

Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae)

Alice Pita-Barbosa¹, Bruno Francisco Sant'Anna-Santos^{1,2}, Kellen Lagares Ferreira Silva¹,
Aristéa Alves Azevedo¹ e Diego Ismael Rocha¹

Recebido em 29/05/2008. Aceito em 18/02/2009

RESUMO – (Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae)). Visando avaliar os efeitos do fluoreto sobre capim-braquiária, plantas de *Brachiaria brizantha* e *B. decumbens* foram submetidas a nevoeiros simulados com fluoreto (10 µg ml⁻¹). Amostras foliares de porções aparentemente sadias foram coletadas 24 horas após a última exposição para análises microscópicas. Folhas, raízes e rizomas foram submetidos à quantificação do teor de fluoreto. As folhas apresentaram necroses pequenas e esparsas. Somente as folhas acumularam fluoreto, apresentando teores 4,4 e 5,2 vezes maiores que no tratamento controle, em *B. brizantha* e *B. decumbens*, respectivamente, não havendo diferença no potencial acumulador das duas espécies. As principais alterações micromorfológicas observadas foram lesões próximas aos tricomas, sugerindo que estes sejam as vias preferenciais de entrada do poluente nas plantas. Porções foliares, visualmente sadias, de ambas as espécies apresentaram danos microscópicos antes do surgimento de sintomas, havendo perda da turgidez das células buliformes em *B. brizantha* e de todos os tecidos em *B. decumbens*. Alterações micromorfológicas foram observadas somente em *B. decumbens*, indicando sua maior sensibilidade ao fluoreto, em comparação com *B. brizantha*. A realização de experimentos de longa duração será fundamental para elucidar o potencial bioacumulador de *B. brizantha*. **Palavras-chave:** anatomia vegetal, capim-braquiária, necrose

ABSTRACT – (Phytotoxic effects of fluoride in leaf morpho-anatomy of *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf and *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae)). To assess the effects of fluoride on signal grass, plants of *Brachiaria brizantha* and *B. decumbens* were submitted to simulated fluoride fog (10 µg ml⁻¹). Leaf fragments from apparently healthy portions were collected 24 hours after the last exposure and used for microscopic analysis. Roots, leaves and rhizomes were submitted to fluoride content quantification. The leaves presented small, sparse necroses. The accumulation of fluoride was observed on the leaves only. *B. brizantha* and *B. decumbens* presented, respectively, 4.4 and 5.2 times more fluoride than the control treatment. No difference was observed concerning the accumulation potential of both species. The main micromorphological alterations observed were injuries near the trichomes, therefore, suggesting that these are the preferential routes by which pollutants enter the plants. Visually healthy leaf portions of the two species showed microscopic damages before symptoms appeared, presenting turgidity loss in the bulliform cells of *B. brizantha* and in all tissues of *B. decumbens*. Micromorphometric alterations were observed only in *B. decumbens*, indicating higher sensibility to fluoride in comparison to *B. brizantha*. Further studies of long duration will be essential to determine the bioaccumulation potential of *B. brizantha*.

Key words: plant anatomy, signalgrass, necrosis

Introdução

O flúor, na condição de poluente atmosférico, apresenta grande importância em função de sua elevada fitotoxicidade (Weinstein & Davison 2003); próximo a fontes emissoras, sua concentração pode chegar a 12,87 µg m⁻³. Por ser cumulativo, o flúor pode ser repassado aos animais ao longo da cadeia alimentar e, por sua vez, ao homem, podendo causar doenças (Loganathan *et al.* 2004). A intoxicação por flúor pode ser crônica ou aguda. A crônica, mais comum, denomina-se fluorose, resultando em distúrbios na formação do esmalte dentário (DenBesten 1999). A aguda é rara e gera alterações musculares, gastrointestinais e nervosas (Lucioli *et al.* 2007). Dessa forma, plantas com elevadas concentrações de flúor são impróprias para a ingestão por herbívoros pois causam distúrbios metabólicos severos em animais (Sun & Su 1985).

A principal via de entrada do flúor nas plantas é a folha, sendo também o órgão vegetal mais sujeito à ação deste poluente (Fornasiero 2001). Quando na forma gasosa, a entrada do flúor se dá através dos estômatos (Miller 1993), porém, em solução, este elemento pode ser absorvido por toda a superfície foliar. Segundo Sharma (1985), concentrações

baixas de flúor, na faixa de 0,6 µg m⁻³, podem ser tóxicas a espécies sensíveis. Entretanto, algumas espécies denominadas bioacumuladoras são menos sensíveis a poluentes atmosféricos e capazes de acumular elementos tóxicos em seus tecidos (De Temmerman *et al.* 2004).

A sensibilidade das plantas ao flúor depende de fatores genéticos, edáficos, climáticos, dentre outros (Weinstein & Davison 2003), sendo a seleção de espécies adaptadas ao clima tropical imprescindível em estudos de biomonitoramento (Chaves *et al.* 2002; Oliva & Figueiredo 2005). Dentre as espécies vegetais, atualmente em estudo, destacam-se as gramíneas, por possuírem ampla distribuição geográfica nas regiões tropical e subtropical e elevadas taxas de crescimento, o que sugere a possibilidade do emprego de espécies sensíveis ou acumuladoras como indicadoras da presença de flúor no ambiente (Oliva & Figueiredo 2005). No Brasil, Oliva & Figueiredo (2005) avaliaram a sensibilidade de dez espécies de gramíneas tropicais, selecionando *Panicum maximum* cv. Colômbia como espécie sensível que, posteriormente, foi utilizada por Divan Junior *et al.* (2007) como indicadora da presença de fluoreto nas adjacências de uma fonte emissora.

¹ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Viçosa, MG, Brasil

² Autor para correspondência: brunoufmg@ufmg.br

A avaliação da sintomatologia, método mais utilizado para avaliar a sensibilidade de espécies vegetais a diversos fatores estressantes, frequentemente requer validação adicional com interpretação microscópica (Vollenweider *et al.* 2003; Reig-Arminañá *et al.* 2004) sendo que, nos últimos anos, diversos autores têm utilizado a anatomia vegetal como ferramenta no estudo dos efeitos de poluentes em plantas (Fornasiero 2001; 2003; Chaves *et al.* 2002; Sant'Anna-Santos *et al.* 2006; 2007; Sant'Anna-Santos & Azevedo 2007; Silva *et al.* 2005a; 2005b; 2006; Maranhão *et al.* 2006; Alves *et al.* 2008; Pedroso & Alves 2008).

Na bovinocultura, espécies do gênero *Brachiaria* são as mais utilizadas como forrageiras. Atualmente, o capim-braquiária é cultivado em 80 milhões de hectares, sendo *B. brizantha* e *B. decumbens* as espécies predominantes (Boddey *et al.* 2004). Considerando a ampla utilização de *B. brizantha* e *B. decumbens* como forrageiras na alimentação de bovinos, objetivou-se avaliar o potencial fitotóxico do flúor utilizando parâmetros morfoanatômicos e a capacidade de acumulação deste elemento, contribuindo com informações sobre a sensibilidade destas espécies ao poluente. Testaram-se as hipóteses de que, ao serem expostas ao flúor, as plantas acumulariam o poluente em seus tecidos e responderiam com sintomas macroscópicos e injúrias microscópicas nas porções sem danos aparentes.

Material e métodos

Foram utilizadas as gramíneas *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. decumbens* Stapf, forrageiras amplamente empregadas como pastagem, selecionadas por apresentarem crescimento rápido, fator essencial para a caracterização das respostas ao tratamento com flúor (Silva *et al.* 2000).

O plantio foi realizado em substrato comercial Natura Tropical, composto de origem mineral enriquecido com húmus. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade para 0,65 L, acondicionados a 1 m do chão em bancada coberta por plástico transparente, a fim de evitar entrada de água.

Em cada vaso, dez gramas de sementes foram plantadas a lanço e cobertas por uma camada de 1 cm de substrato. Após a germinação, quando as plantas atingiram cerca de 10 cm, realizou-se desbaste para uniformizar o estágio de desenvolvimento, deixando 15 plantas por vaso, seguindo protocolo proposto por Chaves *et al.* (2002).

O experimento foi composto por dois tratamentos e o delineamento experimental realizado em blocos ao acaso, com cinco vasos por tratamento. Dentre as 15 plantas de cada vaso, três foram marcadas para o acompanhamento do surgimento e evolução dos sintomas em resposta ao tratamento com flúor.

Ao atingirem o estágio de quatro folhas, as plantas foram expostas aos tratamentos, sendo submetidas a dez dias consecutivos de nevoeiros, segundo metodologia proposta por Silva *et al.* (2000). Durante cada simulação, as plantas foram expostas a 5,7 mm de nevoeiro. O tratamento com flúor foi preparado com 10 mg L⁻¹ de F⁻ na forma de KF (pH 6,0), com o intuito de simular a concentração de flúor observada nas adjacências de áreas poluídas (Smith & Hodge 1979). Com um pulverizador manual foram distribuídos, uniformemente, 200 ml de solução sobre a superfície vegetal. No tratamento controle utilizou-se apenas água destilada (pH 6,0).

A coleta do material vegetal foi realizada 24 h após a última aplicação de nevoeiro simulado, amostrando-se folhas expandidas. As folhas foram digitalizadas em scanner e a área ocupada pelas manchas cloróticas e necróticas (porcentagem de área foliar com injúria) foi mensurada com auxílio do software Image Pro-Plus versão 4.1 para Windows®. Utilizou-se a seguinte escala proposta por Silva *et al.* (2000): levemente injuriada (com manchas necróticas e cloróticas esparsas), moderadamente injuriada

(com 30 a 50% da área foliar injuriada), muito injuriada (com 50 a 70% da área foliar necrosada) e extremamente injuriada (com mais de 70% de área foliar necrosada).

Para a quantificação do conteúdo de flúor nos tecidos vegetais foram coletadas folhas, raízes e rizomas das plantas (n=5), 24 h após a última pulverização. As amostras foram previamente secas em estufa a 70°C e reduzidas, em moinho do tipo Wiley, a partículas com dimensões inferiores a 1 mm. Aliquotas de 0,5 g de cada repetição foram submetidas à extração em ácido perclórico 0,1 M (Garcia-Ciudad *et al.* 1985), utilizando-se ajustador de força iônica (Larsen & Widdowson 1971) para determinação do teor de flúor com eletrodo íon específico. As análises foram conduzidas em duplicata e repetidas duas vezes.

Para microscopia eletrônica de varredura foram retirados fragmentos da porção mediana de folhas expandidas (n=3). No tratamento com flúor foram feitas coletas de porções foliares sadias situadas próximas às injúrias. As amostras foram coletadas 24 h após o término das simulações, fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%) em tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) (Karnovsky 1965). Após desidratação em série etílica e secagem ao ponto crítico (equipamento modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), os fragmentos foliares foram cobertos com ouro em metalizador (modelo FDU10, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) e, em seguida, observados e documentados em microscópio eletrônico de varredura com câmera digital acoplada (modelo Leo 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra) do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFF.

Amostras foliares do tratamento controle e de porções foliares não-injuriadas do tratamento com flúor (n=5) foram fixadas em FAA₅₀, por 48 horas, e estocadas em etanol 70%. Realizou-se a desidratação do material em série etílica, seguida pela inclusão em metacrilato. Secções transversais com 3 µm de espessura, obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), foram coradas com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully 1981) e montadas em resina sintética Permout. Para análise micromorfométrica foram mensuradas as áreas em secção transversal da epiderme das faces adaxial e abaxial, do mesófilo e do limbo. Foram realizadas 9 medidas/repetição/parâmetro, totalizando 36 registros por repetição com auxílio do software de análise de imagens Image Pro-Plus versão 4.1 para Windows®. As observações e documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio (Olympus AX70TRF) com câmera digital acoplada.

As médias obtidas, referentes aos dados de área foliar injuriada, acúmulo de flúor nos tecidos e área foliar em secção transversal foram comparadas pelo Teste t com variâncias estimadas separadamente, em nível de 5% de significância.

Resultados e discussão

No tratamento controle, as folhas de ambas as espécies apresentaram coloração verde brilhante (Fig. 1A, 1D). Nas plantas expostas ao flúor, cloroses de forma e tamanho irregular e coloração verde-opaca foram observadas, principalmente, nas margens foliares, conforme observado por Chaves *et al.* (2002) em folhas de *P. maximum* e *Chloris gayana* expostas ao poluente. Como o flúor é um elemento eletronegativo, ele pode se ligar ao Mg²⁺ formando complexos responsáveis pelo surgimento de zonas sem coloração em algumas porções das folhas, devido à redução na biossíntese de clorofila (Fornasiero 2001). Com o decorrer do tempo de exposição, as cloroses evoluíram para necroses pequenas e esparsas localizadas nas margens e no ápice das folhas expostas ao flúor (Fig. 1B, 1C, 1E-F).

As lesões observadas surgiram cinco dias após o início da exposição ao flúor. Resultado semelhante foi observado por Oliva & Figueiredo (2005), que ao estudar os efeitos do flúor (15 µg mL⁻¹) em dez espécies de gramíneas verificaram que em *B. decumbens* os primeiros sintomas surgiram a partir do quarto dia de exposição ao poluente.

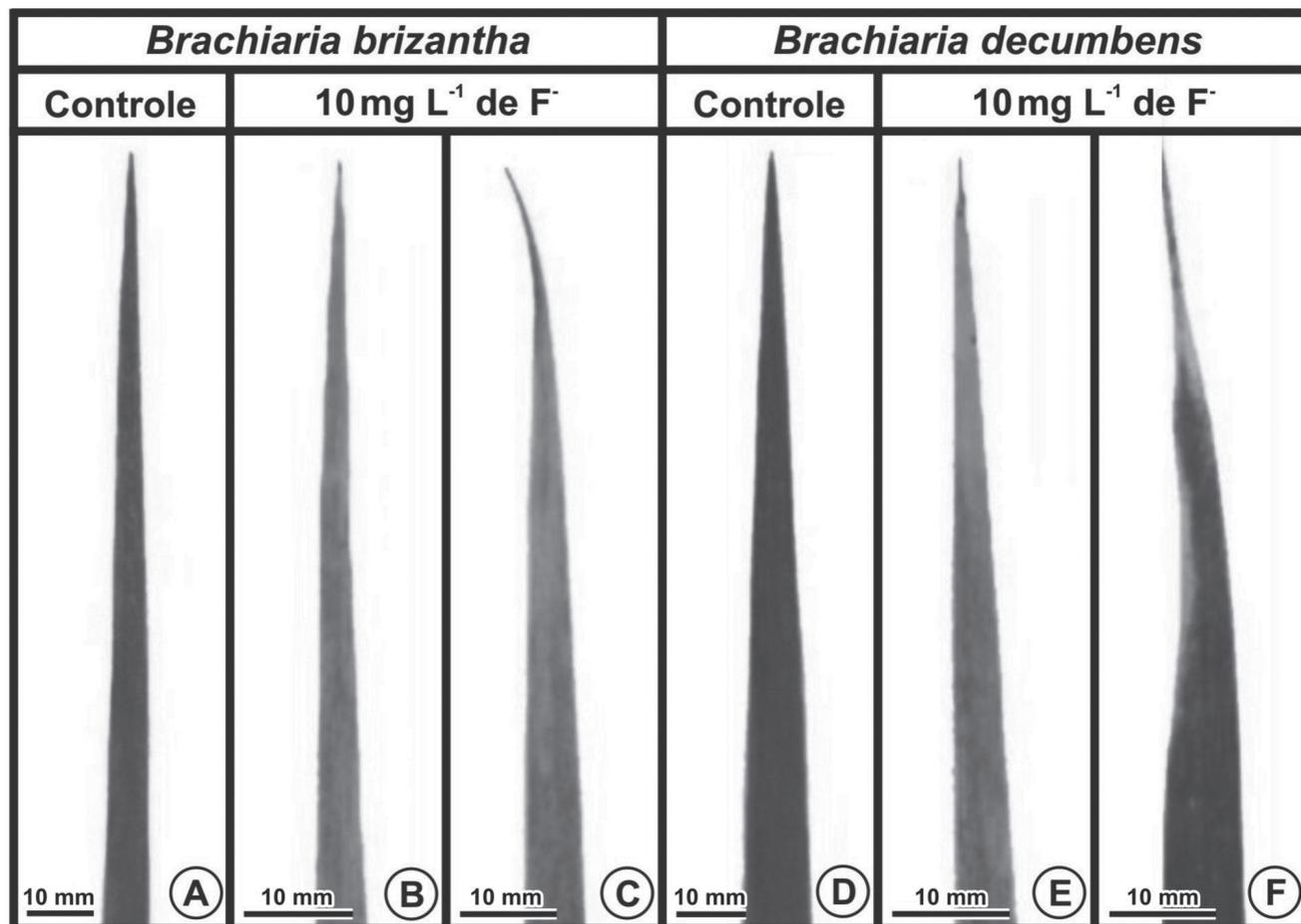


Figura 1. Sintomas da toxicidade de flúor em folhas expandidas de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. e *Brachiaria decumbens* Stapf. A e D - Controle. B, C, E e F - Folhas cloróticas e com necroses apicais e marginais.

Ao final do experimento, observou-se uma pequena área foliar necrosada nas plantas de *B. brizantha* ($3,17 \pm 1,23\%$) e *B. decumbens* ($4,42 \pm 1,37\%$) expostas ao flúor, não tendo sido observada diferença significativa entre as duas espécies ($p > 0,05$). De acordo com a escala proposta por Silva *et al.* (2000), ambas as espécies de *Brachiaria* são classificadas como levemente injuriadas em resposta ao poluente, já que as lesões ocuparam uma área foliar inferior a 5%.

As folhas jovens não apresentaram injúrias, como também observado por Fornasiero (2001), em *H. perforatum*. Entretanto, folhas jovens de *P. maximum* e *C. gayana* são as mais sensíveis ao flúor, como relatado por Chaves *et al.* (2002). Assim, a fitotoxicidade deste poluente depende principalmente da espécie avaliada, do estágio de desenvolvimento foliar e da concentração do poluente.

As folhas expostas ao poluente acumularam flúor ($p < 0,05$) em concentrações 4,4 e 5,2 vezes maiores que nas plantas controle, em *B. brizantha* e *B. decumbens*, respectivamente (Tab. 1), não havendo diferença significativa entre as duas espécies. Nas raízes e rizomas não houve acúmulo significativo do poluente ($p > 0,05$), o que corrobora os dados de Ledbetter *et al.* (1960), que constataram que a folha é o principal sítio de acumulação de flúor nas plantas.

Ao microscópio eletrônico de varredura observou-se, nas folhas de ambas as espécies, a presença de corpos de sílica, células-guarda halteriformes e tricomas em forma de espinho, morfologicamente semelhantes a acúleos (Fig. 2A, 3A), sendo observados macropêlos somente em *B. decumbens* (Fig. 3B). Nas duas espécies, os principais danos foram observados nas adjacências dos tricomas. Em *B. brizantha*, o flúor ocasionou a ruptura da cutícula na proximidade dos pêlos acúleos, promovendo o rompimento da parede do pêlo ou até mesmo seu completo destacamento do tecido epidérmico, levando à exposição da porção interna da célula (Fig. 2B-E). Já em *B. decumbens*, as lesões causadas pelo flúor estavam associadas aos macropêlos, que tiveram a cutícula rompida, levando à perda da célula apical do tricoma (Fig. 3C-E). Para Pushnik & Miller (1990), o flúor não se distribui uniformemente na folha, tendendo a se acumular nas áreas próximas ao ponto de entrada, como estômatos e/ou tricomas, onde ocorrem os maiores danos. Em *Panicum maximum* e *Chloris gayana*, os dados obtidos por Chaves *et al.* (2002) indicam a base dos tricomas como a via preferencial de entrada do flúor, em solução, nas folhas. Nas folhas expostas ao poluente, em ambas as espécies, ocorreu infestação por hifas nas proximidades de áreas com ceras epicuticulares

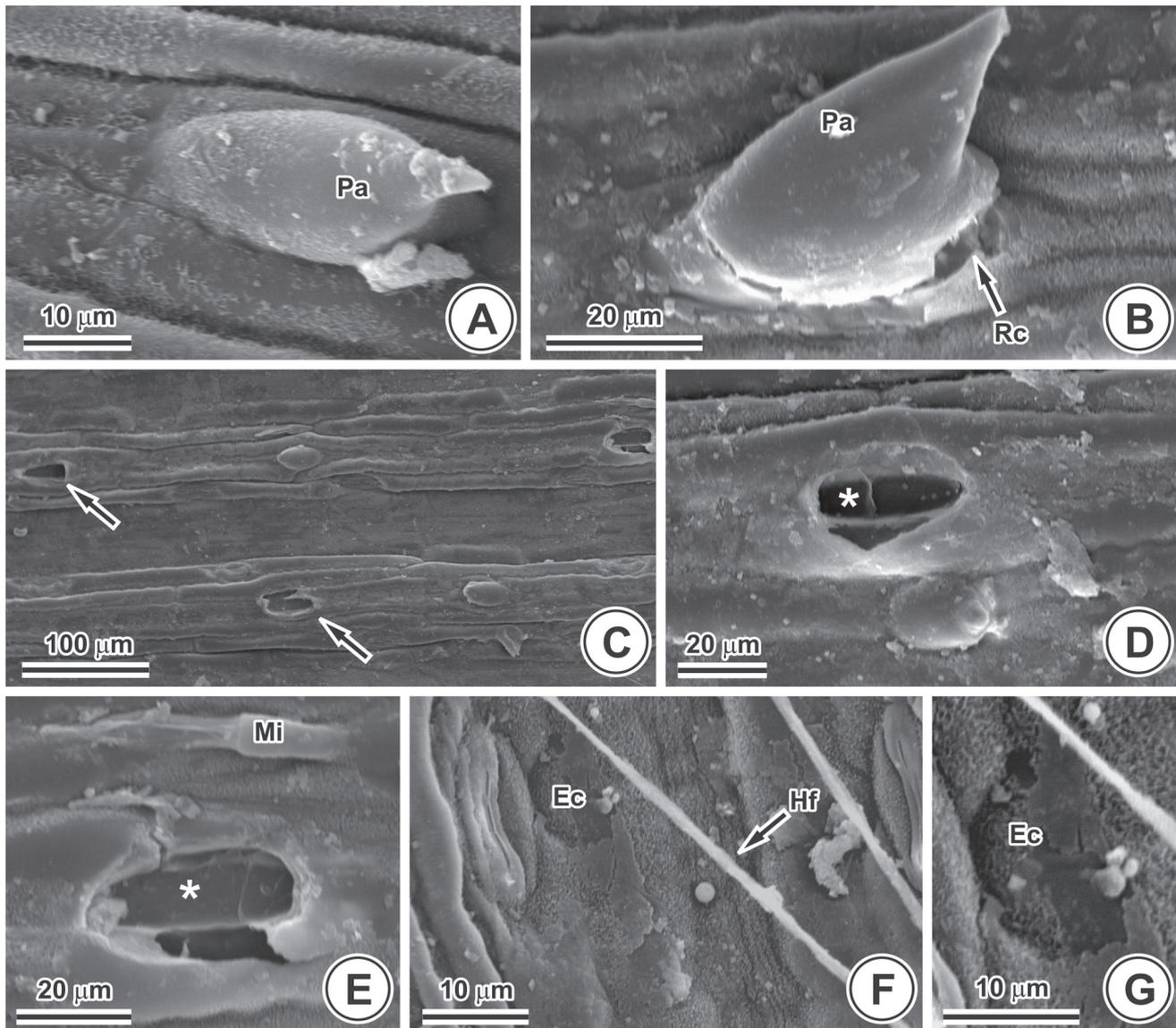


Figura 2. Micromorfologia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. A - Controle: pêlo acúleo (Pa). B-G - Flúor. B - Ruptura da cutícula (Rc). C - Ruptura dos pêlos acúleos (setas). D-E - Cicatrizes da queda de pêlo (*). F-G - Erosão da cera epicuticular (Ec) e hifas (Hf). Mi = micropêlo.

Tabela 1. Concentração de fluoreto nas raízes e rizomas de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. e *Brachiaria decumbens* Stapf.

Espécie	Órgão	Controle ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Flúor ($\mu\text{g g}^{-1}$)
<i>B. brizantha</i>	Folha	$1,24 \pm 0,12$ Ab	$5,44 \pm 0,46$ Aa
<i>B. decumbens</i>		$1,12 \pm 0,04$ Ab	$5,78 \pm 0,62$ Aa
<i>B. brizantha</i>	Raiz	$0,02 \pm 0,01$ Aa	$0,01 \pm 0,00$ Aa
<i>B. decumbens</i>		$0,02 \pm 0,01$ Aa	$0,01 \pm 0,00$ Aa
<i>B. brizantha</i>	Rizoma	$0,06 \pm 0,02$ Ba	$0,05 \pm 0,03$ Ba
<i>B. decumbens</i>		$0,14 \pm 0,01$ Aa	$0,13 \pm 0,04$ Aa

Letras iguais na coluna, dentro de cada fração, e minúsculas na linha não diferem significativamente ($p > 0,05$), segundo o teste t student.

erodidas (Fig. 2F-G, 3C). A remoção da cera epicuticular e dos tricomas, bem como a ruptura da cutícula, propiciam o maior umedecimento da superfície foliar, facilitando a proliferação de fungos (Sant'Anna-Santos *et al.* 2007).

No tratamento controle observou-se que as duas espécies apresentam caracteres anatômicos semelhantes (Fig. 4A, 5A). A partir da análise anatômica observou-se que, em resposta ao flúor, porções foliares visualmente sadias de

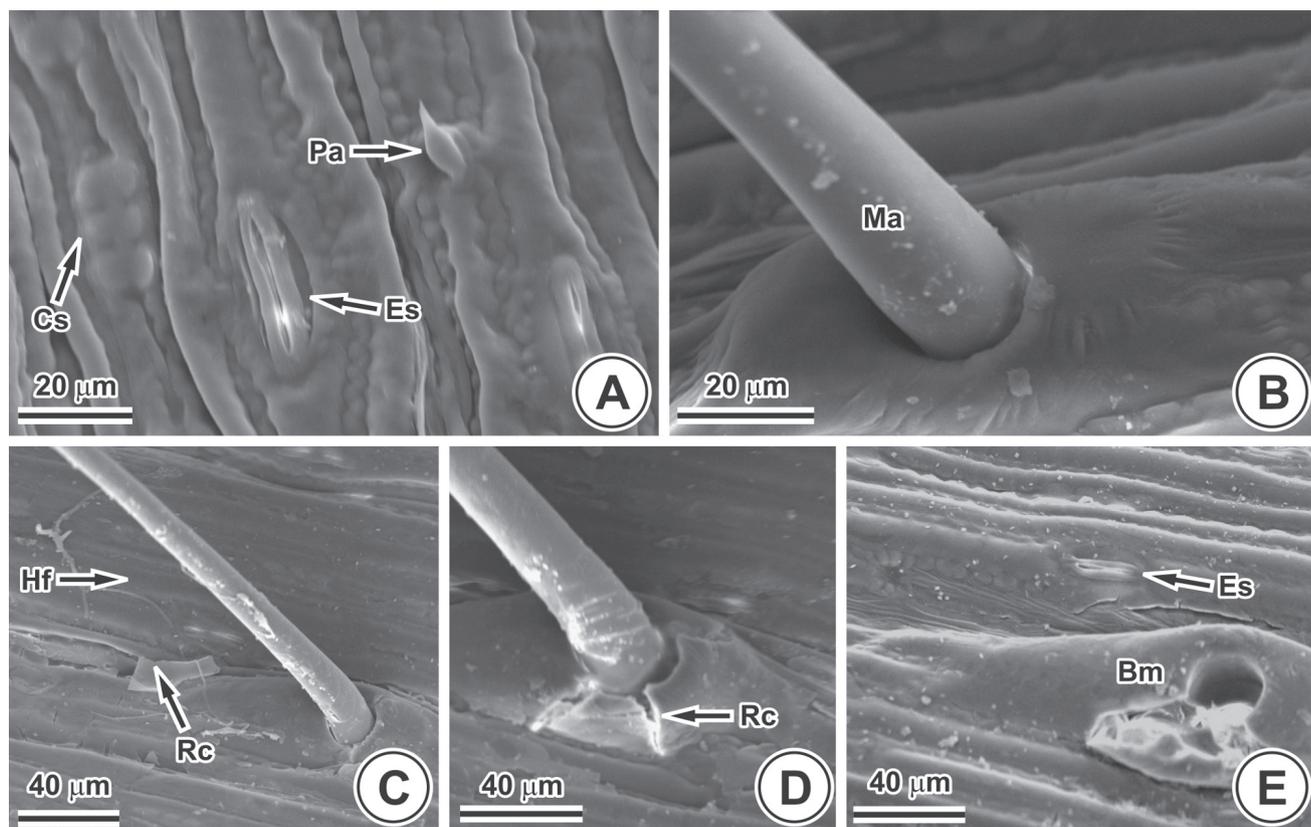


Figura 3. Micromorfologia foliar de *Brachiaria decumbens* Stapf. A-B - Controle. A - Pêlos acúleos (Pa) e corpos de sílica (Cs). B - Macropêlo (Ma). C-E - Flúor. C - Hifa (Hf) e ruptura da cutícula (Rc). D e E - Ruptura da cutícula e da base do macropêlo (Bm). Es = estômato.

ambas as espécies de *Brachiaria* apresentam danos microscópicos antes do surgimento de sintomas, conforme relatado na literatura (Sant'Anna-Santos *et al.* 2007). Houve perda da turgidez das células buliformes em *B. brizantha* (Fig. 4B) e de todos os tecidos em *B. decumbens*, observando-se desde pequenas sinuosidades na parede celular até o completo achatamento das células (Fig. 5B). Em *B. brizantha* não foram detectadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos caracteres micromorfométricos avaliados (Tab. 2). Já em *B. decumbens*, o flúor provocou alterações ($p < 0,05$) em todos os caracteres foliares mensurados (Tab. 2). Nesta espécie, verificou-se redução de 34,0% da área do limbo, em secção

transversal, nas plantas expostas ao poluente, em relação ao controle. A epiderme da face adaxial foi o tecido mais afetado pelo flúor, com diminuição de 44,8%. Os dados micromorfométricos supracitados confirmam uma maior sensibilidade de *B. decumbens* ao flúor, em comparação com *B. brizantha*. As alterações anatômicas têm sido frequentemente utilizadas como subsídio para comparação da susceptibilidade entre espécies (Sant'Anna-Santos *et al.* 2006) e até mesmo cultivares diferentes (Tuffi Santos *et al.* 2008) em resposta a agentes estressantes.

As duas espécies de braquiária estudadas apresentam taxas de acúmulo de fluoreto e sintomatologia semelhantes

Tabela 2. Área em secção transversal dos tecidos constituintes das folhas de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. e *Brachiaria decumbens* Stapf.

Espécie	Região	Controle (μm^2)	Flúor (μm^2)
<i>B. brizantha</i> <i>B. decumbens</i>	Epiderme da face adaxial	18.756 \pm 2.395 Aa 19.344 \pm 1.103 Aa	16.760 \pm 4.513 Aa 10.530 \pm 2.082 Ab
<i>B. brizantha</i> <i>B. decumbens</i>	Mesofilo	70.595 \pm 8.858 Aa 74.279 \pm 6.980 Aa	65.914 \pm 12.405 Aa 50.674 \pm 9.230 Ab
<i>B. brizantha</i> <i>B. decumbens</i>	Epiderme da face abaxial	9.580 \pm 935 Aa 8.914 \pm 450 Aa	8.880 \pm 1.133 Aa 6.192 \pm 894 Bb
<i>B. brizantha</i> <i>B. decumbens</i>	Limbo	98.932 \pm 10.807 Aa 102.538 \pm 8.198 Aa	90.693 \pm 14.147 Aa 67.397 \pm 12.054 Bb

Letras iguais na coluna, dentro de cada fração, e minúsculas na linha não diferem significativamente ($p > 0,05$), segundo o teste t student.

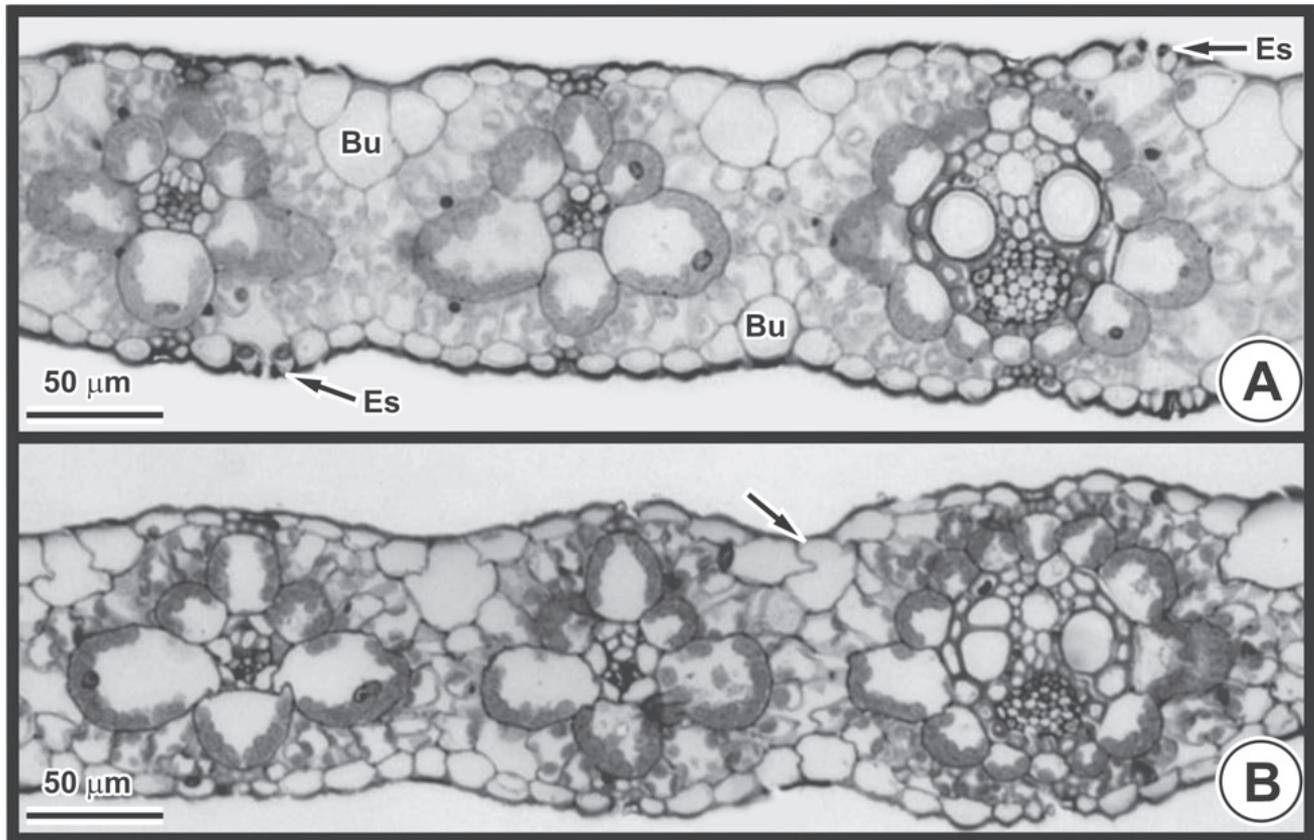


Figura 4. Anatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. (microscopia de luz - secção transversal). A - Controle: estômatos (Es) e células buliformes (Bu) em ambas as faces. B - Flúor: células buliformes com forma alterada (seta).

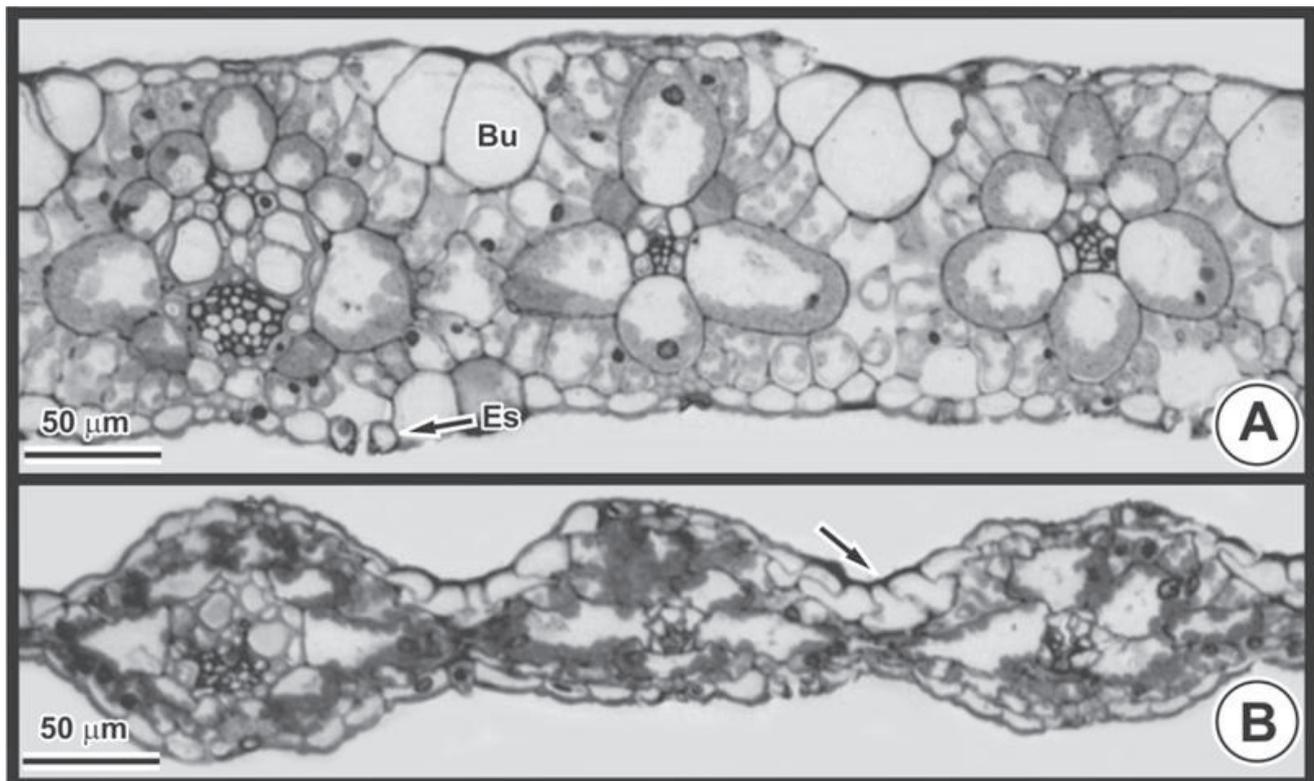


Figura 5. Anatomia foliar de *B. decumbens* Stapf. (microscopia de luz - secção transversal). A - Controle: células buliformes (Bu) na face adaxial. B - Flúor: células epidérmicas e do mesófilo com forma alterada (seta) e redução na espessura da folha. Estômato = (Es).

quando expostas ao poluente. Os danos micromorfológicos foram evidentes e similares em ambas as espécies e sugerem que os tricomas sejam vias preferenciais de penetração do flúor. Apesar das alterações micromorfológicas observadas nas duas espécies estudadas, *B. decumbens* é mais sensível que *B. brizantha* devido às alterações micromorfológicas, que indicam a ocorrência de danos em nível celular, antes mesmo do aparecimento dos sintomas na região analisada. Experimentos de longa duração serão essenciais para determinar o potencial bioacumulador de *B. brizantha*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, a Vânia Maria Valente, pelo auxílio em parte dos procedimentos laboratoriais e a Daniela Chaves Resende, pela ajuda prestada para a realização das análises estatísticas.

Referências bibliográficas

- Alves, E.S.; Tresmondi, F. & Longui, E.L. 2008. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 22: 241-248.
- Boddey, R.M.; Macedo, R.; Tarre, R.M.; Ferreira, E.; Oliveira, O.C.; Rezende, C.P.; Cantarutti, R.B.; Pereira, J.M.; Alves, B.J.R. & Urquiaga, S. 2004. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems & Environment** 103: 389-403.
- 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. (colômbio) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-rhodes) – Poaceae. **Acta Botanica Brasilica** 16: 395-406.
- De Temmerman, L.; Bell, J.N.B.; Garrec, J.P.; Klumpp, A.; Krause, G.H.M. & Tonneijck, A.E.G. 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: A. Klumpp; W. Ansel & G. Klumpp (eds.): **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness**. Göttingen, Cuvillier Verlag.
- Denbesten, P.K. 1999. Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. **Community Dentistry and Oral Epidemiology** 27: 41-47.
- 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. Colômbio. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67: 247-253.
- 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.
- Garcia-Ciudad, A.; Garcia-Criado, B. & Emetrio, C.P. 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.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137-138.
- Larsen, S. & Widdowson, A.E. 1971. Soil Fluoride. **Journal of Soil Science** 22: 210-221.
- Ledbetter, M.C.; Mavrodineanu, R. & Weiss, A.J. 1960. Distribution studies of radioactive fluoride-18 and stable fluoride-19 in tomato plants. **Contribution of the Boyce Thompson Institute** 20: 331-348.
- Loganathan, P.; Hedley, M.J.; Bretherton, M.R. & Rowarth, J.S. 2004. Accounting for particle movement when assessing the dissolution of slow release fertilizers in field soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems** 70: 77-84.
- Lucioli, J.; Furlan, F.H.; Mezaroba, S.; Raymundo, D.L.; Bechtold, S.L.; Traverso, S.D. & Gava, A. 2007. Intoxicação aguda por fluossilicato de sódio em bovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 27: 49-52.
- Maranho, L.T.; Galvão, F.; Preussler, K.H.; Muñoz, G.I.B. & Kuniyoshi, Y.S. 2006. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botanica Brasilica** 20: 501-750.
- Miller, G.W. 1993. The effect of fluoride on higher plants: with especial emphasis on early physiological and biochemical disorders. **Fluoride** 26: 3-22.
- O'Brien, T.P. & McCully, M.E. 1981. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty.
- Oliva, M.A. & Figueiredo, J.G. 2005. Gramíneas bioindicadoras de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica** 28: 389-397.
- Pedroso, A.N.V. & Alves, E.S. 2008. Anatomia foliar comparativa das cultivares de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) sensível e tolerante ao ozônio. **Acta Botanica Brasilica** 22: 21-28.
- Pushnik, J.C. & Miller, G.W. 1990. The influences of elevated environmental fluoride on the physiology and metabolism of higher plants. **Fluoride** 23: 5-19.
- Reig-Arminañá, J.; Calatayud, V.; Cervero, J.; Garcia-Breijo, F.J.; Ibars, A. & Sanz, M.J. 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). **Environmental Pollution** 132: 321-331.
- Sant'Anna-Santos, B.F. & Azevedo, A.A. 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxicidade do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 48-50.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Silva, C.S.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M.; Alves, E.F.; Silva, E.A.M. & Aguiar, R. 2006. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany** 58: 158-168.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Duque-Brasil, R.; Azevedo, A.A.; Silveira, A.S.; Araújo, J.M. & Aguiar, R. 2007. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxicidade do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore** 31: 761-771.
- Sharma, H.C. 1985. Effect of hydrogen fluoride fumigation in *Triticum aestivum*, *Brassica juncea* and *Phaseolus aureus* plants. **Fluoride** 18: 5-22.
- Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Silva, E.A. & 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.
- Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Silva, E.A.M. & Oliva, M.A. 2005a. Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). **Australian Journal of Botany** 53: 789-796.
- Silva, L.C.; Oliva, M.A.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M. & Aguiar, R.M. 2005b. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Chusca hilariana*. **Water, Air and Soil Pollution** 168: 129-143.
- Silva, L.C.; Oliva, M.A.; Azevedo, A.A. & Araújo, J.M. 2006. Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. **Water Air and Soil Pollution** 175: 241-256.
- Smith, F.A. & Hodge, H.C. 1979. Airborne fluorides and man: Part I. **Critical Review of Environment Control** 8: 293-372.
- Sun, E.G. & Su, H.J. 1985. Fluoride injury to rice plants caused by air pollution emitted from ceramic brick factories. **Environmental Pollution** 37: 335-342.
- Tuffi Santos, L.D.; Sant'Anna-Santos, B.F.; Meira, R.M.S.A.; Tiburcio, R.A.S.; Ferreira, F.A.; Melo, C.A.D. & Silva, E.F.S. 2008. Danos visuais e anatômicos causados pelo glyphosate em folhas de *Eucalyptus grandis*. **Planta Daninha** 26: 9-16.
- Vollenweider, P.; Ottiger, M. & Günthard-Goerg, M.S. 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. **Environmental Pollution** 124: 101-118.
- Weinstein, L.H. & Davison, A.W. 2003. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution** 125: 3-11.