

Toxicidade e acúmulo de flúor em hortaliças nas adjacências de uma fábrica de alumínio

Bruno Francisco Sant'Anna-Santos^{1,2} e Aristéa Alves Azevedo¹

Recebido em 18/02/2010. Aceito em 30/09/2010

RESUMO – (Toxicidade e acúmulo de flúor em hortaliças nas adjacências de uma fábrica de alumínio). Com o objetivo de avaliar o potencial de acumulação de flúor e o percentual deste elemento removido pela lavagem, quatro espécies de hortaliças foram expostas em área poluída. *Spondias dulcis* foi utilizada como bioindicadora de reação e apresentou sintomas típicos em resposta ao poluente. Somente a salsa apresentou sintomas. Apesar de aparentemente saudáveis, as folhas das outras espécies utilizadas para estudos microscópicos, exceto da cebolinha, evidenciaram alterações na superfície, principalmente associados aos estômatos. Houve redução na espessura do limbo, mais acentuada no manjeriço e na cebolinha, havendo formação de tecido de cicatrização na couve e condensação do conteúdo das células epidérmicas na salsa. As folhas subuladas e eretas da cebolinha favoreceram o menor acúmulo do poluente; já na salsa, as folhas laminares, recortadas e paralelas ao solo contribuíram para a maior retenção. A lavagem das folhas removeu 34,1 e 73,9% do flúor na cebolinha e na salsa, respectivamente, indicando que a maior parte do poluente encontrava-se internamente na cebolinha e externamente na salsa. O cultivo destas hortaliças em áreas poluídas por flúor é inadequado, pois os teores do poluente estão acima do recomendado para o consumo, mesmo após a lavagem das folhas.

Palavras-chave: anatomia foliar, *Allium schoenoprasum*, *Brassica oleracea*, *Ocimum basilicum*, *Petroselinum crispum*

ABSTRACT – (Toxicity and fluoride accumulation in herbs grown in the vicinity of an aluminum plant). To assess fluoride accumulation potential and the percentage of fluoride removed by washing, four herb species were exposed to a polluted area. *Spondias dulcis* was used as a responsive bioindicator and showed typical fluoride response symptoms. Symptoms were observed only in parsley. Although apparently healthy, the leaves of the remaining herbs, except for chives, showed surface damage associated mainly with stomata when observed under the microscope. A reduction in leaf thickness was also observed, most prominently in basil and chives. Scar tissue was observed in kale, and a retraction of the protoplast of the epidermal cells was observed in parsley. The subulate, erect leaves of chives accumulated less fluoride; on the other hand, parsley leaves are laminar, lobed and parallel to the soil, which contributed to higher pollutant retention. Washing the leaves removed 34.1 and 73.9% of the fluoride on chives and parsley, respectively, indicating that for chives, most of the pollutant was found inside the leaves, while for parsley, the pollutant was located on the outside. Growing these herbs in fluoride-polluted areas is not recommended, since pollutant percentages are above levels recommended for consumption, even after washing the leaves.

Key words: leaf anatomy, *Allium schoenoprasum*, *Brassica oleracea*, *Ocimum basilicum*, *Petroselinum crispum*

Introdução

O flúor, poluente atmosférico extremamente fitotóxico (Weinstein & Davison 2003), pode ser liberado na atmosfera durante a produção de alumínio, tijolos, vidros e aço (Fornasiero 2001). Nas plantas, o flúor penetra principalmente pela folha (Fortes *et al.* 2003) que é o órgão mais estudado para avaliação do impacto causado por poluentes (Silva *et al.* 2000) e o principal sítio de acumulação deste elemento (Ledbetter *et al.* 1960). Entretanto, algumas espécies vegetais são capazes de acumular grandes quantidades de flúor em suas folhas sem apresentar injúrias visuais (Arndt *et al.* 1995), o que torna o uso apenas da sintomatologia inadequado na avaliação do efeito de substâncias fitotóxicas (Tuffi Santos *et al.* 2007). Em resposta ao flúor, por exemplo, danos microscópicos drásticos em folhas visualmente saudáveis já foram relatados em *Bracharia brizantha*, *B. decumbens* (Pita-Barbosa *et al.* 2009); *Magnolia ovata* (Sant'Anna-Santos *et al.* 2007), *Joannesia princeps* e *Spondias dulcis* (Sant'Anna-Santos & Azevedo 2007). Assim, análises microscópicas são essenciais e podem auxiliar no diagnóstico precoce da injúria antes do surgimento de sintomas visíveis além de auxiliar no esclarecimento os mecanismos de fitotoxicidade (Silva *et al.* 2000; Sant'Anna-Santos *et al.* 2006a; Sant'Anna-Santos *et al.* 2007; Sant'Anna-Santos & Azevedo 2007).

Em espécies que acumulam flúor sem apresentar danos visíveis o consumo de folhas contaminadas oferece risco considerável a saúde humana (Peixoto *et al.* 2005) pois pode aumentar significativamente a absorção e acúmulo desse elemento e causar fluorose dentária e-ou óssea, além de efeitos mutagênicos (Mohamed & Chandler 1977; WHO 2002; Jones *et al.* 2005). O flúor ingerido é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal, carregado pela corrente sanguínea e excretado via sistema renal ou é incorporado aos tecidos calcificados, sendo que a maior parte do elemento incorporado ao esqueleto e aos dentes tem uma meia-vida biológica de vários anos (WHO 2002).

Zhou *et al.* (2006) observaram elevados teores do flúor em hortaliças cultivadas nas proximidades de uma fonte emissora de poluentes na China desaconselhando, desta forma, o cultivo de plantas para o consumo animal na área. No Brasil, a cidade de Ouro Preto, localizada a sudeste da zona mais povoada e industrializada do Estado de Minas Gerais, denominada Zona Metalúrgica (Divan Junior *et al.* 2007), está sujeita aos impactos do flúor, oriundos de uma fábrica de alumínio, conforme resultados obtidos por meio de experimentos de biomonitoramento com plantas (Divan Junior *et al.* 2007; Divan Junior *et al.* 2008). Algumas espécies da flora nativa apresentaram sinais claros de contaminação por flúor, atingindo níveis superiores a 1000 µg g⁻¹ do poluente (Divan Junior *et al.* 2008) que, segundo

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

² Autor para correspondência: brunoufmg@ufmg.br

Treshow & Anderson (1989), ocorrem próximo a fontes emissoras sem controle de suas emissões.

Considerando a presença de hortas em residências de vilas situadas nas adjacências de uma fonte emissora de poluentes objetivou-se: avaliar o potencial acumulador de flúor em espécies de hortaliças utilizadas pelos moradores da região; avaliar a fitotoxicidade causada pelo poluente, nas espécies estudadas, a partir da associação de parâmetros macro e microscópicos e, determinar a percentagem de flúor removida pela lavagem das folhas com água. Testaram-se as seguintes hipóteses: hortaliças expostas a fontes emissoras de flúor acumulam o poluente e a lavagem das folhas antes do consumo não promove a remoção do poluente para quantidades aconselháveis a sua ingestão.

Material e métodos

Foram utilizadas as espécies *Allium schoenoprasum* L. (Liliaceae), *Brassica oleracea* var. *acephala* DC. (Brassicaceae), *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) e *Petroselinum crispum* (Mill.) Mansf. (Apiaceae), popularmente conhecidas como cebolinha, couve, manjerição e salsa, respectivamente.

Para a obtenção das plantas, sementes certificadas das hortaliças foram semeadas em substrato comercial, em bandejas de isopor desinfestadas (com água sanitária) em ambiente protegido. Cerca de 15 dias após a germinação, quando as plântulas atingiram cerca de 30 mm, foram transplantadas para vasos de polipropileno com 200 mm de largura, 200 mm de profundidade e 600 mm de comprimento.

Spondias dulcis Forst. F. (Anacardiaceae) foi utilizada como espécie referência, na condição de bioindicadora ativa de níveis fitotóxicos de flúor na atmosfera, haja vista que os sintomas macro e microscópicos em resposta ao poluente já foram descritos em laboratório (Silva *et al.* 2000; Sant'Anna-Santos & Azevedo 2007) e na mesma área do presente estudo (Sant'Anna-Santos 2008).

As plantas de *S. dulcis* foram obtidas a partir de propagação semínifera de um único indivíduo adulto situado nas adjacências do Viveiro do Parque Estadual do Rio Doce-MG (VPERD), a 280 m de altitude e localização determinada pelas coordenadas geográficas de 19°57'04" de latitude sul e 42°50'27" de longitude oeste, mapeado mediante utilização do sistema de posicionamento global (modelo GPS II plus, Garmin Ltd., Hampshire, UK).

As sementes foram plantadas em sacos plásticos de 10 cm de diâmetro por 22 cm de comprimento contendo mistura de solo, moínha de carvão e adubo, composição usualmente utilizada no VPERD. Com dois meses de idade, as mudas foram transferidas para vasos de 2,6 dm³ e aclimatadas durante dois meses, em ambiente não poluído, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Todas as plantas receberam solução nutritiva de Hoagland a 0,25 de força (Hoagland & Arnon 1950) a cada cinco dias, seguindo metodologia proposta por Silva *et al.* (2000), até atingirem cerca de cinco meses de idade. O experimento foi conduzido em blocos aos acaso, com quatro repetições por tratamento.

As plantas foram expostas no campo no período 27/09/08 a 06/10/08. As mudas de *S. dulcis* foram dispostas em estantes a 1,5 m do solo, conforme recomendado por Divan Junior *et al.* (2007) para execução de biomonitoramento ativo. Já os vasos contendo as hortaliças foram dispostos no chão, visando simular as condições de cultivo em hortas.

Seguindo metodologia adotada por Divan Junior *et al.* (2007), o experimento foi conduzido em dois municípios, Ouro Preto e Viçosa, ambos localizados no estado de Minas Gerais, Brasil, denominados área poluída (AP) e estação referência (ER), respectivamente. Na AP, as plantas foram expostas às imissões de poluentes da fábrica de alumínio em área aberta de uma residência na Vila dos Engenheiros, a 0,78 km da fonte emissora, localizada a 1101 m de altitude, nas coordenadas geográficas de 20°24'09,7" de latitude sul e 43°31'14,8" de longitude oeste. Na AP, de acordo com Köppen, o clima é do tipo tropical de altitude e classificado como Cwb, caracterizado por verões chuvosos e invernos secos (Köppen 1948). A concentração de flúor no ar em Ouro Preto (AP), atingiu, durante os anos de 2000 a 2002, valores máximos

entre 6,22 e 12,87 mg m⁻³. Contudo, os limites relevantes de qualidade de ar adotados em muitos países para proteção de espécies sensíveis situam-se entre 0,3 e 0,5 g m⁻³ de HF (VDI 1989; EU 2001; MOE 2005). Já em relação ao SO₂, durante os três anos de monitoramento, níveis baixos deste poluente foram registrados, em conformidade com os padrões vigentes, justificando ser o flúor o poluente alvo do presente estudo.

Na ER, as plantas foram dispostas na UCP, em área livre da poluição (Divan Junior *et al.* 2007), a 78 Km da fonte emissora, a 649 m de altitude e localizada pelas coordenadas geográficas de 20°45'20" de latitude sul e 42°52'40" de longitude oeste. Em Viçosa (ER), de acordo com Köppen, o clima é do tipo tropical de altitude e classificado como Cwb, caracterizado por verões brandos (Köppen 1948).

Diariamente, durante a exposição das plantas no campo na AP e ER, foram feitas observações para acompanhar o aparecimento e a localização das injúrias relacionadas à ação do flúor, conforme proposto por Silva *et al.* (2000). A exposição no campo teve duração de nove dias, tempo utilizado por Divan Junior *et al.* (2007) na mesma área ao expor gramíneas bioindicadoras a poluição atmosférica. Também foram coletadas amostras foliares para análises microscópicas e quantificação de flúor.

Todas as amostras para análise microscópica foram coletadas em folhas sem sinais visíveis de injúria. As amostras foliares das hortaliças foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) em tampão cacodilato de sódio pH 7,2 acrescido de cloreto de cálcio 5mM (Karnovsky 1965). Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato e desidratadas em série etílica crescente e incluídas em glicol metacrilato (Histo-resin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha).

Para análise da estrutura foliar, cortes transversais (5µm de espessura) realizados em micrótomo rotativo (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) foram corados em azul de Toluidina/pH=4,0 (O'Brien & McCully 1981) e montados em água. Para observação e documentação fotográfica foi utilizado um microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo. Para análise micromorfométrica foi feita a mensuração da espessura do limbo (Lim), do parênquima paliádico (Pp) e do lacunoso (Pl) e da altura das células epidérmicas das faces adaxial (Ead) e abaxial (Eab), na porção da lâmina foliar entre a margem e a nervura mediana. De cada uma das repetições (planta), uma amostra foliar foi seccionada. De cada amostra, foram confeccionadas três lâminas histológicas contendo 18 cortes e, em cada lâmina, três cortes foram fotografados e geradas imagens digitais. De cada imagem digital foram realizadas três medições da espessura de cada um dos tecidos (Lim, Pp, Pl, Ead e Eab) gerando uma média, utilizando-se o software ANATI QUANTI, versão 2.0 para Windows® (Aguilar *et al.* 2007).

Para análise da micromorfologia foliar, as amostras previamente fixadas foram secas ao ponto crítico em equipamento apropriado (modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Após cobertura metálica com ouro (Metalizador modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), o material vegetal foi analisado ao microscópio eletrônico de varredura e as imagens registradas utilizando-se uma câmera digital acoplada (modelo JSMT200, Jeol Co., Tokyo, Japão).

Para a quantificação do teor do flúor na matéria seca, todas as folhas de cada uma das repetições foram previamente secas em estufa, a 70°C, e reduzidas a partículas com dimensões inferiores a 0,1 cm, em moínho do tipo Wiley. Posteriormente, alíquotas de 0,5 g, de cada repetição, foram submetidas à extração em ácido perclórico 0,1 M (Garcia-Ciudad *et al.* 1985), utilizando-se o ajustador de força iônica (Larsen & Widdowson 1971), para determinação potenciométrica do teor de fluoreto, através de eletrodo íon seletivo. Nas hortaliças, quatro indivíduos, de cada espécie, foram expostos, na AP e ER, para quantificação da percentagem do poluente removido pelo processo de lavagem em água, durante 15 minutos, segundo protocolo adotado por Zhou *et al.* (2006). Esse procedimento verificou se o processo de lavagem, que antecede o consumo de folhosas, remove quantidade considerável do poluente. Os teores de flúor nas amostras lavadas foram comparados com os valores encontrados nas amostras não submetidas à lavagem, sendo a diferença observada considerada como a quantidade de flúor removido pelo procedimento.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso e os dados obtidos referentes à quantificação de flúor e análise micromorfométrica foram submetidos à análise de variância. Quando a hipótese de nulidade foi rejeitada, diferenças significativas entre as amostras foram determinadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Após nove dias de exposição na área poluída (AP), as folhas de *A. schoenoprasum*, *O. basilicum*, *B. oleraceae* var. *acephala* apresentaram aspecto visual semelhante ao das plantas expostas na estação referência (ER), ambiente não poluído. No entanto, em *P. crispum* as folhas apresentavam cloroses e pequenos pontos necróticos homogeneamente distribuídos pela lâmina. Em *S. dulcis*, espécie referência, necroses apicais e marginais surgiram aos cinco dias de exposição das plantas expostas na AP, em contraste com o aspecto verde e brilhante das folhas nas plantas na ER. Os sintomas observados em *S. dulcis* são idênticos aos registrados em experimentos conduzidos em laboratório (Silva *et al.* 2000) e em campo (Sant'Anna-Santos 2008) e

típicas em resposta ao flúor (Ardnt *et al.* 1995), indicando a presença do poluente em níveis fitotóxicos na atmosfera. Apesar dos sintomas observados em *P. crispum* não serem semelhantes aos registros fotográficos disponíveis na literatura da fitotoxidez por flúor (Ardnt *et al.* 1995; Fornasiero 2001; Fortes *et al.* 2003; Weinstein & Davison 2003; 2004; Mezghani *et al.* 2005; Pita-Barbosa *et al.* 2009; Sant'Anna-Santos *et al.* 2007), pode haver variação na sintomatologia entre espécies vegetais distintas, conforme observado por Weinstein & Davison (2004) e pode haver, além da presença do flúor, outros poluentes cuja interação pode resultar em sintomatologia diversa da típica para flúor.

Ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), a superfície foliar das hortaliças avaliadas também apresenta variações (Figs. 1-4). Em *A. schoenoprasum*, as células

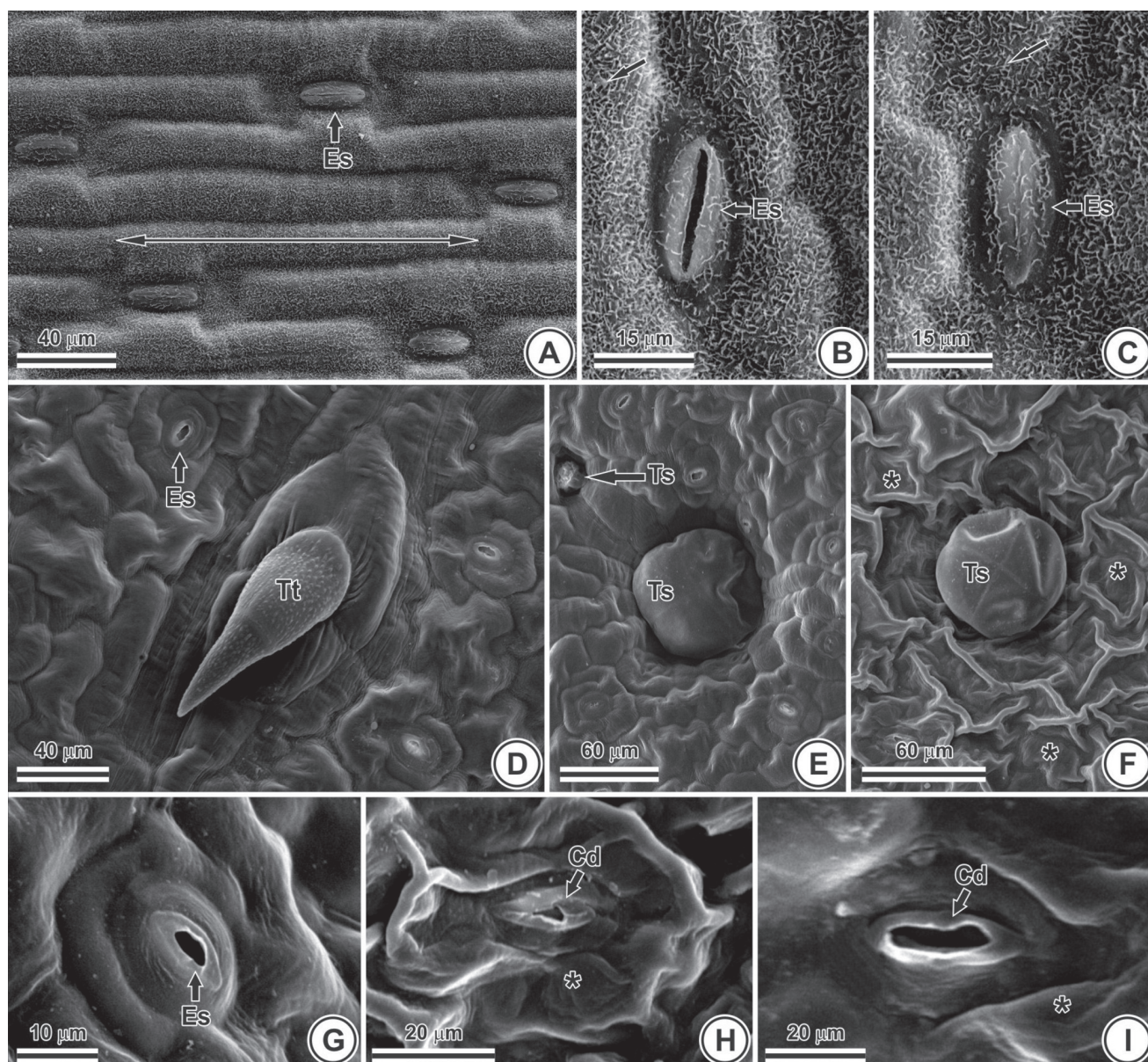


Figura 1. Eletromicrografias de folhas de *Allium schoenoprasum* L. (A-C) e *Ocimum basilicum* L. (D-I). A-B, D-E, G. Estação referência. C, F, H-I. Área poluída. Célula alongada (↔), ceras em placas (→), tricoma tector (Tt) e secretor (Ts), estômato (Es), relevo cuticular (*) e crista danificada (Cd).

epidérmicas são alongadas, os contornos das paredes anticlinais são retos (Fig. 1A) e as ceras epicuticulares estão dispostas em placas e distribuídas por toda superfície foliar, inclusive sobre os estômatos (Fig. 1B). Em *O. basilicum*, a epiderme, de ambas as faces da folha é repleta de tricomas tectores (Fig. 1D) e secretores (Fig. 1E) e de estômatos (Figs. 1D-E, G). *B. oleracea* var. *acephala* possui, também, folhas anfiestomáticas mas é desprovida de apêndices epidérmicos (Figs. 2A, G, I). Em *P. crispum*, estrias cuticulares são evidentes ao redor dos estômatos (Figs. 3A, F) e papilas estão presentes na região das nervuras (Fig. 4A, C). A partir da análise ao MEV observou-se que, em resposta ao flúor, excetuando-se *A. schoenoprasum* (Fig. 1C), porções foliares visualmente saudáveis das espécies de hortaliças apresentavam

danos microscópicos consideráveis. A ausência de danos em *A. schoenoprasum* pode estar relacionada à proteção conferida pela densa cobertura de ceras epicuticulares, inclusive sobre as células estomáticas (Fig. 1), conforme observado por Chaves *et al.* (2002) ao comparar *Chloris gayana* e *Panicum maximum*. Em *C. gayana*, a maior proporção de cera pode estar relacionada com a maior resistência à poluição por flúor. Em *O. basilicum* houve alteração no relevo cuticular (Fig. 1F) e na estrutura dos estômatos (Figs. 1H-I). Na superfície adaxial das folhas de *B. oleracea* var. *acephala* (Fig. 2B), principalmente na proximidade dos estômatos (Figs. 2C-E) houve erosão de partículas de cera epicuticular. Aglomerados de ceras erodidas recobriram algumas áreas da superfície foliar (Fig. 2F). Na face abaxial, extensos trechos

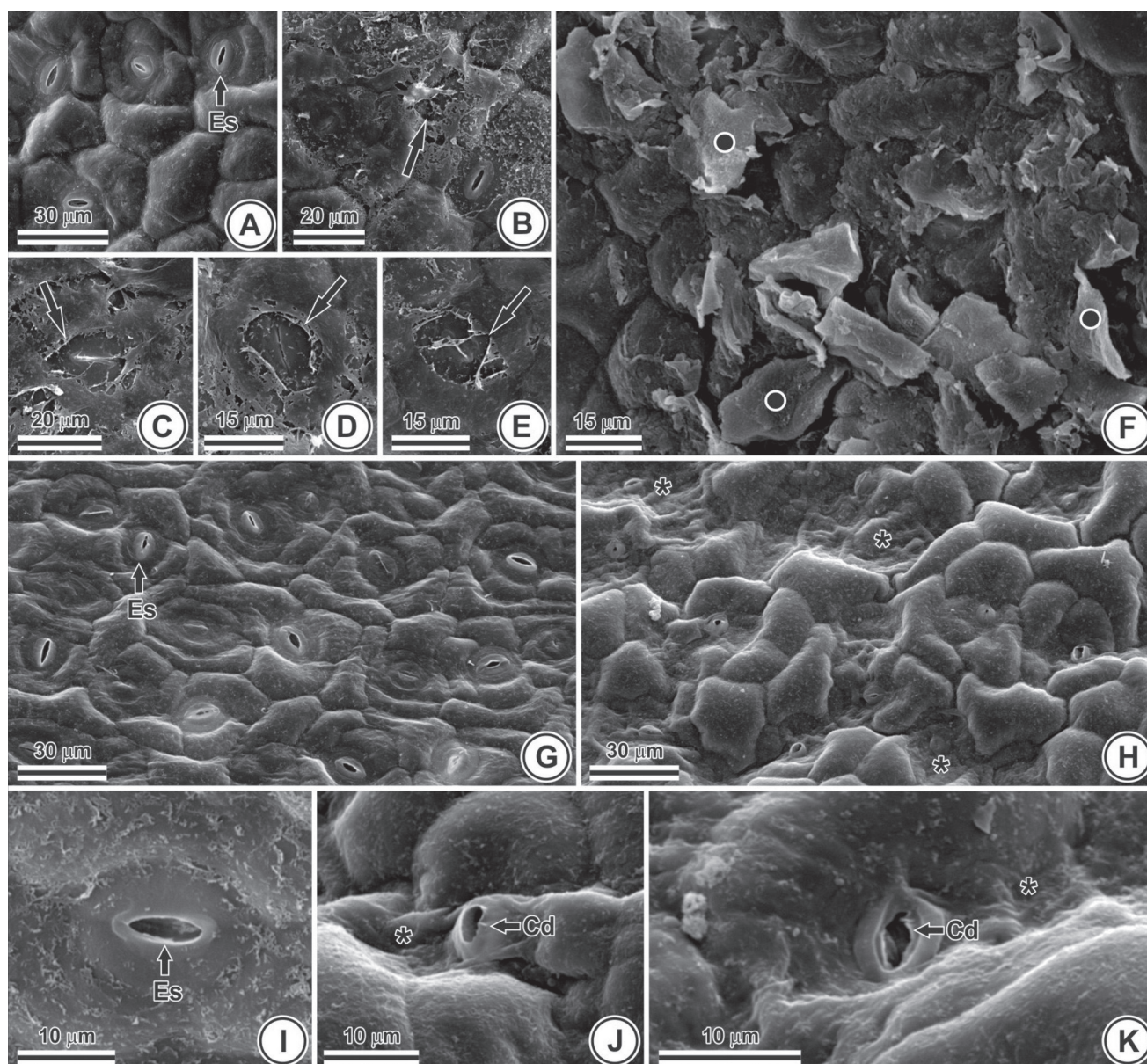


Figura 2. Eletromicrografias de folhas de *Brassica oleracea* var. *acephala* DC (faces adaxial (A-F) e abaxial (G-K)). A, G, I. Estação referência. B-F, H, J-K. Área poluída. Estômatos (Es), erosão de partículas (→) e placas (○) de ceras, relevo cuticular alterado (*) e crista danificada (Cd).

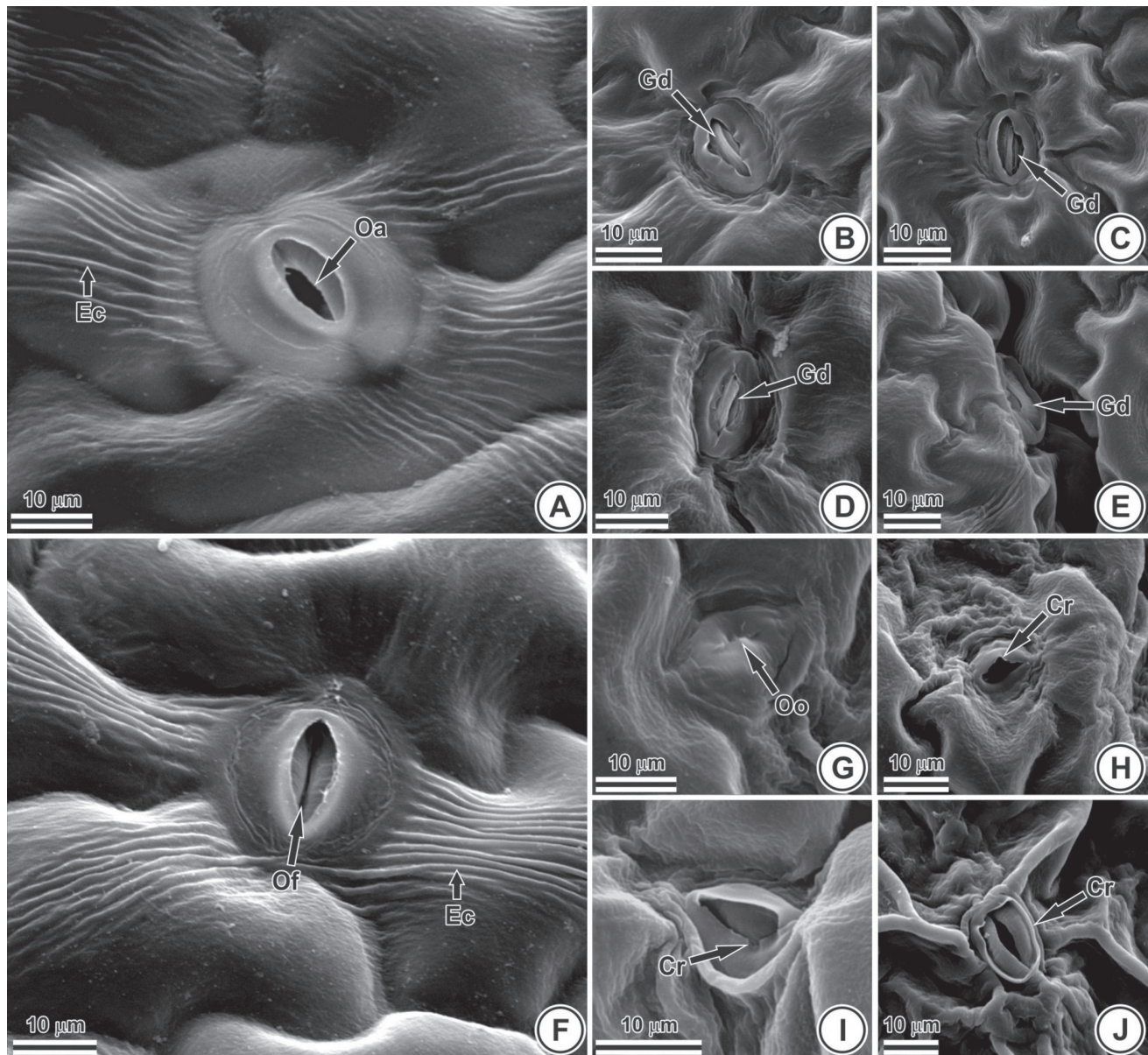


Figura 3. Eletromicrografias de folhas de *Petroselinum crispum* (Mill.) Mansf. (faces adaxial (A-E) e abaxial (F-J)). A e F. Estação referência. B-E, G-J. Área poluída. Estrias (Ec), ostíolo aberto (Oa) ou fechado (Of), ostíolo obliterado (Oo), célula-guarda danificada (Gd) e crista rompida (Cr).

apresentavam alterações no relevo cuticular (Fig. 2H), em geral, nas adjacências de estômatos cujas cristas estavam danificadas (Figs. 2J-K). Em *P. crispum*, os danos também estavam associados aos estômatos, em ambas as faces da folha (Fig. 3); na face adaxial, houve alteração no relevo cuticular e na estrutura das células-guarda (Figs. 3B-E) e, na face abaxial, a perda da arquitetura da crista estomática obliterou ostíolos (Fig. 3G). A ruptura da crista estomática foi parcial (Figs. 3H-J) ou total, ocasionando, no último caso, a total exposição das células-guarda (Fig. 3J). As papilas também se apresentavam retraídas (Figs. 4B, D). O flúor não se distribui uniformemente na folha, tendendo a se acumular nas áreas próximas ao ponto de entrada, onde ocorrem os maiores danos (Pushnik & Miller 1990). De

modo similar à maioria dos poluentes atmosféricos, o flúor gasoso penetra nas plantas através dos estômatos (Peixoto *et al.* 2005), onde foi observada a maior parte dos danos nas hortaliças expostas na AP.

Ao microscópio de luz observou-se, nas plantas de *A. schoenoprasum*, folhas subuladas com mesofilo dorsiventral formado por quatro a cinco camadas de parênquima paliçádico e três a quatro camadas de parênquima lacunoso (Fig. 5A). Em *O. basilicum*, as folhas possuem mesofilo dorsiventral formado por uma camada de parênquima paliçádico e quatro a seis camadas de parênquima lacunoso bráquiforme (Fig. 5C), e são anfiestomáticas (Figs. 5D-E). Em *B. oleracea* var. *acephala*, o mesofilo dorsiventral possui arranjo mais compacto (Figs. 6A, E). Na nervura mediana, quatro a cinco

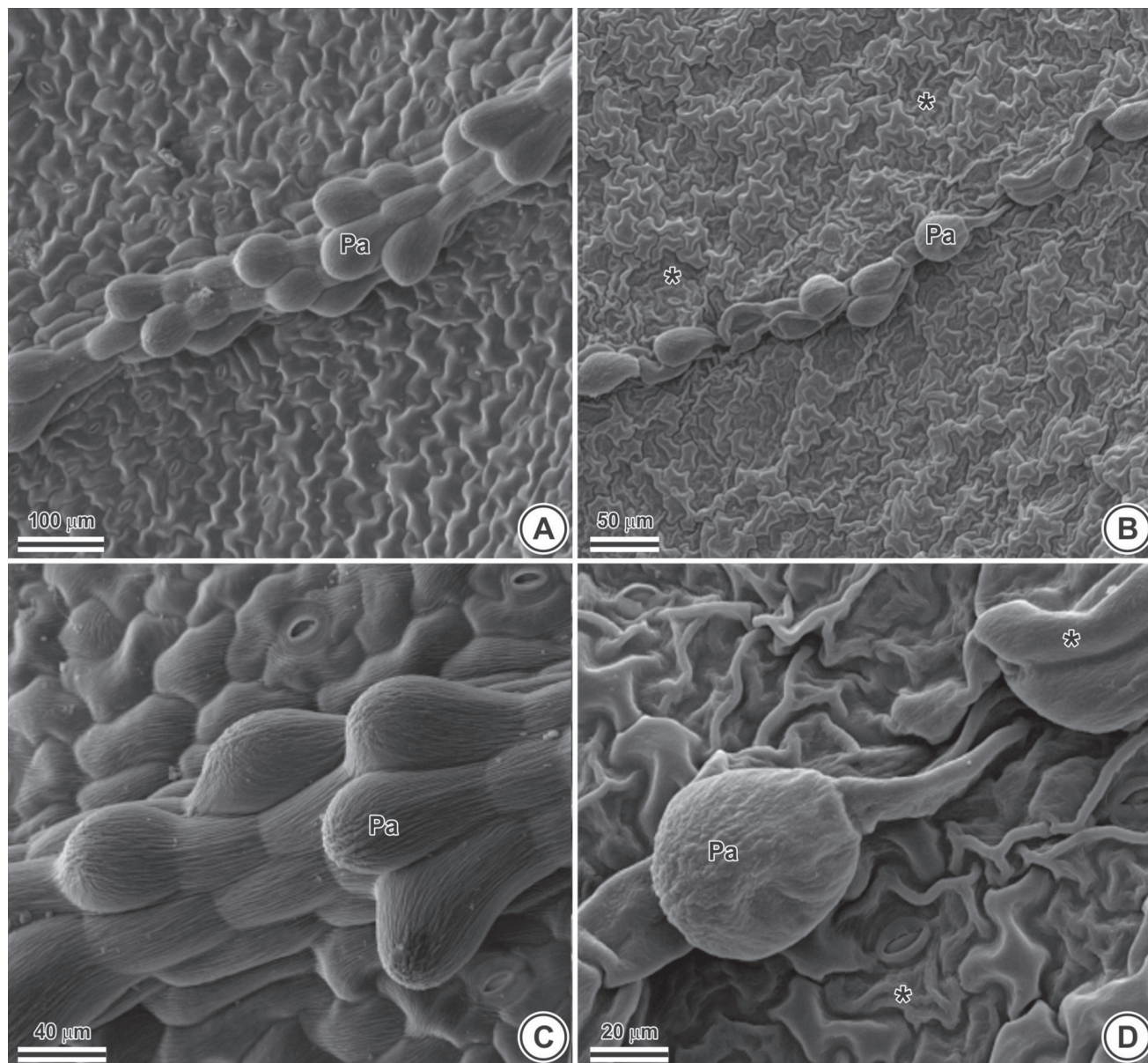


Figura 4. Eletromicrografias de folhas de *Petroselinum crispum* (Mill.) Mansf (face adaxial). A e C. Estação referência. B e D. Área poluída. Papilas (Pa) na região das nervuras e relevo cuticular alterado (*).

camadas de fibras ocorrem entre o feixe vascular colateral e o parênquima cortical, constituído de células isodiamétricas (Fig. 6C). No mesofilo dorsiventral de *P. crispum*, o parênquima paliádico se prolonga na região da nervura mediana sendo interrompido por uma calota de colênquima (Figs. 7A, C). Na nervura mediana, papilas ocorrem na face adaxial (Figs. 7A, C), sendo comum a presença de ductos secretores associados ao parênquima cortical voltado para a face abaxial da folha (Figs. 7A, E). Os estômatos também estão presentes em ambas as faces da folha (Figs. 7G, I). As folhas das plantas expostas na AP, apesar de aparentemente saudáveis, apresentaram danos estruturais em todas as espécies de hortaliças estudadas (Figs. 5-7). Nas espécies estudadas foi verificada redução na espessura da lâmina foliar ($p < 0,05$):

A. schoenoprasum, 28,2%; *O. basilicum*, 33,0%; *B. oleraceae* var. *acephala*, 20,7% e *P. crispum*, 14,7% (Fig. 8). Em todas as hortaliças, não houve redução significativa na espessura da epiderme nas plantas expostas na AP (Fig. 8), quando comparadas com as da ER.

Em *B. oleraceae* var. *acephala* e *P. crispum*, as injúrias ocorreram, também, na nervura mediana (Figs. 6 e 7). Em *B. oleraceae* var. *acephala*, houve a indução de hiperplasia de células do mesofilo e formação de um tecido de cicatrização constituído por células volumosas e de parede celular espessada (Figs. 6B, F-J). A formação do tecido de cicatrização resulta da formação de novas células a partir da capacidade proliferativa do parênquima (Dickison 2000), sendo observada em resposta ao flúor (Azevedo 1995), chuva

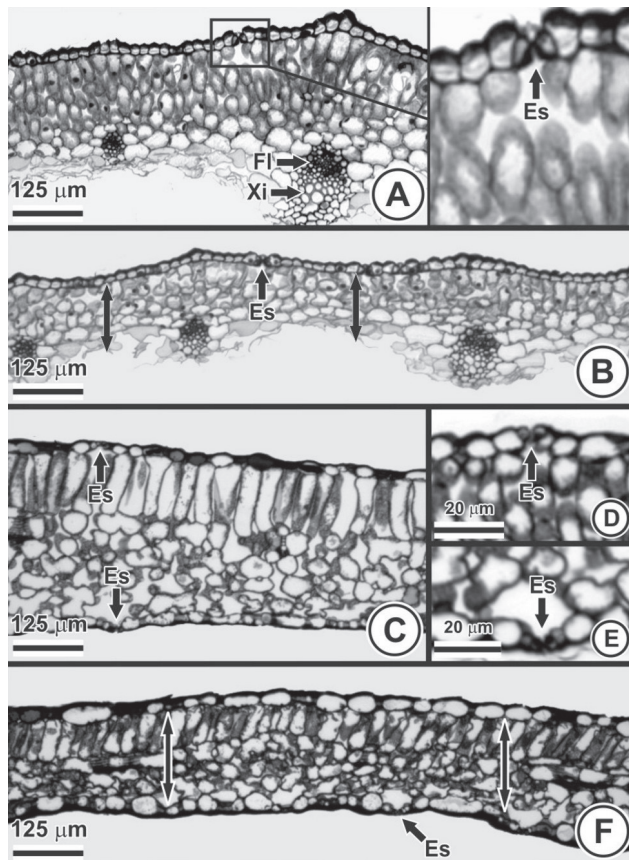


Figura 5. Anatomia foliar de *Allium schoenoprasum* L. (A-B) e *Ocimum basilicum* L. (C-F). (seções transversais). A, C-E. Estação referência. B e F. Área poluída. Estômatos (Es), espessura do mesofilo (↑), xilema (Xi) e floema (Fl).

ácida (Silva *et al.* 2005; Sant'Anna-Santos *et al.* 2006b), microorganismos (Dickison 2000) e herbicidas (Tuffi-Santos *et al.* 2008; 2009). No tecido de cicatrização houve acúmulo de compostos intensamente corados de verde pelo azul de toluidina (Figs. 6H-I). Esta coloração tem sido utilizada por alguns autores como indicativo de acúmulo de compostos de natureza fenólica (Briggs *et al.* 2005). O acúmulo de fenóis como um mecanismo de defesa das plantas foi relatado em outras espécies vegetais expostas ao flúor (Fornasiero 2001; Chaves *et al.* 2002; Sant'Anna-Santos *et al.* 2007).

Em *P. crispum*, na região da nervura mediana, houve condensação do conteúdo celular das papilas (Fig. 7D), também observado na epiderme de *Magnolia ovata*, em resposta ao flúor (Sant'Anna-Santos *et al.* 2007). As células do parênquima cortical e do epitélio secretor dos ductos também sofreram alteração no formato (Fig. 7E). Em alguns trechos, observou-se a formação de depressões na superfície foliar (Figs. 7H, J). Os danos descritos na morfologia foliar das hortaliças ao MEV são semelhantes aos relatados na literatura em plantas expostas ao flúor (Chaves *et al.* 2002; Sant'Anna-Santos & Azevedo 2007; Sant'Anna-Santos *et al.* 2007; Sant'Anna-Santos 2008; Pita-Barbosa *et al.* 2009).

Na ER, os teores de flúor das folhas lavadas após a coleta permaneceram estatisticamente iguais aos das folhas não

lavadas ($p < 0,01$), por se tratar de um ambiente não poluído (Divan Junior *et al.* 2007) e, desta forma, sem incremento do poluente como resposta a atividades antrópicas. Em geral, o conteúdo de flúor nas folhas de plantas, na maioria das espécies, em ambientes não poluídos, situa-se abaixo de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ (Weinstein 1977), em conformidade com o observado neste estudo. As folhas de todas as espécies expostas na AP acumularam flúor ($p < 0,05$) em comparação com a ER (Fig. 9). Aos nove dias de exposição na AP, as concentrações do poluente eram de aproximadamente 20,7; 14,3; 20,8; 21,8 e 25,2 vezes maiores que nas folhas das plantas da ER, em *S. dulcis*, *A. schoenoprasum*, *O. basilicum*, *B. oleraceae* var. *acephala* e *P. crispum*, respectivamente. Em experimentos de biomonitoramento realizados na mesma área com outras espécies também foi observado o acúmulo de grandes quantidades de flúor (Divan Junior *et al.* 2007; 2008; Sant'Anna-Santos 2008). Acréscimos elevados do poluente nas folhas, em curtos períodos de exposição, sugerem que as plantas ficaram expostas a elevados índices de flúor na atmosfera (Fornasiero 2003).

Das hortaliças avaliadas, *A. schoenoprasum* e *P. crispum* apresentaram, respectivamente, a menor e a maior quantidade de flúor (Fig. 9). As folhas subuladas e com posição mais ereta de *A. schoenoprasum* provavelmente desfavoreceram a retenção do poluente; já as folhas laminares, recortadas e paralelas ao solo de *P. crispum* contribuíram para a maior retenção do flúor. Na literatura, o ritmo de crescimento de cada genótipo (Vike 1999, Silva *et al.* 2000) e características como densidade da folhagem, tamanho das folhas (Weinstein & Davison 2004) e capacidade de interceptação da superfície foliar, definida pela morfologia e configuração das folhas, têm sido relacionadas com a capacidade de retenção de poluentes (Mezghani *et al.* 2005).

Na AP, a lavagem removeu quantidades significativas ($p < 0,01$) do poluente das folhas de todas as hortaliças avaliadas (Fig. 9). Em *A. schoenoprasum*, somente 34,1% do flúor foi removido, indicando que a maior parte do poluente se encontrava internamente. Segundo Franzaring *et al.* (2007), isso se dá em decorrência de uma maior entrada de flúor gasoso via estômatos. Já nas hortaliças com folhas laminares, a quantidade removida de flúor pela lavagem das folhas foi de 69,5; 57,9 e 73,9% em *O. basilicum*, *B. oleraceae* var. *acephala* e *P. crispum*, respectivamente, indicando que a maior parte do poluente se encontrava externamente, já que além de penetrar na folha, o flúor pode ficar adsorvido à superfície (Jacobson *et al.* 1966). O flúor acumulado externamente às folhas depende não só da deposição de partículas que contenham esse elemento como da adsorção de fluoretos gasosos (HF, SiF_4 , CFCs) à superfície foliar (Franzaring *et al.* 2007).

Os danos mais severos observados na epiderme de *P. crispum* e *B. oleraceae* var. *acephala* refletem, provavelmente, a maior quantidade de poluente aderido à superfície foliar. Em algumas espécies vegetais existe uma relação entre o maior grau de injúria e as taxas elevadas de acúmulo do poluente

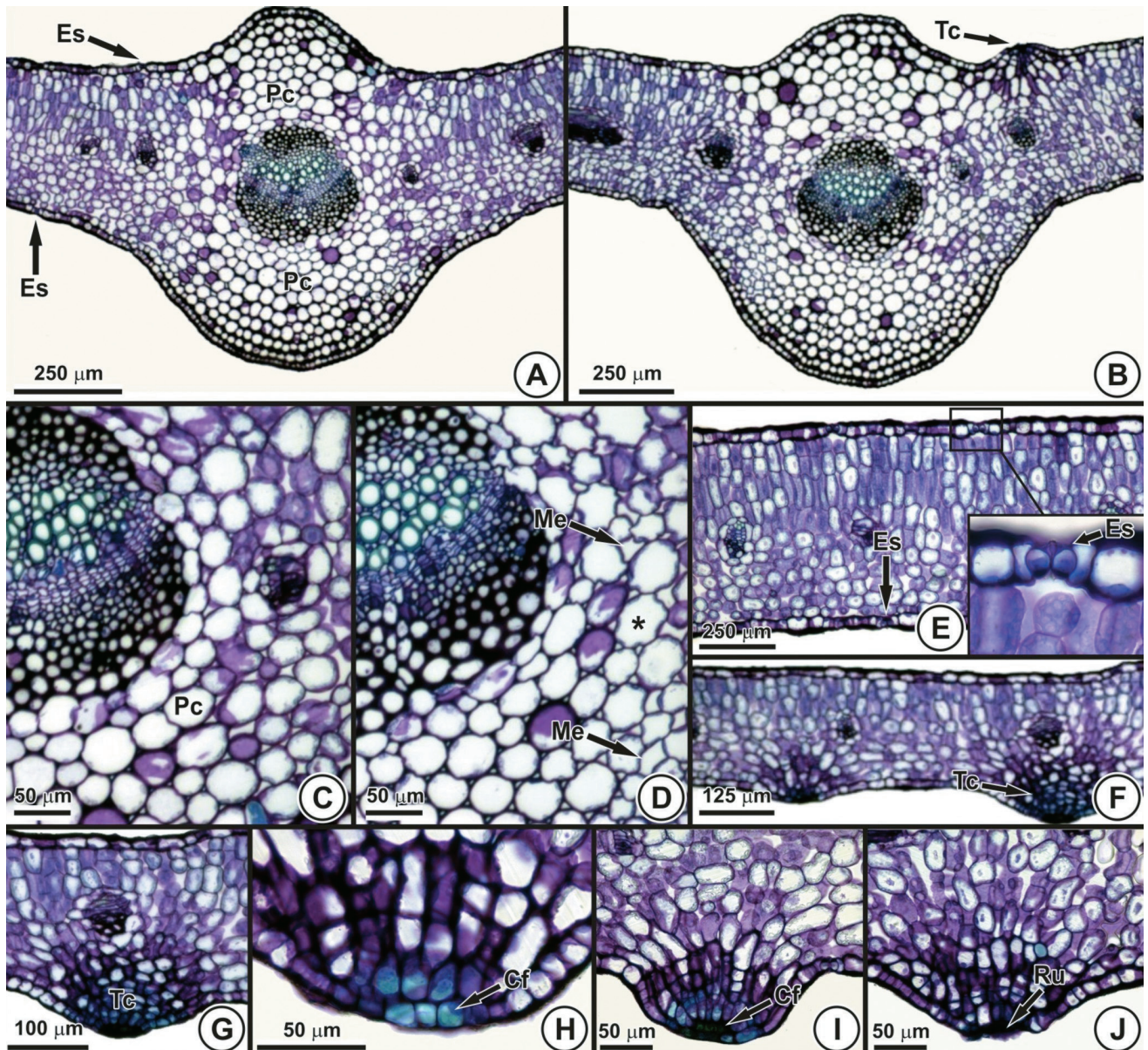


Figura 6. Anatomia foliar de *Brassica oleracea* var. *acephala* DC. (seções transversais). A, C, E. Estação referência. B, D, F-J. Área Poluída. Parênquima cortical (Pc), estômatos (Es), formato celular alterado (*), meatos (Me), tecido de cicatrização (Tc), compostos fenólicos (Cf) e ruptura (Ru).

(Klumpff *et al.* 1995; Silva *et al.* 2000; Fornasiero 2001). No entanto, não houve redução na espessura da epiderme. A grande quantidade de cutina ou de ceras epicuticulares nas células da epiderme, como observado em *A. schoenoprasum*, pode funcionar como uma barreira à penetração do flúor no protoplasto das células epidérmicas (Kannan 1986). Os danos mais severos ocorreram associados aos estômatos, ponto de entrada do poluente na forma gasosa. A redução na espessura do mesofilo pode refletir em alterações do relevo da folha observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Sant'Anna-Santos & Azevedo 2007), indicando que a microscopia de luz deve ser utilizada, em conjunto com outras técnicas, para melhor caracterizar a fitotoxicidade do flúor.

Não foi observada grande variação no teor de flúor, após lavagem das folhas, dentre as espécies estudadas. No

entanto, visualmente, *P. crispum* foi a única das hortaliças a apresentar sintomas de fitotoxicidez, demonstrando uma maior sensibilidade em comparação com as outras espécies estudadas. Sintomas em resposta ao flúor só ocorrem quando este elemento atinge níveis letais na região afetada (Coulter *et al.* 1985; Oliva & Figueiredo 2005). Contudo, experimentos de laboratório, onde o poluente seja o único fator a ser considerado serão fundamentais para confirmar a hipótese de que os danos observados em *P. crispum* ocorreram em resposta ao poluente e não a outro agente abiótico ou biótico. Adicionalmente, nas amostras aparentemente sadias coletadas para os estudos microscópicos, os danos micromorfológicos e estruturais também foram acentuados em *P. crispum*. Desta forma, dentre as hortaliças avaliadas, *P. crispum* é a mais sensível a poluição em Ouro Preto, considerando-se

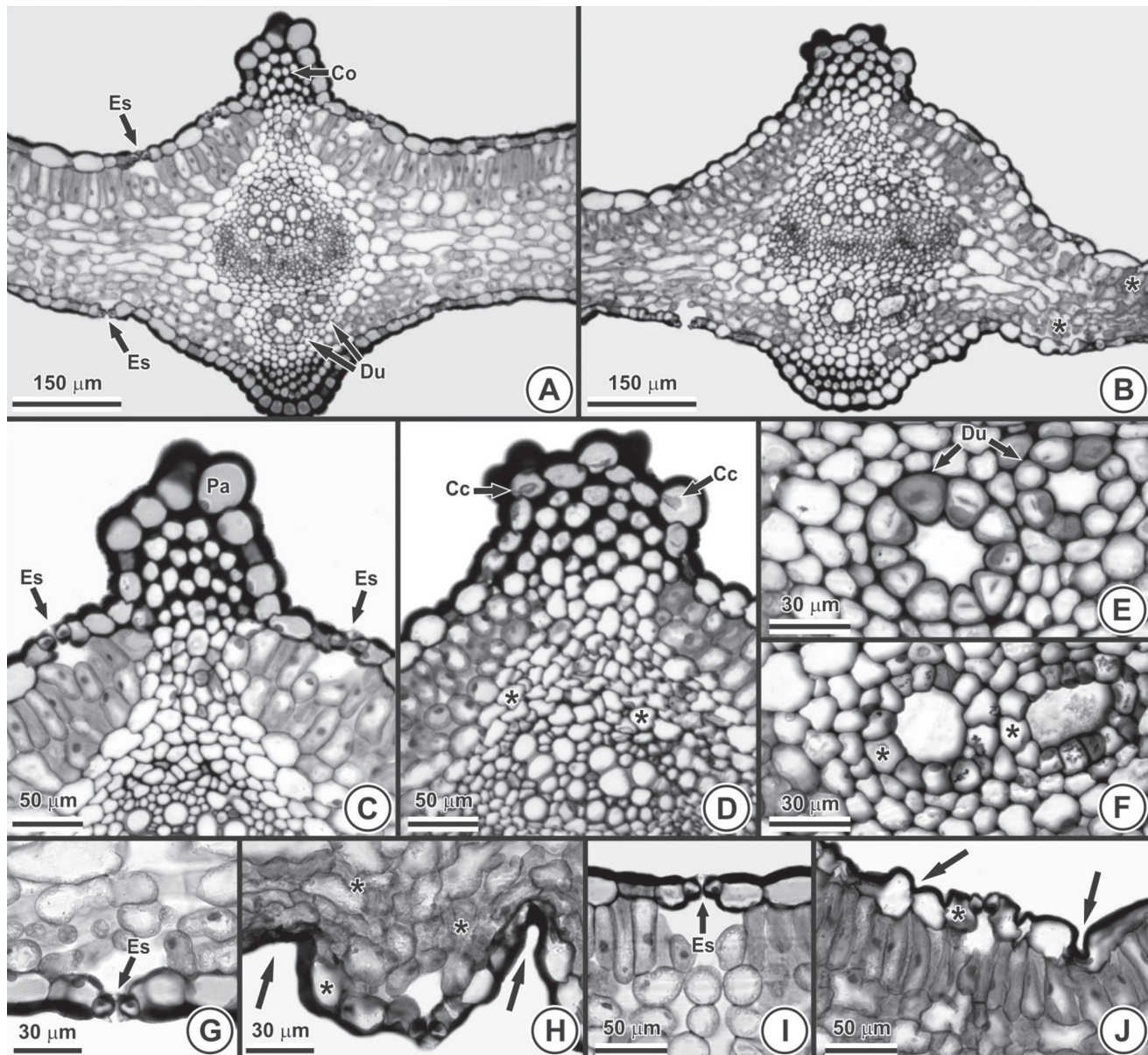


Figura 7. Anatomia foliar de *Petroselinum crispum* (Mill.) Mansf. (seções transversais). A, C, E, G, I. Estação referência. B, D, F, H, J. Área poluída. Estômato (Es), colênquima (Co), ducto (Du), papila (Pa), formato alterado (*), condensação do conteúdo celular (Cc) e depressão na epiderme (→).

os danos macro e microscópicos. As alterações anatômicas têm sido utilizadas como subsídio para comparação da susceptibilidade entre espécies em resposta a poluição (Chaves *et al.* 2002; Silva *et al.* 2005; 2006; Sant'Anna-Santos *et al.* 2006a; Sant'Anna-Santos & Azevedo 2007; Pita-Barbosa *et al.* 2009), mas a associação dos dados microscópicos com a sintomatologia é fundamental para a avaliação acurada dos danos (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007).

Diante dos resultados, recomenda-se, que as hortaliças estudadas sejam cultivadas o mais distante possível de fontes emissoras de flúor por apresentarem, mesmo após a lavagem das folhas em água, concentrações superiores a $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de flúor, valor recomendado pelas autoridades sanitárias como apropriado para o consumo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapemig pela concessão de bolsa de Pós-Doutorado Júnior ao primeiro autor, ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pelo suporte à parte de microscopia eletrônica do trabalho e a Venceslau Santos, Dayana T. Francino, Leonardo D. Figueiredo, Taline M. Praça, Advânio I. Silva e Diego I. Rocha, pelo auxílio com a coleta e parte dos procedimentos laboratoriais.

Referências bibliográficas

- Aguiar, T.V.; Sant'Anna-Santos, B.F.; Azevedo, A.A. & Ferreira, R.S. 2007. ANATI QUANTI: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. *Planta daninha* 25: 649-659.
- Arndt, U.; Flores, F. & Weinstein, L. 1995. *Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Azevedo, A.A. 1995. *Ação do flúor, em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de Glycine max (L.) Merrill*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

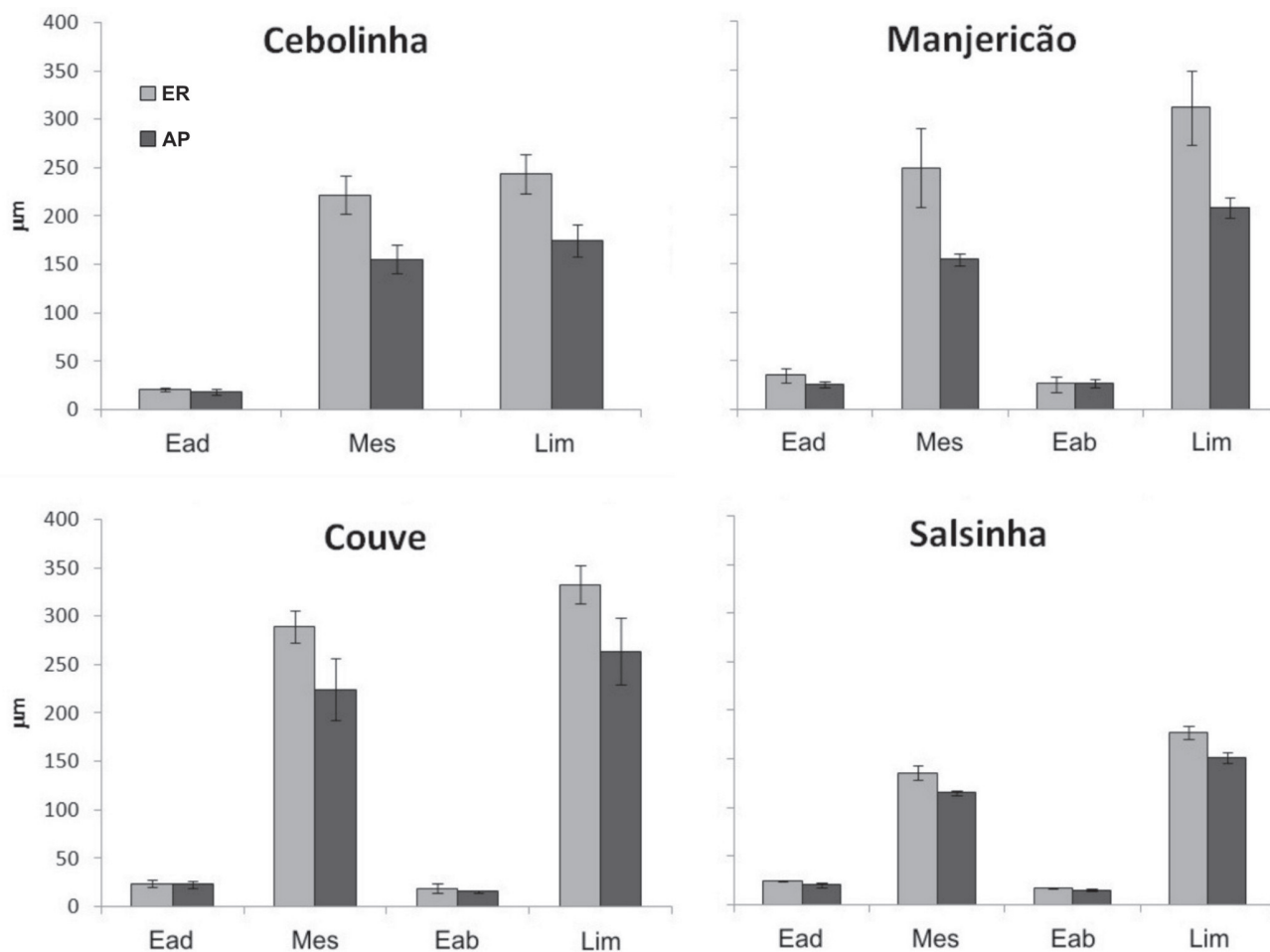


Figura 8. Espessura do limbo e altura dos tecidos das quatro espécies de hortaliças dispostas na estação referência (ER) e na área poluída (AP). Epiderme da face adaxial (Ead), mesófilo (Mes), epiderme da face abaxial (Eab), limbo (Lim). As barras verticais indicam o desvio padrão.

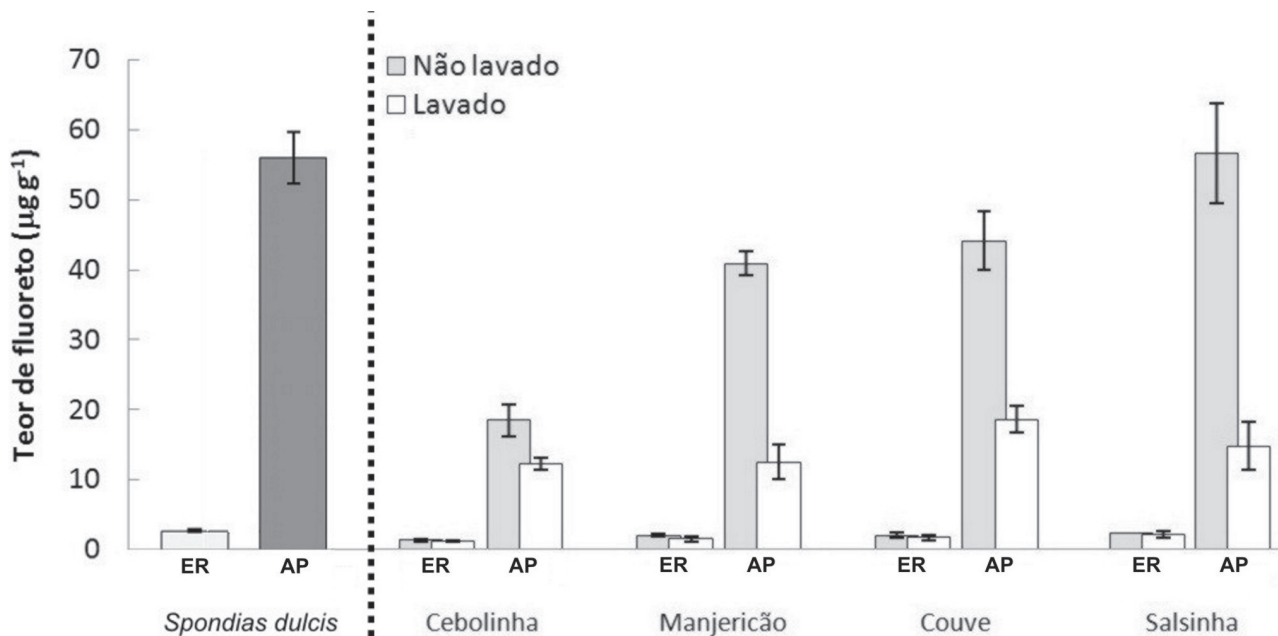


Figura 9. Teor de fluoreto em folhas de *Spondias dulcis* Forst. F., em comparação com as folhas lavadas e não-lavadas das hortaliças aos nove dias de exposição na área poluída (AP) e na estação referência (ER). As barras verticais indicam o desvio padrão.

- Briggs, C.L.; Morris, E.C. & Ashford, A.E. 2005. Investigations into seed dormancy in *Grevillea linearifolia*, *G. buxifolia* and *G. Sericea*: Anatomy and histochemistry of the seed coat. **Annals of Botany** **96**: 965-980.
- 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 Brasileira** **16**: 395-406.
- Coulter, C.T.; Pack, M.R. & Sulzbach, C.W. 1985. An evaluation of the dose-response relationship of fluoride injury to *Gladiolus*. **Atmospheric Environment** **19**: 1001-1007.
- Dickison, W.C. 2000. **Integrative plant anatomy**. Massachusetts, Harcourt/Academic Press.
- 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 an aluminium smelter in Ouro Preto, Brazil, as expressed by foliar fluoride accumulation in eight plant species. **Ecological Indicators** **8**: 454-461.
- EU, 2001. **European Union Risk Assessment Report: Hydrogen Fluoride**, CAS-No.: 7664-39-3. 1st Priority List, vol. 8.
- 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.
- Fortes, C.; Duarte, A.P.; Matsuoka, S.; Hoffmann, H.P. & Lavorenti, N.A. 2003. Toxicidade de flúor em cultivares de milho em área próxima a uma indústria de cerâmica, Araras (SP). **Bragantia** **62**: 275-281.
- Franzaring, J.; Klumpp, A. & Fangmeier, A. 2007. Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardised grass cultures. **Atmospheric Environment** **41**: 4828-4840.
- García-Ciudad, A.; García-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.
- Günthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P. 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. **Environmental Pollution** **147**: 467-488.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil**. (California Agricultural Experiment Station: Berkeley, CA).
- Jacobson, J.S.; Weinsten, L.H.; McCune, D.C. & Hitchcock, A.E. 1966. The accumulation of fluorine by plants. **Journal of Air Pollution Control Association** **16**: 412-417.
- Jones, S.; Burt, B.A.; Petersen, P.E. & Lennon, M.A. 2005. The effective use of fluorides in public health. **Bulletin of the World Health Organization** **83**: 670-676.
- Kannan, S. 1986. Physiology of foliar uptake of inorganic nutrients. **Proceeding of the Indian Academy Science** **96**: 457-70.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** **27**: 37-138.
- Klumpp, G.; Klumpp, A.; Domingos, M. & Guderian, R. 1995. *Hemerocallis* as bioindicator of fluoride pollution in tropical countries. **Environmental Monitoring and Assessment** **35**: 27-42.
- Köppen, W. 1948. **Climatología: com un estudio de los climas de la tierra**. Pp.152-182. In: Hendrichs Pérez, P.R. (Ed.). México, D.F, Fondo de Cultura Económica.
- Larsen, S. & Widdowson, A.E. 1971. Soil fluorine. **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.
- Mezghani, I.; Elloumi, N.; Abdallah, F.B.; Chaieb, M. & Boukhris, M. 2005. Fluoride accumulation by vegetation in the vicinity of a phosphate fertilizer plant in Tunisia. **Fluoride** **38**: 69-75.
- MOE, 2005. **Ontario Air Standards For Hydrogen Fluoride**. Ontario, Standards Development Branch Ontario, Ministry of the Environment.
- Mohamed, A.H. & Chandler, M.E. 1977. **Cytological effects of sodium fluoride**. The National Cancer Program Part 2, Fluoridation of Public Drinking Water, U.S. Washington, Governmental Printing Office.
- O'Brien, P.P. & McCully, M.E. 1981. **The study of plants structure principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltda.
- Oliva, M.A. & Figueiredo, J.G. 2005. Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica** **28**: 389-397.
- 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.
- Pita-Barbosa, A.; Sant'Anna-Santos, B.F.; Silva, K.L.F.; Azevedo, A.A. & Rocha, D.I. 2009. Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). **Acta Botanica Brasileira** **23**: 1027-1033.
- 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.
- 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 fitotoxicidade do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências** **5**: 48-50.
- Sant'Anna-Santos, B.F.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Araújo, 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.
- 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.
- 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.
- Silva, L.C., Oliva, M.A., Azevedo, A.A., Araújo, J. M., Aguiar, R.M. 2005. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. **Water, air and soil pollution** **168**: 129-143.
- 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**: 383-391.
- Treshow, M. & Anderson, F. 1991. **Plant stress from air pollution**. Chichester, John Wiley and Sons.
- Tuffi Santos, L.D.; Meira, R.M.S.A.; Ferreira, F.A.; Sant'Anna-Santos, B.F. & Ferreira, L.R. 2007. Morphological responses of different eucalypt clones submitted to glyphosate drift. **Environmental and Experimental Botany** **59**: 11-20.
- 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.
- Tuffi Santos, L.D.; Sant'Anna-Santos, B.F.; Meira, R.M.S.A.; Ferreira, F.A.; Tiburcio, R.A.S. & Silva, E.F.S. 2009. Micromorfologia foliar na análise da fitotoxicidade por glyphosate em *Eucalyptus grandis*. **Planta Daninha** **27**: 711-720.
- VDI, 1989. **VDI 2310 Part 3: Maximum immission values to protect vegetation**. Maximum immission values for Hydrogen Fluoride. VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 1.
- Vike, E. 1999. Air-pollutant dispersal patterns and vegetation damage in the vicinity of three aluminium smelters in Norway. **Science of the Total Environment** **236**: 75-90.

- Weinstein, L.H. 1977. Fluoride and plant life. **Journal of Occupational Medicine** **19**: 49-78.
- Weinstein, L.H. & Davison, A.W. 2003. Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. **Environmental Pollution** **125**: 3-11.
- Weinstein, L.H. & Davison, A.W. 2004. Fluorides in the environment. Oxford: CABI Publishing, 287 p.
- Weinstein, L.H. 1977. Fluoride and plant life. **Journal of Occupational Medicine** **19**: 49-78.
- World Health Organization (WHO). 2002. **Environmental Health Criteria 227. Fluoride**. Geneva, World Health Organization.
- Zhou, X.; Wu, W.; Zeng, Y.; Liao, Y.; Wang, L.; Wuhan, G.L. & China, P.R. 2006. Industrial fluoride pollution of vegetables in Hubei province, China. **Fluoride** **39**: 31-34.