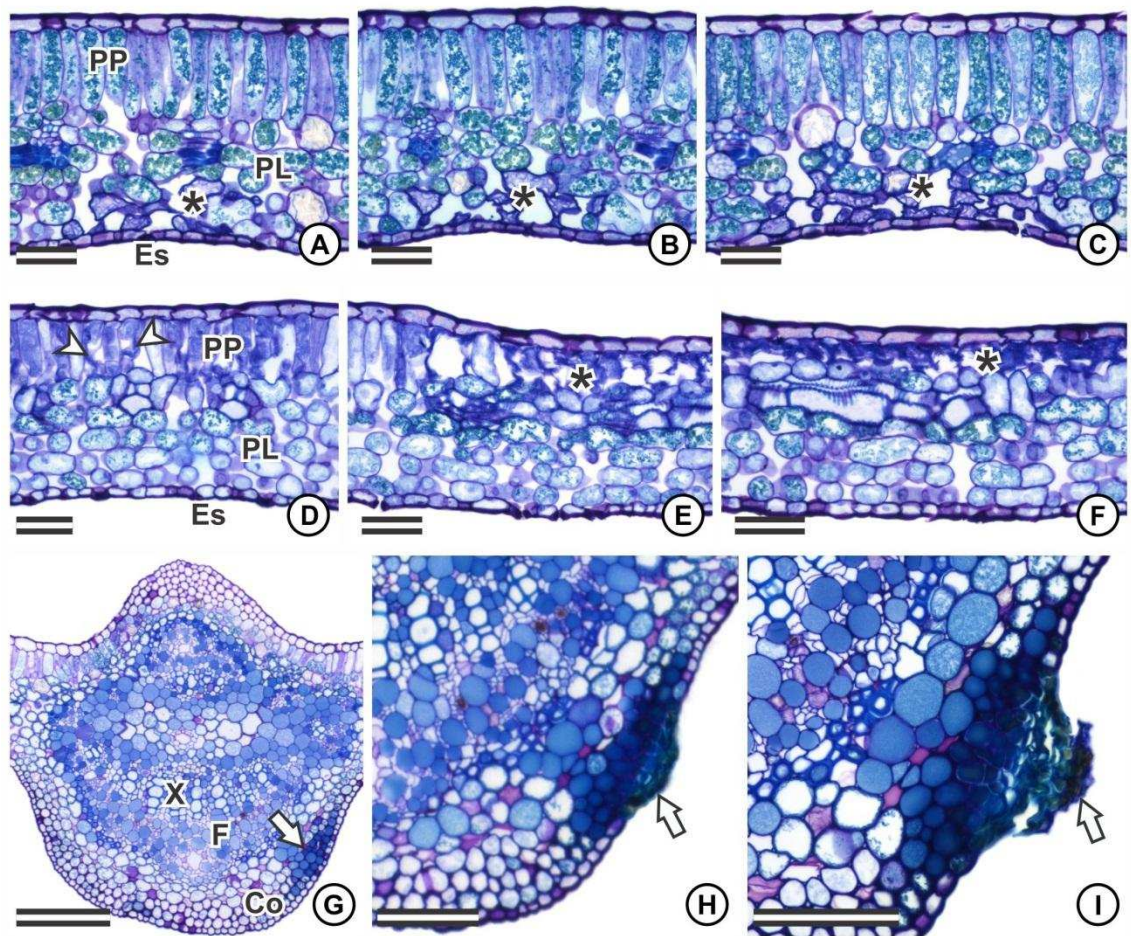


Figura 5: Alterações foliares em *Spondias dulcis* que exibiram sintomas visuais causadas pela exposição às emissões de uma usina no Parque Estadual do Itacolomi (secção transversal). A-C. Evolução de necrose iniciada na face abaxial. D-F. Desenvolvimento de necrose iniciada na face adaxial, (ponta de seta) retração do protoplasto. G-I. Necrose na nervura central, levando a formação de hiperplasia celular na face abaxial (seta). (*) Colapso das células. Es. Estômato. PP. Parênquima Paliçádico. PL. Parênquima Lacunoso. Co. Colênquima. F. Floema. X. Xilema. Escalas A-F = 50 μm e G-I = 100 μm .

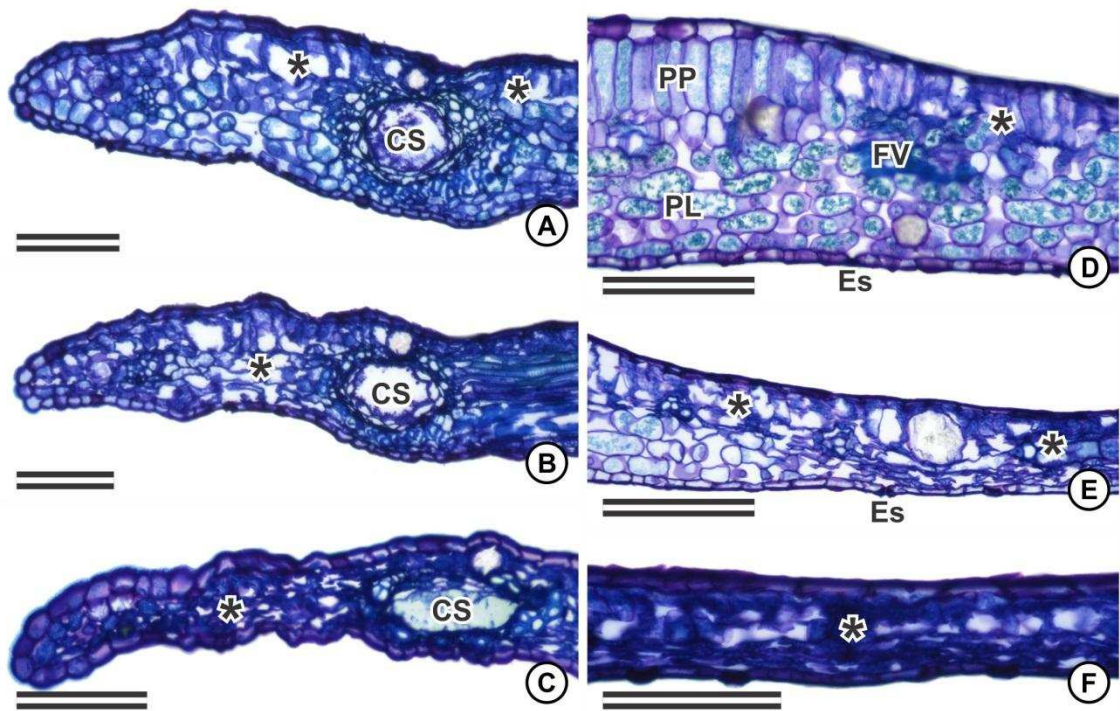


Figura 6: Necroses foliares em *Spondias dulcis* que exibiram sintomas visuais causadas pela exposição às emissões de uma usina no Parque Estadual do Itacolomi em (secção transversal). A-C. Necrose generalizada na margem foliar. D-F. Evolução de necrose culminando na total degradação dos tecidos foliares. (*) Colapso das células. CS. Canal Secretor. Es. Estômato. PP. Parênquima Paliçádico. PL. Parênquima Lacunoso. FV. Feixe Vascular. Escalas = 100 μ m.

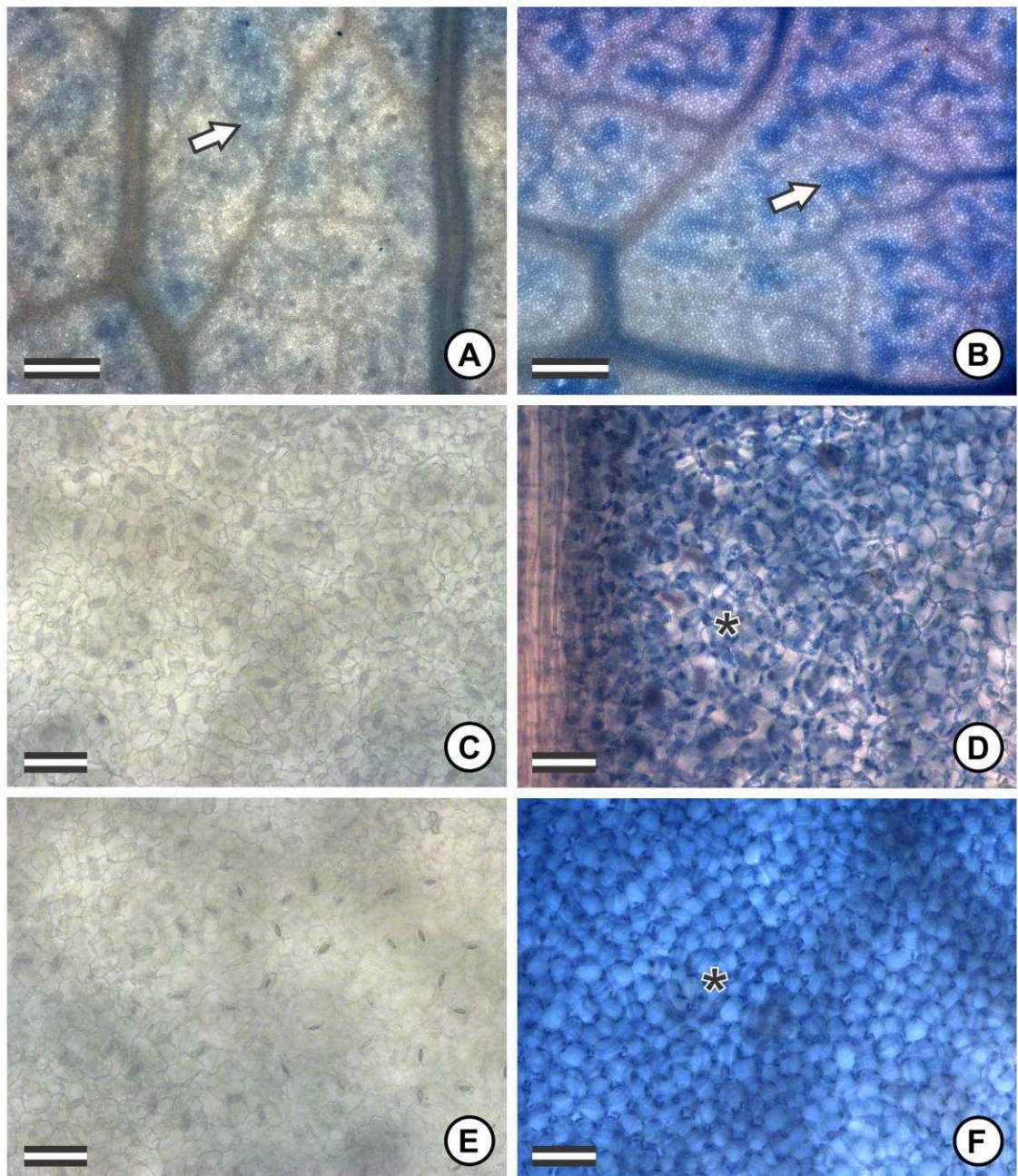


Figura 7: Morte celular em folhas de *Spondias dulcis* expostas às emissões de uma usina no Parque Estadual do Itacolomi (teste histoquímico com Azul de Evans, diafanização). A, C e E. Ponto referência Casa de Vegetação. B, D e F. Ponto Portaria. A e B. Aspecto geral, (seta) grupos de células mortas. C. Parênquima lacunoso sadio. D. Parênquima lacunoso apresentando morte celular. E. Face abaxial. F. Parênquima paliçádico apresentando morte celular. (*) plastídios fortemente corados de azul. Escalas A-B = 300 μm e C-F = 50 μm .

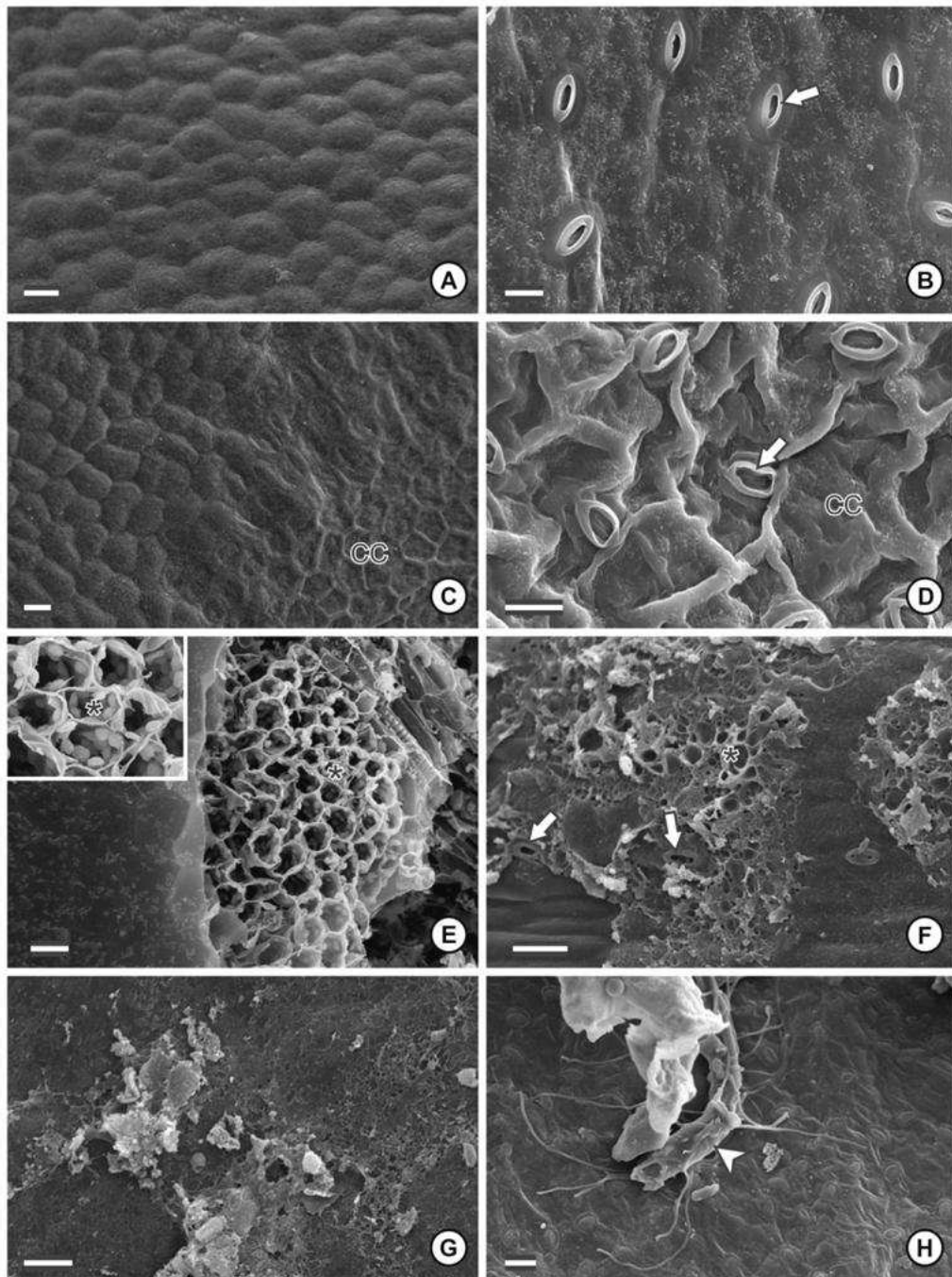


Figura 8: Superfície foliar de *Spondias dulcis* exposta às emissões de uma usina no Parque Estadual do Itacolomi (Microscopia Eletrônica de Varredura). A-B. Ponto de referência Casa de Vegetação, evidenciando folíolos glabros com epiderme apresentando relevo da epiderme uniforme e estômatos sem alterações. A. Face adaxial. B. Face abaxial. C. Células epidérmicas da face adaxial plasmolisadas com perda de turgor. D. Face abaxial necrosada com plasmólise celular e estômatos alterados, com crista estomática flácida. E. Ruptura da epiderme expondo parênquima paliçádico. D detalhe evidenciando os cloroplastos na posição parietal celular. F. Face abaxial erodida. G. Face adaxial erodida. H. Proliferação de hifas fúngicas (ponta de seta). (setas) Estômatos. (*) Exposição das células do mesofilo. CC. Colapso Celular. Escalas A, C, E, F e H = 20 μm e B, D e G = 10 μm

Tabela 1: Análise química do solo utilizado como substrato nos vasos para cultivo dos indivíduos de *Spondias dulcis* Forst. F.

pH	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	SB	(t)	(T)
H ₂ O	----mg/dm ³ ----			-----cmol _c /dm ³ -----			----cmol _c /dm ³ ----			
5,6	29,6	157,8	-	4,8	1,4	0	5,6	6,7	6,7	12,3

V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
-----%-----		dag/Kg		mg/L	-----g/dm ³ -----					
54,6	0	-	4,8	20,3	11,8	41,5	31	0,6	0,4	

SB (Soma de bases trocáveis); CTC (t) (Capacidade de troca catiônica efetiva); CTC (T) (Capacidade de troca catiônica a pH 7,0); V (Índice de saturação de bases); m (Índice de saturação de alumínio); ISNa (Índice de saturação de sódio); MO (Matéria orgânica); P-rem (Fósforo remanescente).

Tabela 2: Análise granulométrica e classificação textural do solo utilizado como substrato nos vasos para cultivo dos indivíduos de *Spondias dulcis*.

Argila	Silte	Areia	Classificação Textural	Tipo de Solo *
-----%-----				
39	9	52	Argilo Arenosa	2

O método utilizado foi o da "Pipeta" segundo EMBRAPA.

* Tipo 2 – Textura Média.

Tabela 3: Valores médios das avaliações microambientais nos diferentes pontos de amostragem no Parque Estadual do Itacolomi e no ponto referência no período de 07 a 12/03/2013.

Localização	Coordenadas	H	V	T	U
Portaria	20°24'30" S 43°30'30" W	1230	0,48	28,85	61,35
Capela	20°26'5" S 43°30'36" W	1373	0,65	27,61	59,63
Início da Trilha	20°25'45" S 43°29'48" W	1473	0,30	27,40	63,63
Lagoa Seca	20°25'57" S 43°29'27" W	1532	1,20	23,66	70,11
Casa de Vegetação	20°45'20" S 42°52'40" W	649	0,14	28,62	60,33

H (Altitude – m); V (Vento – $m s^{-1}$); T (Temperatura – °C); U (Umidade %).

Tabela 4: Propriedades físicas e químicas da água da chuva e dados dos gases oxidantes encontrados no Parque Estadual do Itacolomi, MG no período de 07 a 12/03/2013.

Localização	pH	Condutividade	Oxidantes
Portaria	5,89	12,98	27,03
Capela	5,55	10,65	22,56
Início da Trilha	6,31	20,00	0,66
Lagoa Seca	6,07	12,13	55,79
Casa de Vegetação	-	-	0,41

Condutividade (μS) e Gases Oxidantes ($\mu mol L^{-1}$).

Tabela 5: Análise da água da chuva coletada no Parque Estadual do Itacolomi (em $\mu\text{eq L}^{-1}$) no período de 07 a 12/03/2013.

Localização	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	F ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Acetato	Formiato	Oxalato	Σ Cátions	Σ Ânions	%
Portaria	45,06	12,27	19,58	16,28	70,83	3,91	16,51	37,35	6,87	6,27	35,42	5,19	251,14	123,63	34,02
Capela	35,87	9,31	12,14	17,68	76,40	1,70	8,63	31,88	5,53	19,90	1,41	6,99	245,50	88,59	46,96
Início da Trilha	40,64	5,27	18,46	18,06	81,06	0,98	17,04	24,80	5,67	16,32	36,70	5,25	262,63	120,64	37,04
Lagoa Seca	45,00	7,12	13,15	15,06	78,82	1,12	15,14	27,74	6,74	20,92	31,36	4,91	253,06	116,66	36,89

% - Porcentagem de cátions em relação aos ânions

Tabela 6: Relação da porcentagem média dos sintomas visuais dos indivíduos de *Spondias dulcis* e as classificações quanto ao grau de área foliar necrosada.

Localização	Porcentagem Média da Área Foliar Necrosada		Classificação
Portaria	25,056 %	B	Levemente injuriada
Capela	23,597 %	B	Levemente injuriada
Início da Trilha	3,586 %	C	Sem injúria
Lagoa Seca	43,442 %	A	Moderadamente injuriada
Casa de Vegetação	0,000 %	C	Sem injúria

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey. A 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Levemente injuriada (com manchas necróticas e cloróticas esparsas);

Moderadamente injuriada (de 30 a 50% da área foliar necrosada);

Muito injuriada (de 50 a 70% da área foliar necrosada);

Extremamente injuriada (com mais de 70% da área foliar necrosada).

Tabela 7: Quantificação do teor de flúor na massa seca das folhas dos indivíduos de *Spondias dulcis* expostos no PEI no período de 07 a 12/03/2013 ($\mu\text{gF g}^{-1}$).

Localização	Quantificação de Flúor	
Portaria	2,7418	A
Capela	1,6509	C
Início da Trilha	1,3787	D
Lagoa Seca	1,8215	B
Casa de Vegetação	1,0910	D

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey. A 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Tabela 8: Dados qualitativos da microanálise por energia dispersiva de raios-X em folhas de *Spondias dulcis* expostos às emissões de uma usina no Parque Estadual do Itacolomi e no ponto referência.

Localização	Face	F	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca
Portaria	ABA	2,60	3,49	8,78	5,80	6,55	3,18	17,53	32,33
	ADA	5,85	4,74	8,83	4,77	4,66	1,82	12,29	23,48
Capela	ABA	1,86	3,49	7,90	4,27	6,53	6,04	15,94	45,41
	ADA	5,46	4,44	7,60	3,39	4,72	4,10	12,48	26,86
Início da Trilha	ABA	1,54	2,69	8,88	6,16	6,35	2,28	18,03	40,12
	ADA	1,19	4,66	11,73	8,25	6,25	3,41	18,27	30,56
Lagoa Seca	ABA	1,14	4,87	8,08	9,61	8,43	3,07	16,82	33,48
	ADA	5,93	4,65	7,02	9,93	6,84	2,02	13,68	26,86
Casa de Vegetação	ABA	2,60	3,92	9,83	7,32	5,84	7,75	31,67	24,05
	ADA	2,22	3,87	7,55	6,93	6,12	7,02	23,65	21,25

Valores relativos em porcentagem (%).

ADA – Superfície adaxial das folhas;

ABA – Superfície abaxial das folhas.

Tabela 9: Análises fisiológicas das atividades das enzimas antioxidativas, fenóis totais e malondialdeído em folhas de *Spondias dulcis* expostas às emissões de uma usina no Parque Estadual do Itacolomi.

	CAT	SOD	POX	Fenóis	MDA
Portaria	24,05 ± 4,74	3,31 ± 1,23	3,10 ± 0,70	117,14 ± 22,11	2,49 ± 0,83
Capela	29,71 ± 5,78	2,86 ± 1,52	10,50 ± 5,11	100,21 ± 6,47	2,38 ± 0,09
Início da Trilha	17,00 ± 1,31	3,73 ± 2,07	4,81 ± 1,41	77,94 ± 26,34	1,56 ± 0,16
Lagoa Seca	16,97 ± 2,02	2,10 ± 0,28	9,11 ± 3,42	110,80 ± 24,51	1,19 ± 0,24
Casa de Vegetação	17,05 ± 0,57	2,14 ± 0,37	3,62 ± 3,37	78,30 ± 12,39	0,78 ± 0,10

CAT (Catalase – mmol min⁻¹mg proteína),

SOD (Superóxido Dismutase – U min⁻¹mg proteína),

POX (Peroxidase – mM min⁻¹mg proteína),

Fenóis (g fenóis kg⁻¹MF),

MDA (Malondialdeído – mmol g⁻¹MF).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, E.S., Moura, B.B., Pedroso, A.N.V., Tresmondi, F., Domingos, M. 2011. The efficiency of tobacco Bel-W3 and native species for ozone biomonitoring in subtropical climate, as revealed by histocytochemical techniques. **Environmental Pollution** 159: 3309-3315.
- Anderson, M.D.; Prasad, T.K.; Stewart, C.R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology December** 109 (4): 1247-1257.
- Arndt, U.; Flores, F.E.V.; Weinstein, L.H. (Eds) 1995. **Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil**. UFRGS, Porto Alegre, 155pp.
- Arndt, U.; Schluter, C. 1985. **Wirkungsberzogene erfassung der immisionsbelastung bestimmter waldschadensgebiete in baden-wurttemberg durch den einsatz von bioinkatoren (actives monitoring von indikatorpflanzen)**. Statuskoll. z. Arbeit dès PEF, Karlsruhe 5. bis 7.3, p. 17-41.
- Ballantyne, D.J. 1991. Fluoride and photosynthetic capacity of azalea (*Rhododendron*) cultivars. **Fluoride** 24: 11-16.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova** 29:113-123.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry** 44: 276-287
- Bialeski, R.I., Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of aminoacids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry** 17: 278-293.
- Bobbink R. 1998. Impacts of tropospheric ozone and airborne nitrogenous pollutants on natural and semi-natural ecosystems: a commentary. **New Phytologist** 139:161-168
- Boese, S.R.; MacLean, D.C.; El-Mogazi, D. 1995. Effects of fluoride on chlorophyll a fluorescence in spinach. **Environmental Pollution** 89: 203-208.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.

- Buss, D.F.; Baptista, D.F.; Nessimian J.L. 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública** 19: 465-473.
- Cakmak, I.; Horst, W.J. 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum** 83: 463-468.
- Chance, C.M. 1995. Assay of catalase and peroxidases. **Methods Enzymology** 11: 764-775.
- Chaves, A.L.F.; Silva, E.A.M.; Azevedo, A.A.; Cano, M.A.O.; Matsuoka, K. 2002. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-Rhodes) – Poaceae. **Acta Botanica Brasilica** 16: 395-406.
- Coser, T.S.; Paula, C.C.; Wendt, T. 2010. Bromeliaceae Juss. nos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** 61: 261 - 280.
- Divan Junior, A.M.; Oliva, M.A.; Martinez, C.A.; Cambraia, J. 2007. Effects of fluoride emissions on two tropical grasses: *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colonião. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67: 247-253.
- Divan Junior, A.M.; Oliva, M.A.; Ferreira, F.A. 2008. Dispersal pattern of airborne emissions from na aluminium smelter in Ouro Preto, Brazil, as expressed by foliar fluoride accumulation in eight plant species. **Ecological Indicators** 8:454-461.
- Faoro, F.; Iriti, M., 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. **Biologia Plantarum** 49: 585-592.
- Ferm, M.; Rodhe, H. 1997. Measurements of Air Concentrations of SO₂, NO₂ and NH₃ at Rural and Remote Sites in Asia. **Journal of Atmospheric Chemistry** 27: 17.
- Fornasiero, R.B. 2001. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science** 161: 979-985.
- Fornasiero, R.B. 2003. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. **Plant Science** 165: 507-513.
- Furlan, C.M.; Santos, D.Y.A.C.; Salatino, A.; Domingos, M. 2006. n-Alkane distribution of leaves of *Psidium guajava* exposed to industrial air pollutants. **Environmental and Experimental Botany** 58: 100-105
- Garcia-Ciudad, A.; Garcia-Criado, B.; Pontón-San Emeterio, C. 1985. Determination of fluoride in plant samples by a potentiometric method and near-infrared reflectance

- spectroscopy. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 16: 1107-1122.
- Gerosa, G., Marzuoli, R., Rossini, M., Panigada, C., Meroni, M., Colombo, R., Faoro, F., Iriti, M., 2009. A flux-based assessment of the effects of ozone on foliar injury, photosynthesis, and yield of bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Borlotto Nano Lingua di Fuoco) in open-top chambers. **Environmental Pollution** 157: 1727-1736.
- Gerrits, P.O., 1964. **The Application of Glycol Methacrylate Histotechnology: Some Ground Principles**. Leica GmbH, Germany.
- Ghosh, D.; Das, S.; Maiti, R.; Jana, D.; Das, U.B. 2002. Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. **Reproductive Toxicology** 16: 385–390.
- Giannopolitis, C.N.; Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59:309-314.
- Havir, E.A.; Mchale, N.A. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology** 84: 450-455.
- Heath, R.L.; Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 125: 189-198.
- Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station: Berkeley, CA, pp 347.
- Iriti, M., Rabotti, G., Ascensão, A., Faoro, F., 2003. Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 51: 4308-4314
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Kar, M.; Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology** 57: 315-319.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 37-138.
- Keogh, R.C.; Deverall, B.J.; McLeod, S. 1980. Comparison of histological and physiological responses to *Phakopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. **Transactions of the British Mycological Society** 74: 329-333.

- Klumpp, A.; Domingos, M.; Moraes, R.M.; Klumpp, G. 1998. Effects of complex air pollution on tree species of the Atlantic Rain Forest near Cubatão, Brazil. **Chemosphere** 36: 989-994.
- Larsen, S.; Widdowson, A.E. 1971. Soil fluorine. **Journal of Soil Science** 22: 210-221.
- Matthews, R.A.; Buikema, A.L.; Cairns Jr., J., 1982. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships, and indices. **Water Research** 16:129-139.
- Messias, M.C.T.B.; Dias, S.J.L.; Roschel, M.B.; Souza, H.C.; Silva, J.L.; Matos, A.V.M. 1997. **Levantamento florístico das matas e distribuição de algumas espécies endêmicas da região na área do Parque do Itacolomi**. UFOP / BIRD / IEF / PROFLORESTA. Relatório Técnico (polígrafo), Ouro Preto. 151p.
- Miller, G.W. 1993. The effect of fluoride on higher plants. **Fluoride** 26: 3-22.
- Mitchell, J.D.; Daly, D.C. 1995. Revisão das espécies neotropicais de *Spondias* (Anacardiaceae). *In*: **46 ° Congresso Nacional de Botânica**. Ribeirão Preto – SP. Resumos, p.207.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 9: 405-410.
- Murray, F. 1984. Effects of long term exposure to hydrogen fluoride on grapevines. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological** 36: 337-349.
- O'Brien, T.P.; McCully, M.E. 1981. **The study of plants structure principles and select methods**. Termarcaphi Pty. Ltda, Melbourne-Australia, 45p.
- Oliva, M.A.; Figueiredo, J.G. 2005. Gramíneas bioindicadoras de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica** 28: 389-397.
- Pascholati, S.F.; Leite, B. 1995. Hospedeiros: mecanismos de resistência. *In*: Bergamin Filho, A., Kimati, H.; Amorin, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia – princípios e conceitos**. São Paulo. Ceres, pp.417-453.
- Peixoto, P.H.P.; Pimenta, D.S.; Antunes, F. 2005. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 40: 727-734.
- Peron, MV. 1989. Listagem Preliminar da flora fanerogâmica dos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Ouro Preto/Mariana, MG. **Rodriguésia** 67: 63-69.
- Pozza, A.A.A.; Alves, E.; Pozza, E.A.; Carvalho, J.G.; Montanari, M.; Guimarães P.T. G.; Santos, D.M.. 2004. Efeito do silício no controle da cercosporiose em Três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia brasileira**. 29: 185-188.

- Reddy, G. B.; Khandare, A. L.; Reddy, P. Y.; Rao, G. S.; Balakrishna, N.; Srivalli, I. 2003. Antioxidant defense system and lipid peroxidation in patients with skeletal fluorosis and in fluoride-intoxicated rabbits. **Toxicological Sciences** 72: 363-368.
- Romero, R.; Nakajima, J.N. 1999. Espécies endêmicas do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica** 22: 259-265.
- Runeckles, V.C. 1984. Impact of air pollutant combinations on plants *In*: Treshow, M (Ed). **Air pollution and plant life**. John Wiley & Sons, p. 239-258.
- Sacramento, C.K.; Souza, F.X. 2009. Cajá. *In*: Santos-Serejo, J.A.; Dantas, J.L.L.; Sampaio, C.V. & Coelho, Y.S. (eds) **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF.
- Sant'Anna-Santos, B.F. 2008. **Avaliação dos efeitos fitotóxicos do flúor em *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae), espécie tropical sensível**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Azevedo, A.A. 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências**, 5: 48-50.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Azevedo, A.A. 2010. Toxicidade e acúmulo de flúor em hortaliças nas adjacências de uma fábrica de alumínio. **Acta Botânica Brasílica** 24: 952-963.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Azevedo, A.A.; Silva, L.C.; Oliva, M.A. 2012. Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 84: 689-702.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Araujo, J.M.; Alves, E.F.; Silva, E.A.M.; Aguiar, R. 2006a. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany** 58: 158–168.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Thadeo, M.; Meira, R.M.S.A.; Ascensão, L. 2006b. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Revista Árvore** 30: 481-489.
- Scandalios, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology** 101:7-12.

- Schindler, D.W. 1988. Effects of acid rain on freshwater ecosystems. **Science** 239: 149-156.
- Seinfeld, J.H. 1986. **Atmospheric chemistry and physics of air pollution**. John Wiley & Sons: New York, 738p.
- Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Silva, E.A.M.; Oliva, M.A. 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica** 23: 385-393.
- Soares, A.M.S.; Machado, O.L.T. 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** 1: 9-19.
- Soda, C.; Bussotti, F.; Grossoni, P.; Barnes, J.; Mori, B.; Tani, C. 2000. Impacts of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. **Environmental and Experimental Botany** 44: 69-82.
- Souza, S.R., Tavares, M.F., Carvalho, L.R.F. 1999. Systematic approach to the separation of mono and hydroxycarboxylic acids in environmental samples by ion chromatography and capillary electrophoresis. **Journal Chromatography** 796: 335.
- Souza, S.R.; Carvalho, L.R.F. 2001. Origem e implicações dos ácidos carboxílicos na atmosfera. **Química Nova** 24: 60-67.
- Souza, P.A.; Mello, W.Z.; Maldonado, J. 2006. Composição química da chuva e aporte atmosférico na Ilha Grande, Rj. **Química Nova** 29: 471-476.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (Eds). 2009. **Fisiologia Vegetal**. 4ª Ed. Artmed, Brasil. 848 pp.
- Tattini, M.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Massai, R.; Remorini, D.; Agati, G. 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist** 163: 547-561.
- Vaughn, K.; Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum** 60: 106-112.
- vanLoon, G.W.; Duffy, S. J. (Eds). 2005. **Environmental chemistry a global perspective**. Oxford University Press, 2º edition. 515p.
- Vicent, R.C. 2004. **Florística, fitossociologia e relações entre a vegetação e o solo em área de campo ferruginoso no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Vollenweider, P.; Ottiger, M.; Günthardt-Goerg, M.S. 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. **Environmental Pollution** 124: 101-118.
- Wang, C. Y. 1995. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. **Postharvest Biology and Technology** 5: 67–76.
- Weinstein, L.H. 1977. Fluoride and plant life. **Journal of Occupational Medicine** 19: 49-78.
- Weinstein, L.H.; Davison, A. (Eds). 2004. **Fluorides in the environment: effects on plants and animals**. Oxford: CABI Publishing, 287p.