

BIO-146

126



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

Departamento de Ciências Biológicas



Trabalho de Licenciatura

**EFEITO DO FLÚOR NO CRESCIMENTO DE *Lolium multiflorum***



Autor: Bruno Alberto Nhancale

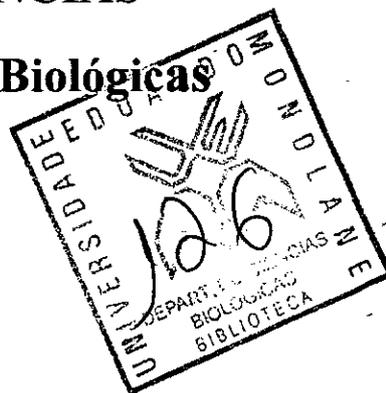
Maputo, Setembro de 2004



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**Departamento de Ciências Biológicas**



**Trabalho de Licenciatura**

**EFEITO DO FLÚOR NO CRESCIMENTO DE *Lolium multiflorum***

Autor: Bruno Alberto Nhancale

Supervisor: Prof. Doutor Orlando A. Quilambo

Maputo, Setembro de 2004

## AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar ao Senhor Jesus Cristo pelo graça que me concedeu até o dia de hoje, não há palavras para expressar a minha gratidão.
- Aos meus pais Alberto Nhancale e Carolina Mboca e irmãos Cidália, Euclides e Arsénia, pelo amor, carinho, encorajamento e incansável apoio ao longo da minha carreira estudantil.
- Ao meu supervisor Prof. Doutor Orlando Quilambo, pela amizade, compreensão, paciência inestimável e transmissão dos seus conhecimentos científicos.
- Aos Doutores Andreas Kllump, Maria Pignata, Marisa Domingos, Cláudia González, H. Blum e a *WHO Collaborating Centre for Air Quality Management and Air Pollution Control*, pelos artigos e métodos enviados.
- Ao Instituto Norddeutsche Pflanzenzucht pela oferta das sementes.
- Ao Projecto DEIBI (Programa de Investigação na Área de Biologia) pelo apoio financeiro e material prestado.
- Ao sr. Sitóe e sra. Helena pela ajuda no trabalho laboratorial.
- Aos colegas pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos ao longo do curso.
- A todos que directa ou indirectamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

**DEDICATÓRIA**

A

Alberto Nhancale e Carolina Mboça

Cidália, Nino e Seninha

## DECLARAÇÃO

Declaro, por minha honra, que este Trabalho de Licenciatura nunca foi apresentado, na sua essência ou parte dela, para obtenção de qualquer grau, e que constitui o resultado da minha investigação pessoal, estando indicados na bibliografia as fontes que utilizei.

*Bruno Alberto Nhamcale*

---

(Bruno Alberto Nhamcale)

## RESUMO

O presente estudo examinou as respostas bioquímicas e fisiológicas de *Lolium multiflorum* quando cultivada em solo contaminado com diferentes concentrações de fluoreto de sódio (controle, 4,0 g/l, 8,0 g/l e 12,0 g/l). Foi estudado o efeito do flúor em relação ao desenvolvimento da planta e à quantidade de água utilizada para irrigação. Os parâmetros medidos foram: proteína total, clorofila a, clorofila b, feofitina a, feofitina b, caratenoides e pesos secos e frescos das partes da planta (folha, colmo e raiz) nos dias 18, 27 e 36, depois da sementeira. Os resultados da experiência mostraram que existe uma correlação negativa entre a emergência das plantas e a concentração do flúor. Por outro lado, dependendo do tipo de rega e do tempo de crescimento, o flúor reduziu a quantidade de proteína total, a taxa de assimilação aparente, a razão do peso da raiz, o conteúdo de água foliar e peso específico da folha, mas aumentou a área específica da folha e a razão da área foliar, apesar das características químicas do solo não conferirem boa solubilidade ao flúor.

1. Introdução.....	1
1.1 Objectivos.....	3
Geral.....	3
Específicos.....	3
1.2 Hipóteses.....	3
2. Material e Métodos.....	4
2.1 Material e Equipamento Experimental.....	4
2.2 Solo.....	5
2.3 Material Vegetal.....	5
2.4 Desenho Experimental.....	6
2.5 Parâmetros de Crescimento.....	7
2.5.1 Medições.....	7
2.5.2 Análise de Crescimento.....	8
2.6 Parâmetros Bioquímicos.....	10
3. Análise Estatística dos Dados.....	14
4. Resultados.....	15
4.1 Química do Solo.....	15
4.2 Efeito do Flúor na Emergência das Plantas.....	16
4.3 Efeito do Flúor nos Parâmetros Bioquímicos.....	18
4.3.1 Pigmentos Fotossintéticos.....	18
4.3.3 Proteína Total.....	22
4.4 Efeito do Flúor nos Parâmetros de Crescimento.....	23
4.4.1 Taxa de Crescimento Relativo.....	24
4.4.2 Taxa de Crescimento Absoluto.....	26
4.4.3 Taxa de Assimilação Aparente.....	27
4.4.4 Razão do Peso do Colmo.....	29
4.4.5 Razão do Peso da Raiz.....	31
4.4.7 Área Específica da Folha.....	32
4.4.8 Razão da Área Foliar.....	34
4.4.9 Conteúdo de Água Foliar.....	36
4.4.10 Peso Específico da Folha.....	38

5. Discussão .....	39
5.1 Química do Solo .....	39
5.2 Efeito do Flúor na Emergência das Plantas .....	39
5.3 Efeito do Flúor nos Parâmetros Bioquímicos.....	40
5.3.1 Pigmentos Fotossintéticos .....	40
5.3.3 Proteína Total .....	41
5.4 Efeito do Flúor nos Parâmetros de Crescimento .....	42
5.4.1 Taxa de Crescimento Relativo.....	42
5.4.2 Taxa de Crescimento Absoluto.....	43
5.4.3 Taxa de Assimilação Aparente .....	43
5.4.4 Razão do Peso do Colmo.....	43
5.4.5 Razão do Peso da Raiz.....	44
5.4.6 Área Específica da Folha.....	44
5.4.8 Razão da Área Foliar .....	45
5.4.9 Conteúdo de Água Foliar.....	46
5.4.10 Peso Específico da Folha.....	46
6. Conclusões.....	47
7. Recomendações .....	48
8. Bibliografia.....	49
Anexo I .....	56

## 1. INTRODUÇÃO

Com o agravamento dos problemas ambientais resultantes da poluição nas zonas industriais, tornou-se necessário o monitoramento das áreas afectadas, usando métodos físicos-químicos ou biológicos. Contudo, as medições físico-químicas são incapazes de interpretar as relações ecológicas envolvidas nestes processos, por isso se tem usado organismos para completar os programas de avaliação de poluição ambiental (Figueiredo, 1994). A espécie *Lolium multiflorum*, por exemplo, tem sido usada em numerosos estudos para avaliar o efeito do flúor no ambiente: Domingos *et al.*, (1998), Figueiredo (1994), Haidouti *et al.* (1993), Horner e Bell (1995), Klumpp *et al.* (1996), Loganathan *et al.* (2001), Sandrin *et al.* (2002), Zimmermann *et al.* (2000).

Esta espécie pertence à família Poaceae e caracteriza-se morfológicamente por ser uma planta folhosa (Silva *et al.*, 2000), anual ou bienal, colmos de 30-80 (100) cm de altura, a envoltura da folha é proeminentemente estriada, dorsalmente arredondada, macia e raramente áspera e sem pêlos. A língula tem 1-2 mm de comprimento, membranosa e a lâmina da folha 6-25 x 0,4-1 cm. Encontra-se distribuída na África, no sul e centro da Europa e em regiões temperadas da Ásia (Fernandes *et al.*, 1971). Em Moçambique já foi cultivada na Estação de Agrária de Umbelúzi, no distrito de Boane (Moura, 1957), seu nome vernacular é azavém (Pombo, 1995). Possui um valor económico elevado devido ao uso como forragem dos animais (Klump *et al.*, 1996).

A contaminação do solo pelo flúor tem como fontes principais as fábricas de fundição de alumínio e as fábricas de fertilizantes fosfatados, embora as de cerâmica, de tijolo, de vidro e as de aço e carvão mineral possam igualmente contribuir significativamente (Feng *et al.*, 2003, Haidouti *et al.*, 1993, Horner e Bell, 1995). Quando o flúor penetra no solo quer por precipitação, deposição de partículas ou por resíduos contaminados (Arnesen, 1997) pode ser absorvido pelas plantas (Davison, 1983) através da difusão passiva (Rai *et al.*, 2000). O flúor pode afectar a planta de diversas formas, especialmente as suas folhas, dependendo da característica da espécie, estágio de desenvolvimento, idade, estado nutricional (Kovács 1992 citado por Mulgrew e Williams, 2000), dose dos poluentes recebidos (Ashmore, 1997) luz, temperatura, humidade relativa, disponibilidade de água (Weinstein, 1977 citado por Domingos *et al.*, 2003) tipo de solo (Gisiger, 1968). Concentrações elevadas de flúor nas folhas das plantas, quando ingeridas pelos animais vertebrados podem resultar em fluorose: doenças de dente e do esqueleto (Braen e Weinstein, 1985).

O flúor quando absorvido via solo causa a inibição do crescimento de *Lolium sp.* (Horner and Bell, 1995; Klump *et al.*, 1996) embora tenha sido reportado como estimulante do crescimento em muitas plantas, tornando-se tóxico, apenas, quando estiver acima do limite crítico (Singh *et al.*, 1995).

O flúor e outros poluentes, podem ainda causar inúmeras perturbações bioquímicas e fisiológicas na planta (Haidouti *et al.*, 1993) dentre as quais: redução da quantidade dos pigmentos fotossintéticos (McNulty e Newman, 1961 citado por Smith e Lytle, 1997; Pignata *et al.*, 1999). Para avaliar o efeito dos poluentes nos processos bioquímicos tem-se aplicado largamente, nos últimos anos, a determinação do conteúdo de clorofila a, clorofila b, feofitina a, feofitina b, caratenoides, clorofila b/clorofila a, feofitina a/clorofila a, proteína total e água foliar (Carreras *et al.*, 1996; Carreras *et al.*, 1998; Carreras e Pignata, 2001; Carreras e Pignata, 2002; González *et al.*, 1996; González e Pignata, 2000; Pignata *et al.*, 1999; Pignata *et al.*, 2002; Cañas *et al.*, 1997; Wannaz *et al.*, 2003).

O aparecimento e crescimento de fábricas que são fontes de emissão de flúor, poderá levar a que o flúor constitua um contaminante do solo em volta dessas fábricas.

Este estudo pretende assim contribuir para o conhecimento das reacções das plantas a diferentes concentrações de flúor e pode ajudar a seleccionar plantas que podem ser usadas como fitoremediadoras em caso de poluição do solo pelo flúor.

## 1.1 OBJECTIVOS

### Geral

- Determinar o efeito do flúor nos parâmetros bioquímicos e de crescimento de *Lolium multiflorum*

### Específicos

- Determinar o efeito do flúor na quantidade de clorofila, feofitina e caratenoides, proteína total presente nas folhas de *L. multiflorum* em diferentes condições de irrigação.
- Determinar o efeito do flúor em diferentes parâmetros de crescimento de *L. multiflorum* sob diferentes condições de irrigação.

## 1.2 HIPÓTESES

### Hipótese nula

O flúor não afecta significativamente os processos bioquímicos e fisiológicos de *L. multiflorum*.

### Hipótese alternativa

O flúor afecta significativamente os processos bioquímicos e fisiológicos de *L. multiflorum*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL E EQUIPAMENTO EXPERIMENTAL

Estufa de secagem

Espectofotómetro.

Centrifuga (ALO Centrifuga Mod. 4222).

Medidor de área foliar LI - 3100.

Etiquetas.

Balança analítica eléctrica.

Balde.

Provetas.

Tubos de Ensaio.

Pipetas automáticas.

Cartuchos de papel.

Papel de filtro.

Papel de Alumínio.

Funil.

Água destilada.

Almofariz.

Bisturi.

Placas de petri.

Régua.

Marcador.

120 vasos plásticos.

12 000 sementes de *Lolium multiflorum*.

5 g de BSA.

200 ml 0,06 N de HCl.

300 ml de Etanol.

200 ml de Acetona 96%.

500 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

50 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .  
100 g de tartrato de potássio.  
50,0 ml de 2,0 N de Folin-Fenol.  
40 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .  
200g NaOH.  
100g de NaF.  
100 ml de Ácido Tri-Cloro-Acético 20 %.  
250 ml de Tris-HCl 0,1 M.

## 2.2 SOLO

O solo para o cultivo das plantas foi colhido na Cidade da Matola, no Parque Industrial de Bebeluane, a cerca de 3 km da Fábrica de Fundição de Alumínio Mozal, evitando assim a colecta de solo possivelmente contaminado com poluentes (Herinques, 2002, comunicação pessoal), nas coordenadas 25° 75' 35,8'' Sul e 32° 25' 04,7'' Este, entre 0 a 20 cm da superfície. O solo foi peneirado numa malha de 0,5 x 0,5 cm e colocado em 60 vasos para a experiência com rega tipo 1 de Fevereiro a Março e rega tipo 2 de Abril a Maio (Anexo I). No final da experiência o solo da experiência com a rega do tipo 2 foi sujeito a análise química e textural, no laboratório de Solos da Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal, Universidade Eduardo Mondlane (tabela 2), por apenas nesta altura se ter considerado a possibilidade de alteração na estrutura e composição do solo.

## 2.3 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas 12 000 sementes de *L. multiflorum*, fornecidas pelo Instituto Norddeutsche Pflanzenzucht, Alemanha (Klumpp *et al.*, 1996). Destas, 100 sementes foram cultivadas em cada vaso (Figueiredo, 1994) de cerca 1,3 litros. Os vasos possuíam furos na base, permitindo a passagem da água, como forma de simular uma situação real em que a água percola o solo.

## 2.4 DESENHO EXPERIMENTAL

A experiência foi realizada na estufa do Departamento de Ciências Biológicas, durante os meses de Fevereiro a Maio de 2004.

Foram preparadas soluções de 4,0 g/l , 8,0 g/l e 12,0 g/l NaF (Figueiredo, 1994) e 60 vasos foram divididos em IV grupos de 15 vasos. O grupo I não teve qualquer tratamento sendo considerado controle ou tratamento 0,0 g/l de NaF. Aos restantes grupos II, III e IV foram adicionados 100 ml de 4,0 g/l, 8,0 g/l e 12,0 g/l de NaF por cada vaso, respectivamente. No dia seguinte, em cada vaso foram colocadas 100 sementes de *L. multiflorum* e regadas com água corrente (VDI, 2003). Depois da sementeira as plantas foram colhidas conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1. Período de colheita e o número de réplicas por cada tratamento

Tratamento	Período de Colheita		
	18 dias	27 dias	36 dias
0,0 g/l NaF	15	15	15
4,0 g/l NaF	15	15	15
8,0 g/l NaF	15	15	15
12,0 g/l NaF	15	15	15

O mesmo procedimento foi repetido para a experiência com rega tipo 2 de Abril a Maio (Anexo I).

## **2.5 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO**

### **2.5.1 MEDIÇÕES**

#### **2.5.1.1 Emergência das Plantas**

A emergência das plantas foi obtida através da contagem das plantas em cada vaso desde o dia 5 até ao dia 9 depois da sementeira.

#### **2.5.1.2 Peso Fresco e Seco Total da Planta, Folha, Colmo e Raíz**

Os pesos frescos foram obtidos pela pesagem das partes da planta (folha, colmo e raíz) logo após a colheita. Em seguida foram colocadas num envelope de papel e colocadas numa estufa a 80° C, por um período de 48 horas. Depois de transcorrido este tempo, pesaram-se as folhas, colmo e raíz para obter os pesos secos. O peso fresco e seco total da planta foi obtido pela soma dos respectivos pesos frescos e secos das diferentes partes da planta (folha, colmo e raíz).

#### **2.5.1.3 Área Foliar**

- A área foliar foi obtida usando o instrumento de medição da área da folha (LI - 3100 Area Meter modelo LI - COR, in Lincoln. Nebraska USA).

#### **2.5.1.4 Comprimento Máximo da Raíz**

O comprimento máximo da raíz foi obtido através da medição da raíz principal com auxílio de uma régua graduada.

## 2.5.2 ANÁLISE DE CRESCIMENTO

### 2.5.2.1 Taxa de Crescimento Relativo

A taxa de crescimento relativo (TCR) da planta foi determinada segundo Brown (1984):

$$TCR = (\ln Ps_2 - \ln Ps_1) / (t_2 - t_1)$$

Onde :  $Ps_1$  - peso seco da planta (mg) no tempo 1 (dia)

$Ps_2$  - peso seco da planta (mg) no tempo 2 (dia)

$t_1$  - tempo 1

$t_2$  - tempo 2

### 2.5.2.2 Taxa de Crescimento Absoluto

A taxa de crescimento absoluto (TCA) da planta foi determinada segundo Fitter e Hay (1981)

$$TCA = (Ps_2 - Ps_1) / (t_2 - t_1)$$

Onde :  $Ps_1$  - peso seco da planta (mg) no tempo 1 (dia)

$Ps_2$  - peso seco da planta (mg) no tempo 2 (dia)

$t_1$  - tempo 1

$t_2$  - tempo 2

### 2.5.2.3 Taxa de Assimilação Aparente

A Taxa de Assimilação Aparente (TAA) da planta foi determinada segundo Brown (1984)

$$TAA = TCR / RAF$$

Onde : TCR - taxa de crescimento relativo da planta ( $\text{mg dia}^{-1}$ ).

RAF - razão da área foliar ( $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ ).

#### **2.5.2.4 Conteúdo da Água da Folha**

O conteúdo da água da folha (CAF) foi determinado segundo Garnier e Laurent (1994)

$$CAF = Pff - Psf / Pff$$

Onde: Pff - peso fresco da folha (mg).

Psf - peso seco da folha (mg).

#### **2.5.2.5 Área Específica da Folha**

A área específica da folha (AEF) foi calculada segundo Hunt (1990)

$$AEF = AF / Psf$$

Onde : AF - Área foliar (cm<sup>2</sup>).

Psf - peso seco da folha (mg).

#### **2.5.2.6 Peso Específico da Folha**

O peso específico da folha (PEF) foi calculado segundo Gardner *et al.* (1994).

$$PEF = Psf / AF$$

Onde : Psf - peso seco da folha (mg).

AF - Área foliar (cm<sup>2</sup>).

#### **2.5.2.7 Razão da Área Foliar**

A razão da área foliar (RAF) foi determinada segundo Atwell *et al.* (1999)

$$RAF = AF / Pst$$

Onde: AF - Área Foliar (cm<sup>2</sup>)

Pst - peso seco total da planta (mg)

### **2.5.2.8 Razão do Peso do Colmo**

A razão do peso do colmo (RPC) foi calculada segundo Evans (1972):

$$RPC = Psc/Pst$$

Onde: Psc - peso seco do colmo

Pst - peso seco da planta

### **2.5.2.9 Razão do Peso da Raiz**

A razão do peso da raiz (RPR) foi determinado segundo Evans (1972):

$$RPR = Psr/Pst$$

Onde: Psr - peso seco da raiz (mg).

Pst - peso seco da planta (mg).

## **2.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

### **2.6.1 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL**

#### **A. Princípio do Método**

A determinação da quantidade de proteínas foi feita usando o método de Lowry. Este método é baseado no facto de o ião cobre (Cu) ligar-se a proteínas sob condições alcalinas, numa razão de massa específica. Desta interacção resulta uma banda de absorção que é linearmente proporcional à concentração das proteínas existentes na solução, numa razão de massa por volume. A quantificação de proteínas é feita com base na curva de calibração de albumina de soro bovino (BSA), lida num espectro de luz com comprimento de onda de 650 nm, na qual a concentração de proteínas desconhecidas é calculada a partir das concentrações conhecidas de BSA (Copeland, 1994).

## B. Reagentes

- a) Tampão de Extração Tris-HCl 0,1 M.
- b) NaOH 0,5 M.
- c) Ácido Tri-Cloro-Acético 20%.
- d) Reagente de Folin-Fenol 60%.
- e) Solução de Albumina de Soro Bovino (BSA): pesou-se 0,25 g de BSA e dissolveu-se em 1 litro de NaOH 0,5 M.
- f) Reagente A : foram dissolvidos 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em 1 litro de 0,1 N de NaOH.
- g) Reagente B : foram dissolvidos 1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 100 ml de água destilada.
- h) Reagente C: foram dissolvidos 2,0 g de tartrato de potássio em 100 ml de água destilada .

Estes reagentes podem ser guardados indefinidamente.

## C. Preparação do Extracto Vegetal

A extração de proteínas foi feita do seguinte modo:

- a) Pesou-se 100 mg de folhas de *L. multiflorum* e adicionou-se 2 ml de tampão de extração (Tris-HCl 0,1 M).
- b) Procedeu-se a homogenização no almofariz até a folhas tornarem-se em polpa.
- c) Centrifugou-se o material durante 10 minutos a uma velocidade de 8 000 rpm.
- d) Separou-se o sobrenadante e precipitou-se a proteína tratando 0,5 ml de sobrenadante com 0,5 ml de Ácido Tri-Cloro-Acético (TCA).
- e) Deixou-se repousar esta solução por uma noite e depois centrifugou-se à 2370 g durante 10 minutos.
- f) Lavou-se o precipitado formado com acetona a 96%, para separar a clorofila.
- g) A acetona foi retirada da solução por centrifugação a 2370 g.
- h) Dissolveu-se o precipitado em 1,0 ml de NaOH 0,5 M (extracto A).

#### D. Marcha Analítica

##### a) Obtenção da curva-padrão

- 1) Em 18 tubos de ensaio foram pipetados cuidadosamente, os seguintes volumes da solução de albumina de soro bovino (BSA), em triplicados: 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 ml.
- 2) Acrescentou-se o volume em cada tubo de ensaio até 0,5 ml.
- 3) Preparou-se o reagente D misturando 1,0 ml do reagente B e com 1,0 ml do reagente C, aos quais foram adicionados 100 ml de reagente A.
- 4) Adicionou-se 2,5 ml do reagente D aos tubos de ensaio e misturou-se bem.
- 5) Deixou-se incubar os tubos por 15 minutos à temperatura ambiente.
- 6) Adicionou-se 0,25 ml do reagente Folin-Fenol em cada tubo.
- 7) Esperou-se 30 minutos e procedeu-se a leitura da absorvância num espectrofotómetro a 650 nm.

##### b) No Extracto Vegetal

- 1) Levou-se 0,3 ml do extracto A e transferiu-se para um tubo de ensaio.
- 2) Em seguida, procedeu-se conforme descrito para obtenção da curva-padrão (a partir do passo 2).

A concentração de proteínas é expressa em  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

## 2.6.2 DETERMINAÇÃO DE CLOROFILAS, FEOFITINAS E CARATENOIDES

Foi usado o método de Wintermans e De Mots (1965) citado por Carreras e Pignata (2001) para a determinação dos parâmetros acima mencionados. Para o efeito foram homogeneizados 100 mg de material vegetal em 10 ml de etanol a 96% V/V. Posteriormente separou-se o sobrenadante e mediu-se a absorvância (A) a 665 e 649 nm para a quantificação da clorofila-a e clorofila-b. Para as feofitinas a e b 5 ml de sobrenadante foram incubados com 1 ml de HCl 0.06 N durante 10 minutos. Transcorrido esse tempo leu-se a absorvância (A) a 666 e 654 nm.

As concentrações das clorofilas foram calculadas pelas equações:

$$\text{Clorofila-a (mg/l)} = (13.65 \times A_{665}) - (5.7 \times A_{649})$$

$$\text{Clorofila-b (mg/l)} = (25.79 \times A_{649}) - (7.6 \times A_{665})$$

As concentrações das feofitinas foram determinadas a partir da fórmula:

$$\text{Feofitina -a (mg/l)} = (23.4 \times A_{666}) - (7.64 \times A_{654})$$

$$\text{Feofitina -b (mg/l)} = (35.2 \times A_{654}) - (16.1 \times A_{666})$$

No mesmo extracto inicial (antes de adiciona HCl) leu-se a absorvância a 470 nm para quantificar caratenoides e a sua concentração foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Carotenoides (mg/l)} = ((1000 \times A_{470}) - (2.05 \times [\text{Chl-a (mg/l)}]) - (114.8 \times [\text{Chl-b (mg/l)}])) / 245$$

As concentrações das clorofilas, feofitinas e carotenoides são expressas em  $\text{mg.g}^{-1}$  peso seco.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Usou-se o pacote informático "Statistica 6.0" para efectuar os testes estatísticos.

Os dados dos parâmetros quantificados (crescimento e bioquímicos) foram analisados através do teste One-Way ANOVA (Sokal e Rohlf, 1995), sempre que os dados mostrassem uma distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilks (Conover, 1980 citado por Cañas *et. al.* 1997) e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett (Zar, 1996). Quando um dos pressupostos não se verificava, procedia-se à transformação dos dados para torna-los normais e homogêneos com vista a proceder o teste One-Away ANOVA. Caso a transformação dos dados não resultasse recorria-se ao teste não paramétrico de análise de variância Kruskall-Wallis (Zar, 1996). Nos casos em que a hipótese nula fosse rejeitada, as diferenças significativas ao longo do tempo ou entre as concentrações eram determinadas pelo teste posterior LSD (Sokal e Rohlf, 1995).

A correlação entre a emergência das plantas e os tratamentos (concentrações de NaF) foram calculadas pelo método não paramétrico de Sepearman's rank. Foi feita a comparação entre os coeficientes de correlação da rega do tipo 1 com os da rega tipo 2 através do teste de Fisher Z (Zar, 1996).

Os resultados, para todos testes, foram considerados significantes quando  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

As análises dos parâmetros bioquímicos e de crescimento efectuados, na rega do tipo 2, só foram realizadas aos 27 e 36 dias para as plantas cultivadas nos tratamentos de 0,0 g/l e 4,0 g/l de NaF, porque os tratamentos 4,0 g/l, 8,0 g/l e 12 g/l aos 18 dias e 8,0 g/l e 12,0 g/l aos 27 e 36 dias não produziram material vegetal suficiente para as análises.

### 4.1 QUÍMICA DO SOLO

A análise química do solo foi efectuada somente na rega do tipo de 2 e forneceu os dados apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Características químicas dos solos no final da experiência da rega tipo 2.

Característica Química	Tratamentos			
	0,0 g/l de NaF	4,0 g/l de NaF	8,0 g/l de NaF	12,0 g/l de NaF
pH H <sub>2</sub> O	6,45	6,92	6,71	6,86
pH KCl	5,86	6,53	6,32	6,38
CE mS/cm	0,076	0,306	0,33	0,446
Matéria Orgânica %	0,63	0,13	0,18	0,20
N %	0,01	0,01	0,01	0,01
Argila %	7,33	7,76	8,39	8,05
Limo %	0,03	0,02	0,02	0,02
Areia %	91,64	92,22	91,59	91,93
Classe Textural	Arenosa	Arenosa	Arenosa	Arenosa

CE – Condutividade Eléctrica

A tabela 2 mostra que a adição de NaF no solo aumentou a condutividade eléctrica, pH e a percentagem de argila mas diminuiu o percentagem da matéria orgânica e do limo. Contudo o flúor parece não ter influência na percentagem de nitrogénio (N) e da areia (tabela 2).

## 4.2 EFEITO DO FLÚOR NA EMERGÊNCIA DAS PLANTAS

A emergência das plantas mostrou uma correlação significativamente negativa com o aumento da concentração de NaF (tabela 3), isto é, o aumento da concentração de NaF (de 0,0 g/l à 12 g/l de NaF) diminuiu o número de plantas emergidas (figura 1 e 2).

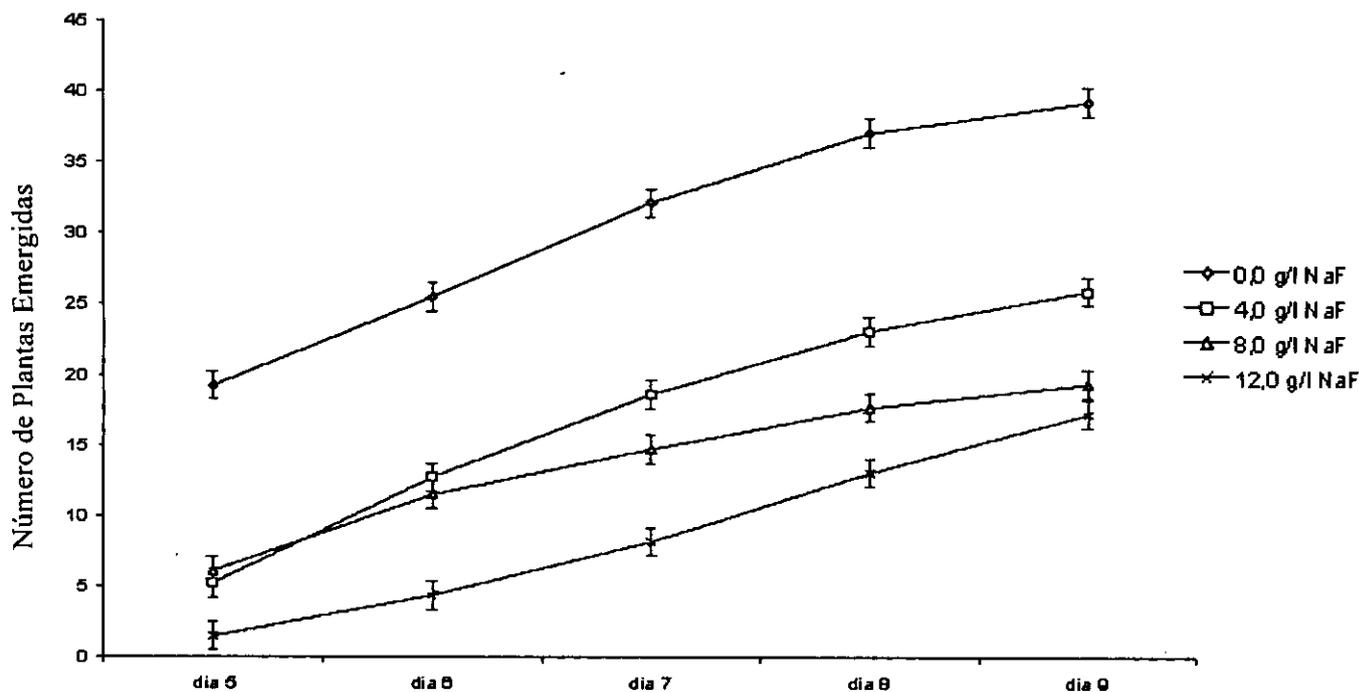


Fig. 1 Efeito do flúor na emergência das plantas ao longo tempo, sob a rega do tipo 1. Os dados referem-se a média de emergência em 15 vasos  $\pm$  desvio padrão.

Por outro lado, independentemente da presença do flúor a emergência das plantas aumenta ao longo dos dias e tende a manter-se constante por volta do dia 8 (figura 1 e 2).

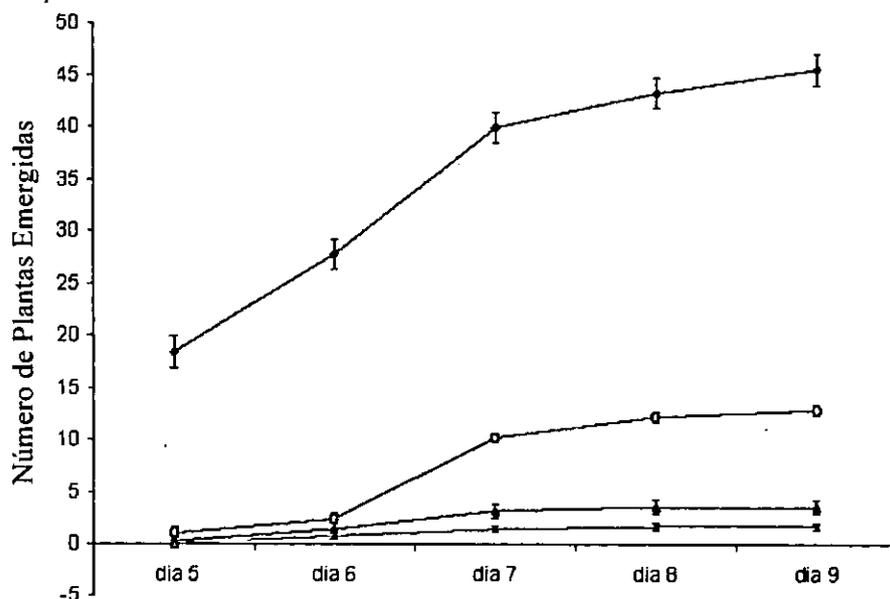


Fig. 2 Efeito do flúor na emergência das plantas ao longo tempo, sob a rega do tipo 2. Os dados referem-se a média de emergência em 15 vasos  $\pm$  desvio padrão.

A correlação entre o número de plantas e a concentração do flúor foi mais forte entre os dias 5 e 6 depois da sementeira para a rega do tipo 1 mas para rega do tipo 2 a correlação foi mais forte entre os dias 7 e 9 depois da sementeira (tabela 3).

Tabela 3. Coeficiente de correlação ( $r$ ) entre o número total de plantas emergidas e as concentrações de NaF e a comparação do  $r$  nos dois tipos de rega.

Emergência da Plantas	Rega 1	Rega 2	Rega 1 vs Rega 2
Dia 5	-0,76	-0,80	$p > 0,05$
Dia 6	-0,69	-0,75	$p > 0,05$
Dia 7	-0,60	-0,90	$p < 0,001$
Dia 8	-0,54	-0,90	$p < 0,001$
Dia 9	-0,47	-0,90	$p < 0,001$

A rega do tipo 2 mostrou maior correlação entre o número de plantas emergidas e as concentrações de NaF do que a rega do tipo 1 embora apenas nos dias 7, 8 e 9 depois da sementeira estas diferenças tenham sido estatisticamente significativas (tabela 3).

### 4.3 EFEITO DO FLÚOR NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

#### 4.3.1 Pigmentos Fotossintéticos

##### 4.3.1.1 Pigmentos Principais

Sob a rega do tipo 1, o teste de kruskal-Wallis revela que as concentrações da clorofila a e b aumentaram significativamente ao longo do tempo.

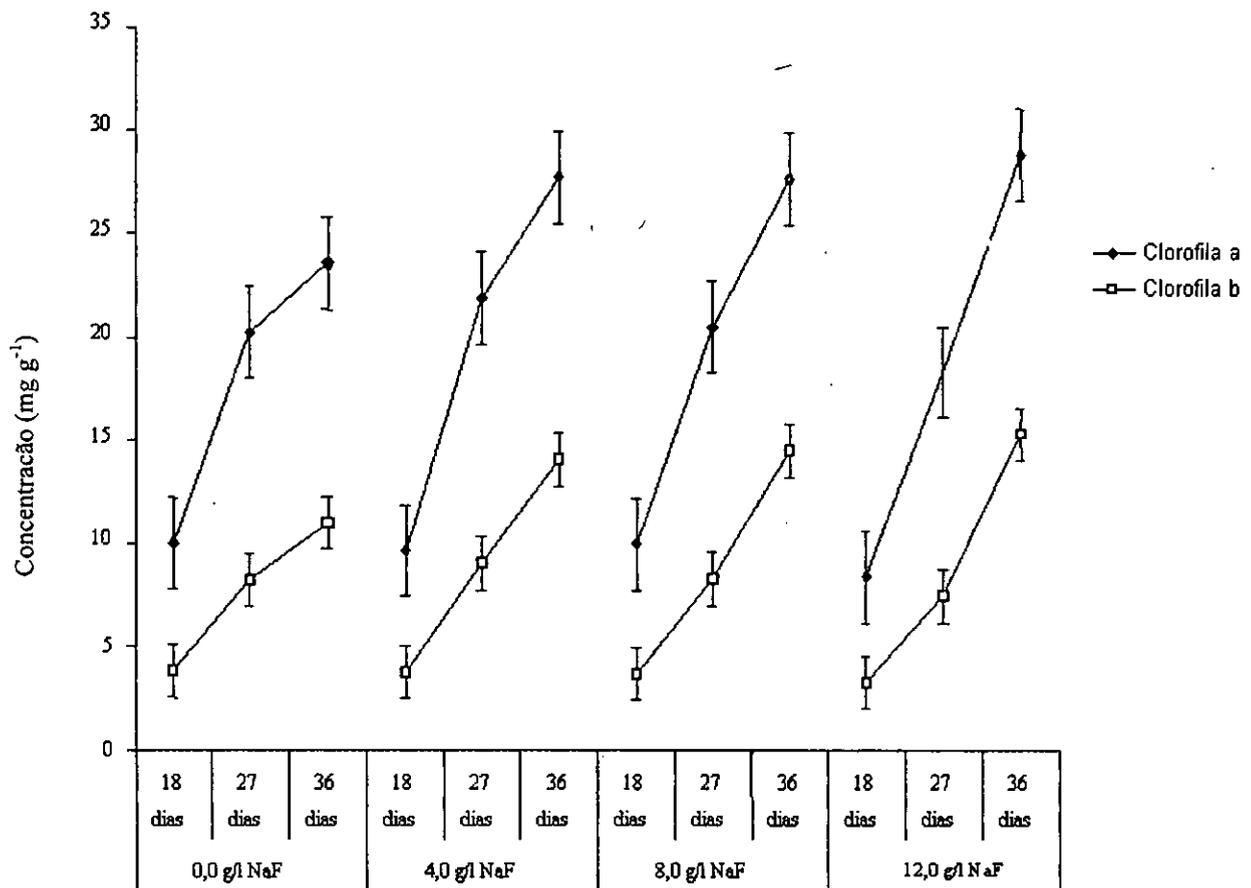


Fig. 3. Efeito do flúor na concentração da clorofila a e b em *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 1. Os dados referem-se a média de 5 réplicas  $\pm$  desvio padrão.

O flúor não afectou significativamente as concentrações da clorofila a e b embora aos 18 dias depois da sementeira os tratamentos com flúor tenham registado um valor relativamente baixo em relação ao controle (tratamento 0,0 g/l de NaF) (figura 3).

Na rega do tipo 2, a clorofila a e b mostraram uma diminuição estatisticamente significativa ao longo do tempo.

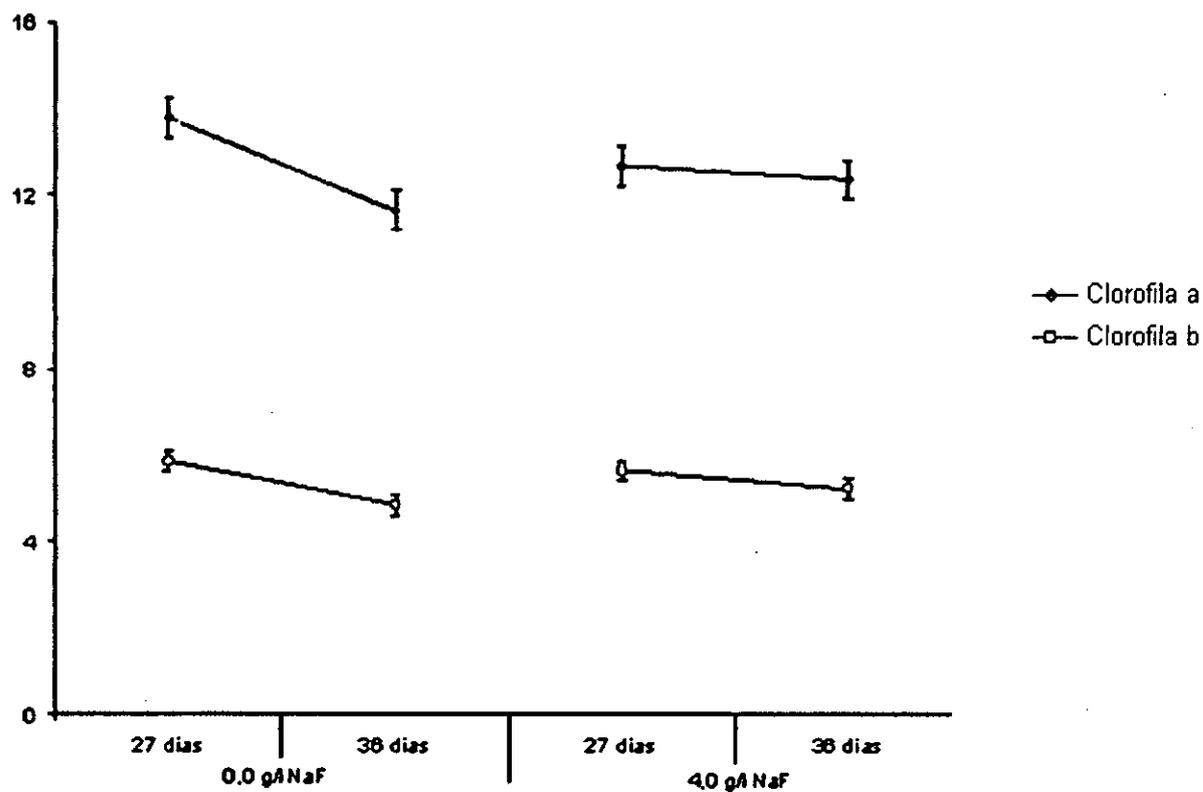


Fig. 4. Efeito do flúor na concentração da clorofila a e b em *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 2. Os dados referem-se a média de 5 réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Contudo, a concentração de NaF não afectou significativamente a concentrações da clorofila a e b apesar do gráfico (figura 4) mostrar uma ligeira diminuição dos pigmentos com aumento da concentração de NaF nos períodos de 27 e 36 dias depois da sementeira.

#### 4.3.1.1 Pigmentos Acessórios

Sob a rega do tipo 1, o teste de kruskal-Wallis revela que as concentrações de feofitina a e b aumentaram significativamente entre os períodos, a exceção dos caratenoides que se mantiveram constantes a partir do dia 27.

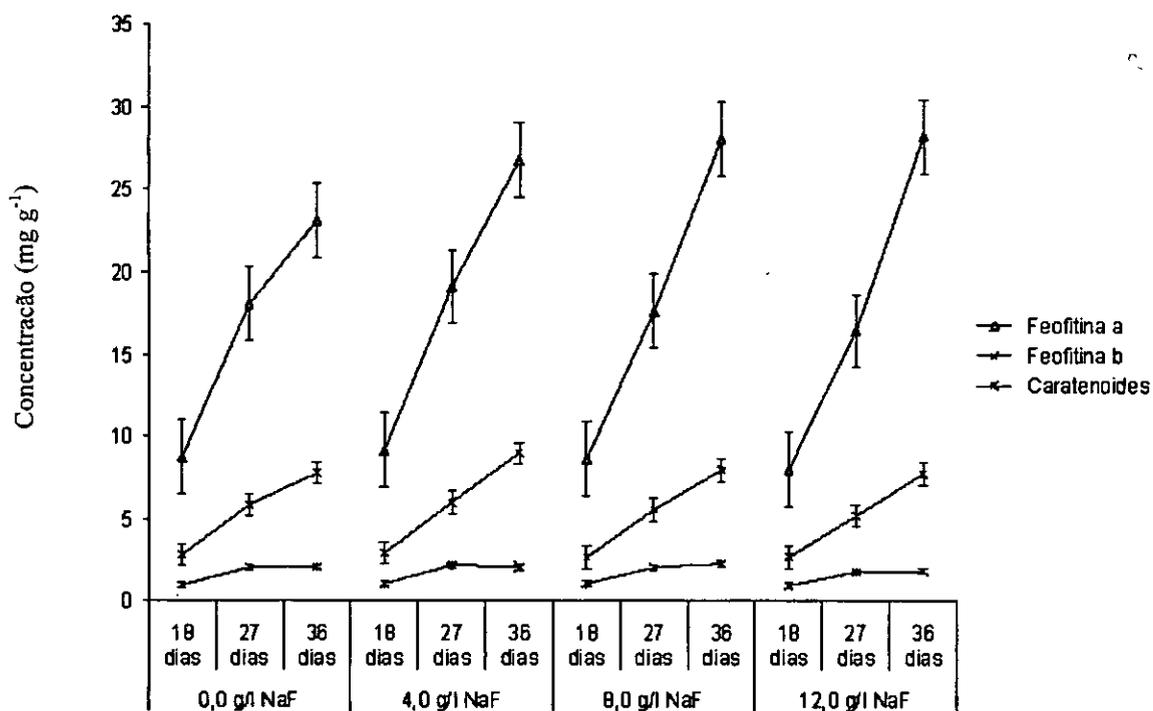


Fig. 5. Efeito do flúor na concentração da feofitina a e b e dos caratenoides em *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 1. Os dados referem-se a média de 5 réplicas  $\pm$  desvio padrão.

O flúor não afectou significativamente as concentrações da feofitina a e b e dos caratenoides embora aos 18 dias depois da sementeira os tratamentos com flúor tenham registado um valor relativamente baixo em relação ao controle (tratamento 0,0 g/l de NaF) aos 18 dias (figura 5).

Na rega do tipo 2 a feofitina a e b mostraram uma diminuição estatisticamente significativa ao longo do tempo. Os caratenoides, contudo não mostraram esta diminuição significativa, apesar da tendência de diminuição registada (figura 6).

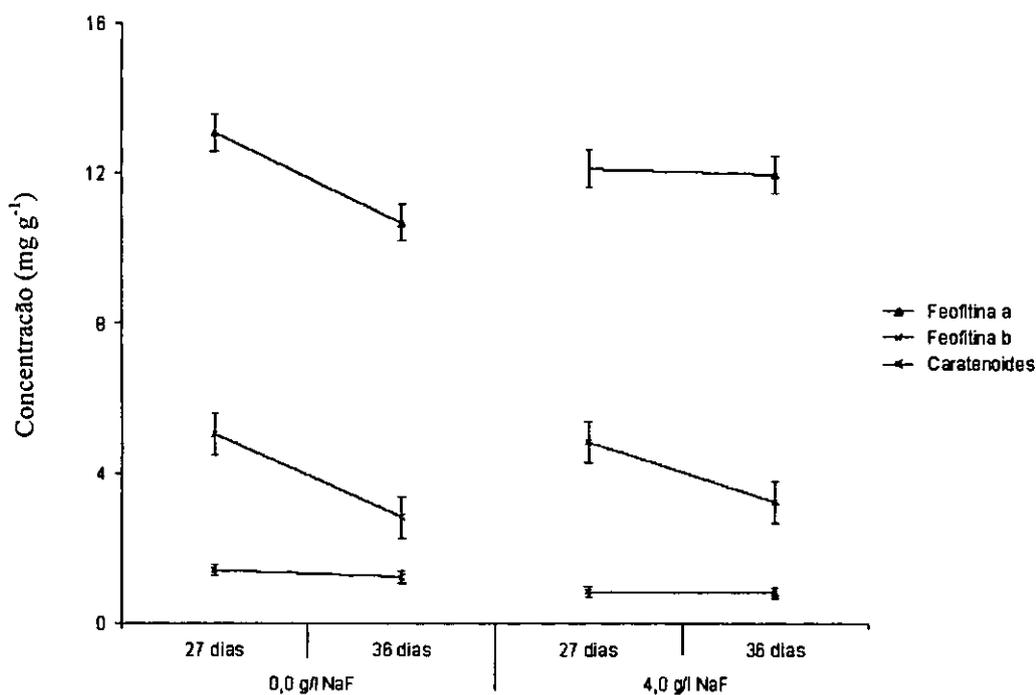


Fig. 6. Efeito do flúor na concentração da feofitina a e b e dos caratenoides em *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 2. Os dados referem-se a média de 5 réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Contudo, a concentração de NaF não afectou significativamente a feofitina a e b e os caratenoides apesar do gráfico (figura 6) mostrar uma ligeira diminuição dos pigmentos com aumento da concentração de NaF nos períodos de 27 e 36 dias depois da sementeira.

### 4.3.3 Proteína Total

Ao longo do tempo não houve diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis no conteúdo de proteína total, mas o gráfico mostra que a proteína tende a manter-se constante para as concentrações de 8,0 g/l e 12,0 g/l de NaF e aumenta ligeiramente para as concentrações de 0,0 g/l e 4,0 g/l de NaF, quando administrados a rega do tipo 1 (figura 7).

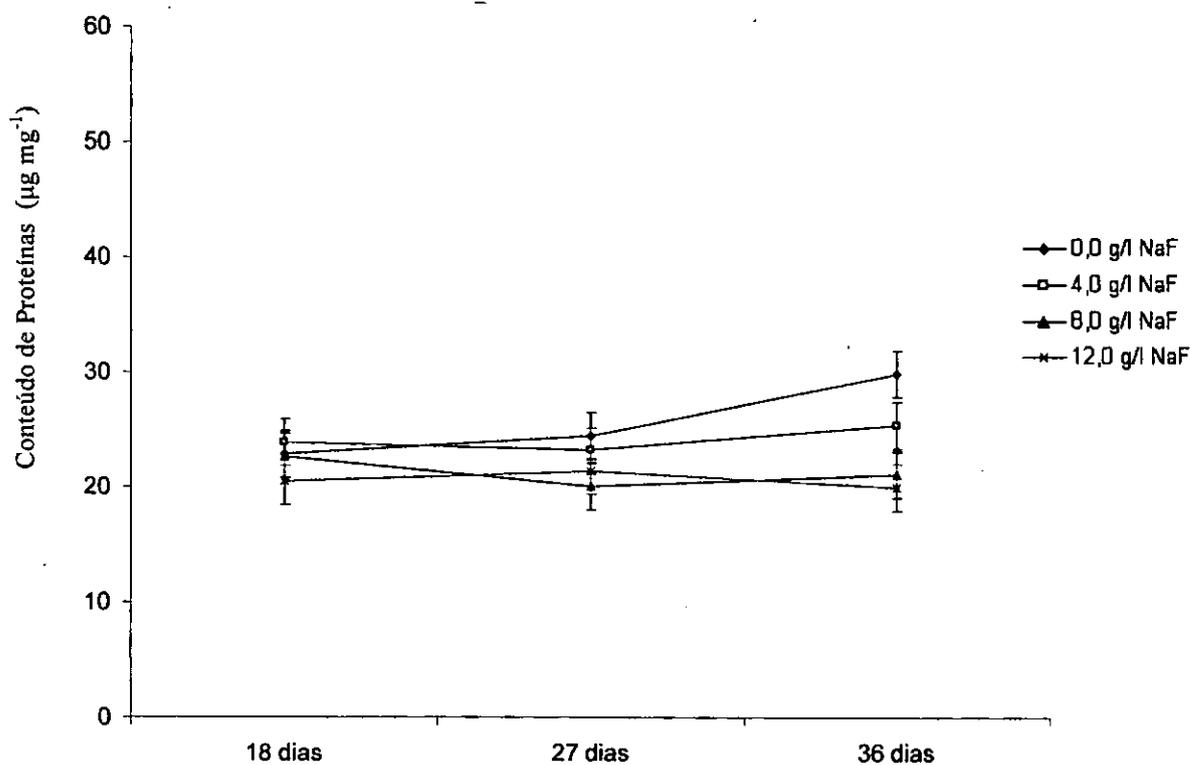


Fig. 7. Efeito do flúor no conteúdo de proteína total nas folhas de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 1. Os dados referem-se a média de 5 réplicas  $\pm$  desvio padrão.

A proteína total diminuiu significativamente com aumento da concentração de NaF aos 36 dias, mostrando maior valor no controle (0,0 g/l NaF) em relação a todas as outras concentrações de NaF (figura 7).

Sob a rega do tipo 2 a quantidade de proteína ao longo do tempo decresceu significativamente (figura 8).

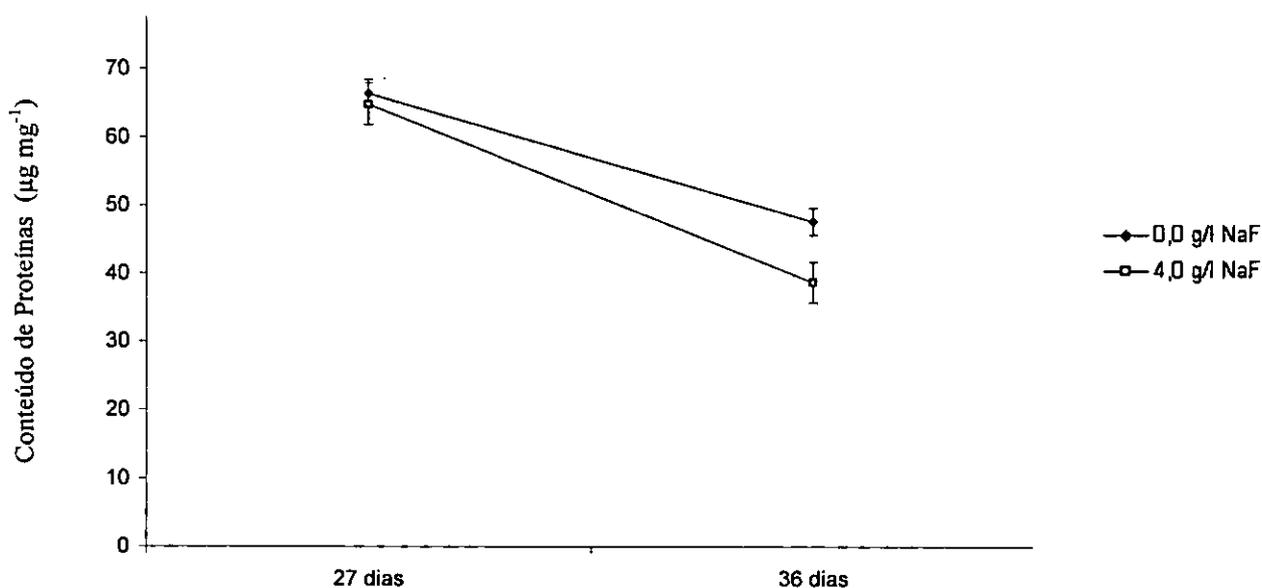


Fig. 8. Efeito do flúor no conteúdo de proteína total nas folhas de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 2. Os dados referem-se a média de 5 réplicas  $\pm$  desvio padrão.

O flúor reduziu significativamente o conteúdo da proteína total somente no dia 36 após a sementeira embora o gráfico mostre um menor valor para o tratamento 4,0 g/l de NaF em relação ao tratamento 0,0 g/l de NaF no dia 27 depois da sementeira (figura 8).

#### 4.4.1 Taxa de Crescimento Relativo

As figuras 9 e 10 mostram o comportamento da taxa de crescimento relativo das plantas ao longo do tempo quando cultivadas em diferentes concentrações de NaF para a rega 1 e rega 2 respectivamente. Na rega 1 não ocorreram diferenças significativas ao longo do tempo e entre os tratamentos, embora a taxa de crescimento relativo tenda a aumentar do dia 18 ao dia 36 depois da sementeira sendo mais acentuado entre os dias 18 e 27 depois da sementeira (figura 9).

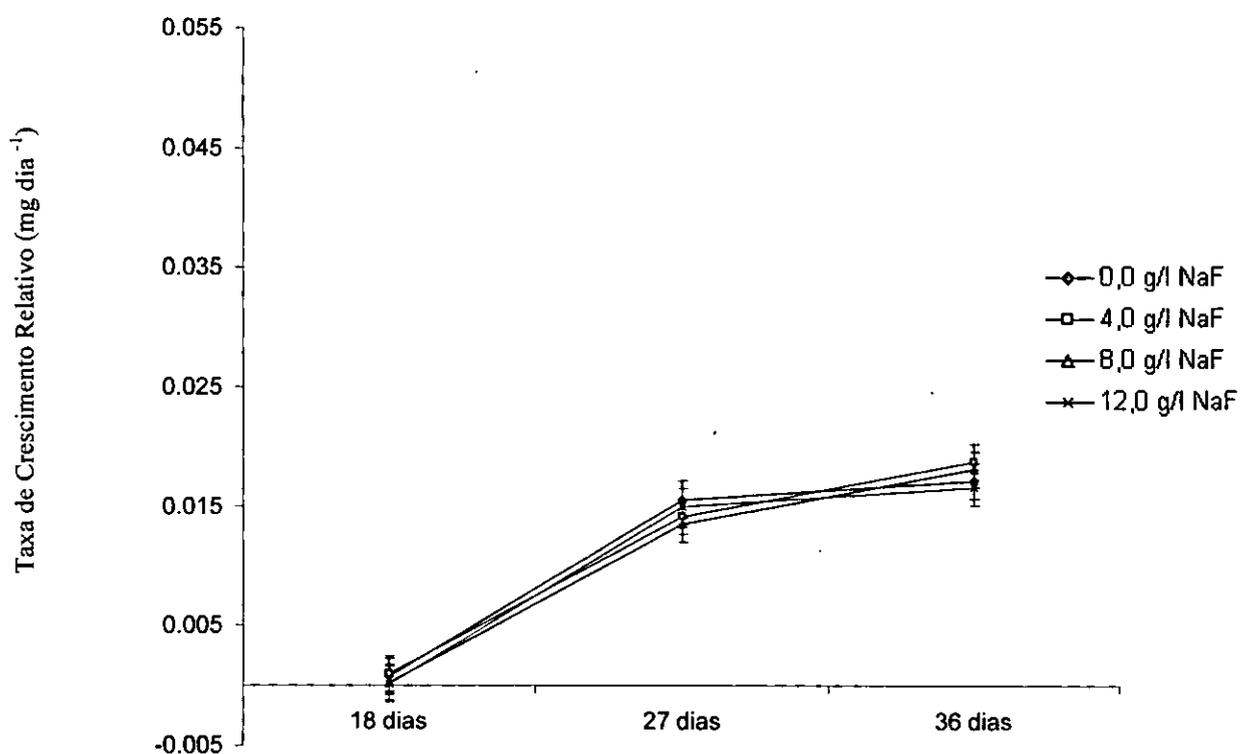


Fig. 9. Efeito do flúor na taxa de crescimento relativo da planta *L. multiflorum* ao longo dos dias, a rega do tipo 1. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

Na rega do tipo 2 a taxa de crescimento relativo reduziu significativamente ao longo do tempo, independentemente da concentração do flúor.

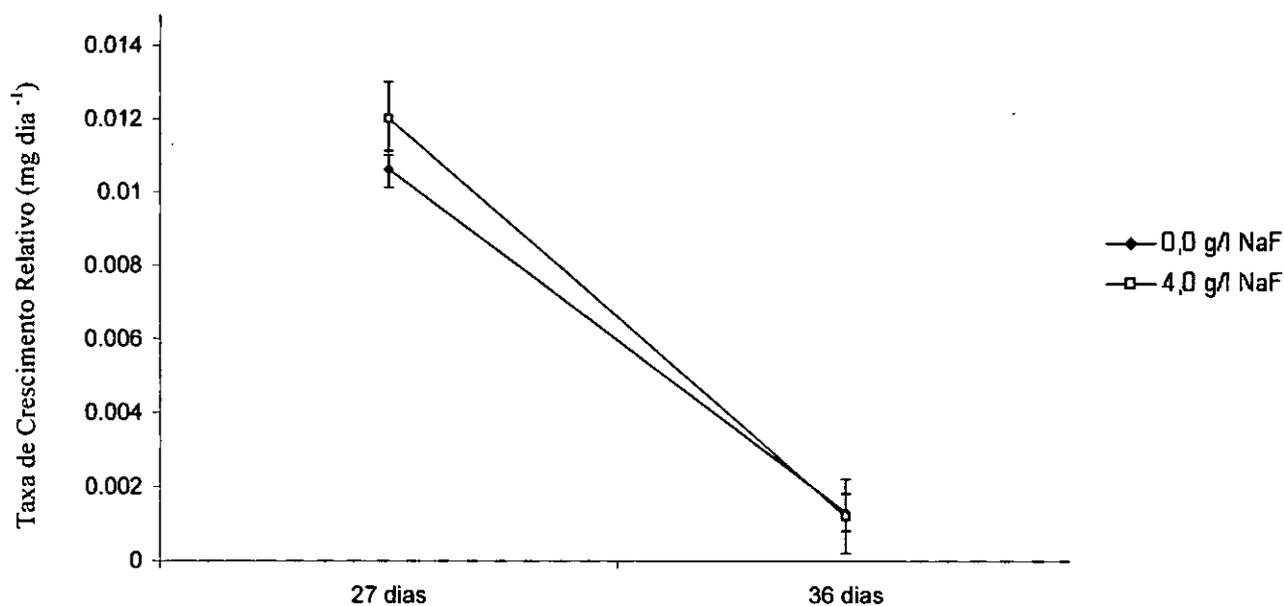
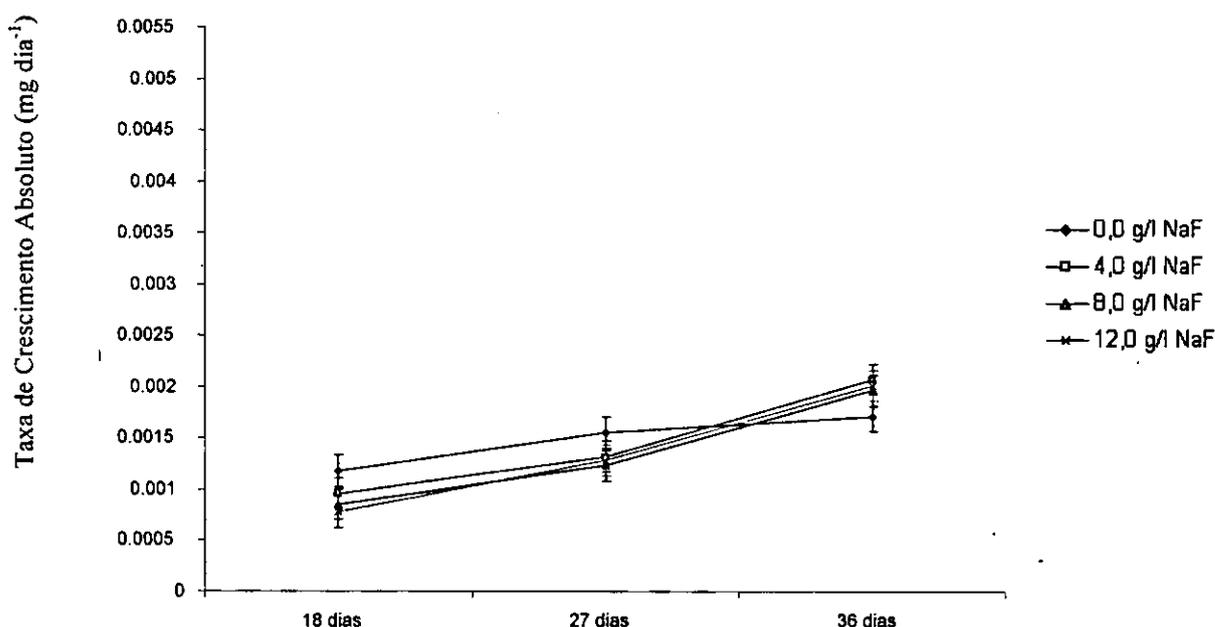


Fig. 10. Efeito do flúor na taxa de crescimento relativo da planta *L. multiflorum* ao longo dos dias, a rega do tipo 2. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

Tal como na rega 1, na rega 2 o flúor não afectou significativamente as taxas de crescimento relativo da planta apesar da figura 8 mostrar que o tratamento 4,0 g/l possui maior valor de taxa de crescimento relativo que o tratamento 0,0 g/l de NaF.

#### 4.4.2 Taxa de Crescimento Absoluto

A taxa de crescimento absoluto da planta não mostrou diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo e entre as concentrações de NaF, tanto sob a rega do tipo 1 (figura 11) como sob a rega do tipo 2 (figura 12). Contudo verificou-se que ao longo do tempo ocorreu um aumento mais acentuado da taxa de crescimento absoluto no tratamento 0,0 g/l de NaF entre os dias 18 e 27 enquanto que entre os dias 27 e 36 ocorre um aumento mais acentuado dos tratamentos 4,0 g/l, 8,0 g/l e 12,0 g/l de NaF (figura 11).



Por outro lado, o gráfico da taxa de crescimento absoluto na rega do tipo 1 revelou que nos dias 18 e 27 depois da sementeira a taxa teve uma tendência de decréscimo com aumento da concentração de NaF e no dia 36 depois da sementeira uma tendência de crescimento com aumento da concentração de NaF.

Ao longo do tempo a taxa de crescimento absoluto não se altera significativamente na rega do tipo 2, mostrando uma tendência de se manter constante nas concentrações de 0,0 g/l e 4,0 g/l de NaF (figura 12).

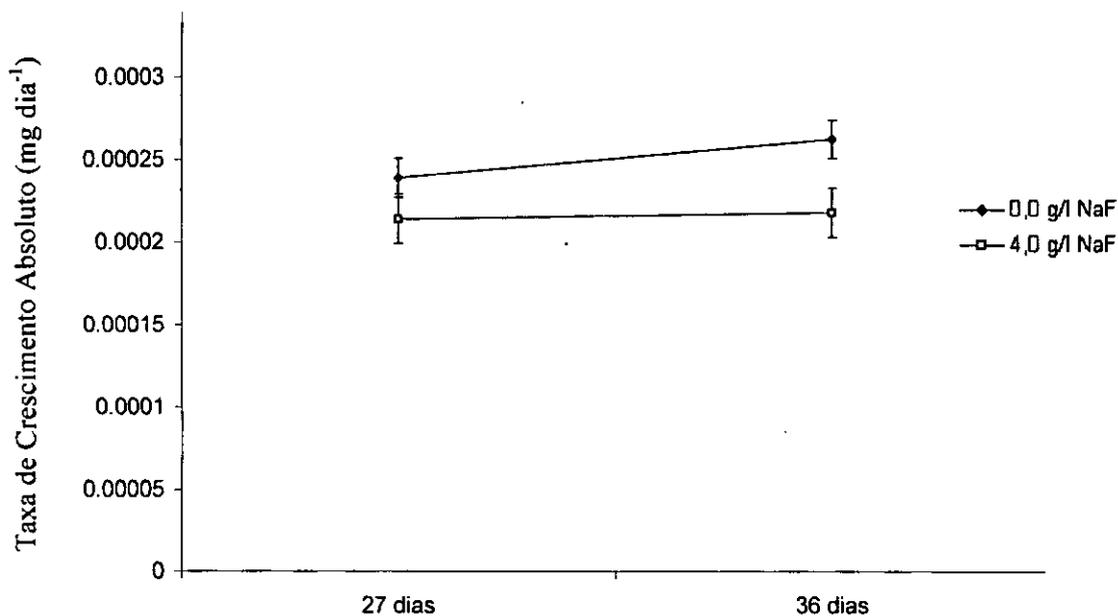


Fig. 12. Efeito do flúor na taxa de crescimento absoluto da planta *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 2. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

O gráfico da rega tipo 2 mostrou que o flúor tende a diminuir a taxa de crescimento absoluto (figura 12).

#### 4.4.3 Taxa de Assimilação Aparente

Ao longo do tempo não houveram diferenças significativas usando o teste de Kruskal-Wallis embora o gráfico mostre uma tendência de aumento da taxa de assimilação aparente (figura 13).

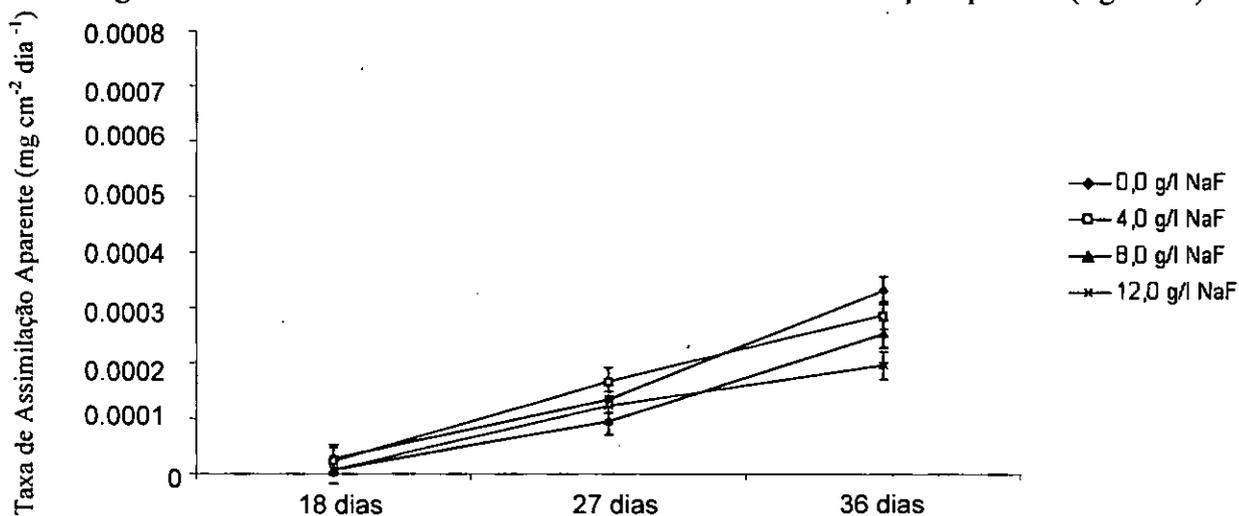


Fig. 13. Efeito do flúor na taxa de assimilação aparente da planta *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 1. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

A taxa de assimilação aparente mostrou diferenças significativas entres os tratamentos de NaF aos 36 dias, ocorrendo uma redução com o aumento das concentrações (figura 13).

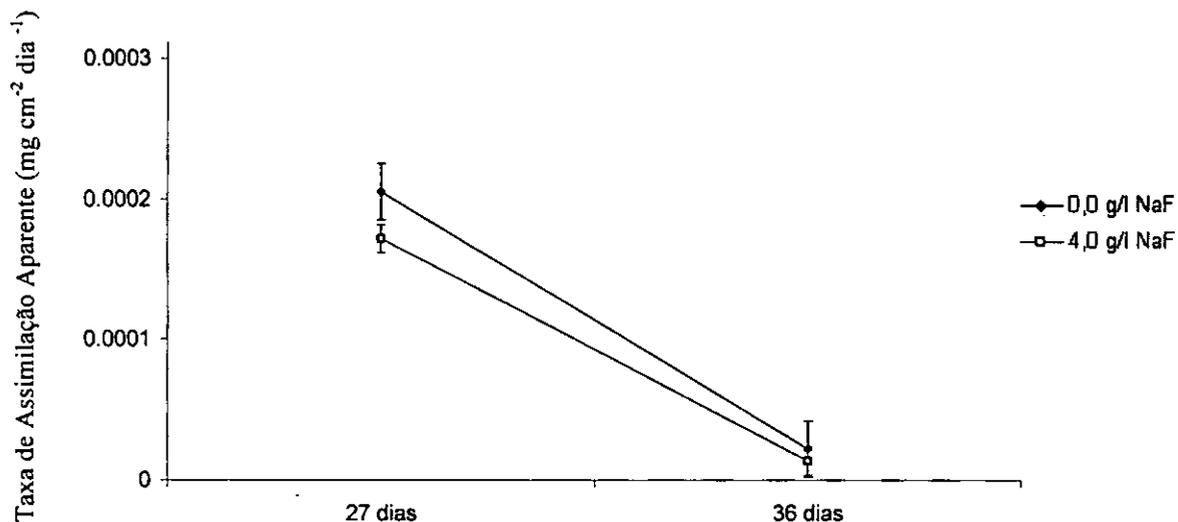


Fig. 14. Efeito da taxa de assimilação aparente da planta *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 2. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

Porém, quando foi efectuada a rega do tipo 2 a taxa de assimilação aparente decresceu significativamente ao longo do tempo para todos tratamentos (figura 14) e não foram detectados diferenças significativas entre as concentrações NaF apesar de o tratamento de 4,0 g/l de NaF apresentar sempre um valor mais baixo.

#### 4.4.4 Razão do Peso do Colmo

A razão do peso do colmo não variou significativamente nem ao longo do tempo nem entre os tratamentos de NaF tanto para a rega do tipo 1 (figura 15) e como para a rega do tipo 2 (figura 16). Contudo, quando administrada a rega do tipo 1 no dia 27 após a sementeira ocorreu uma tendência de redução da razão do peso do colmo seguido de um aumento no dia 36 após a sementeira, à excepção do tratamento 0,0 g/l NaF (figura 15).

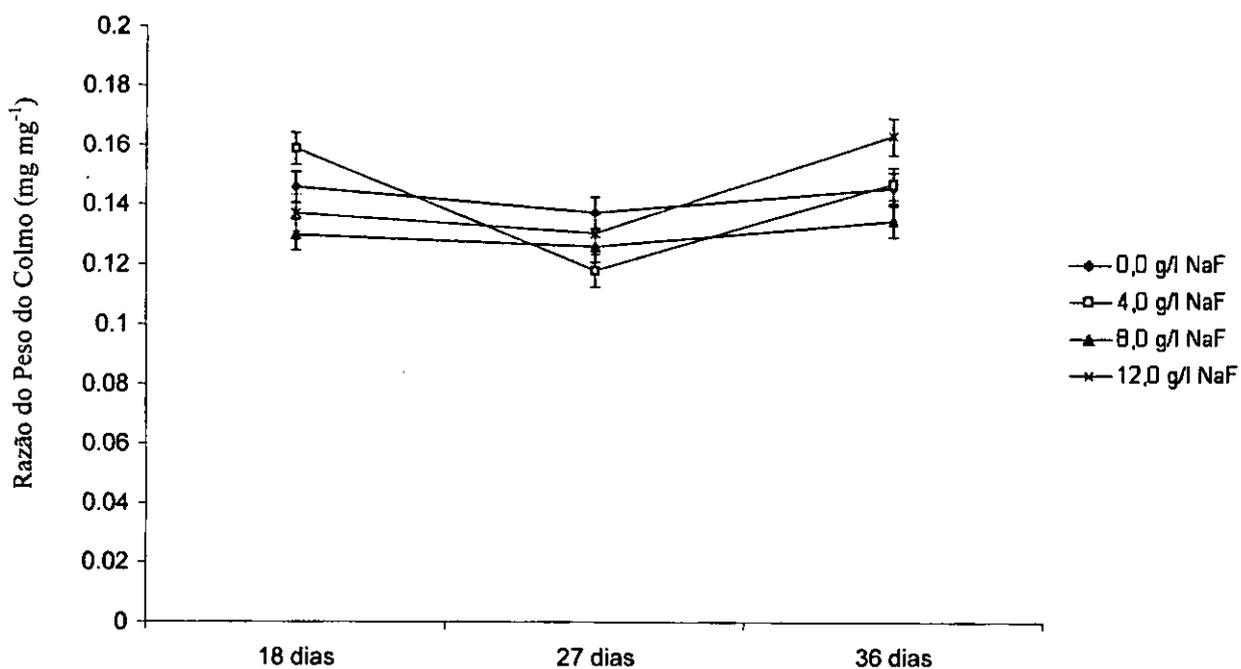


Fig. 15. Efeito do flúor na razão do peso do colmo de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 1. Dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão).

Na rega do tipo 2 a razão do peso do colmo tendeu a diminuir ao longo do tempo (figura 16).

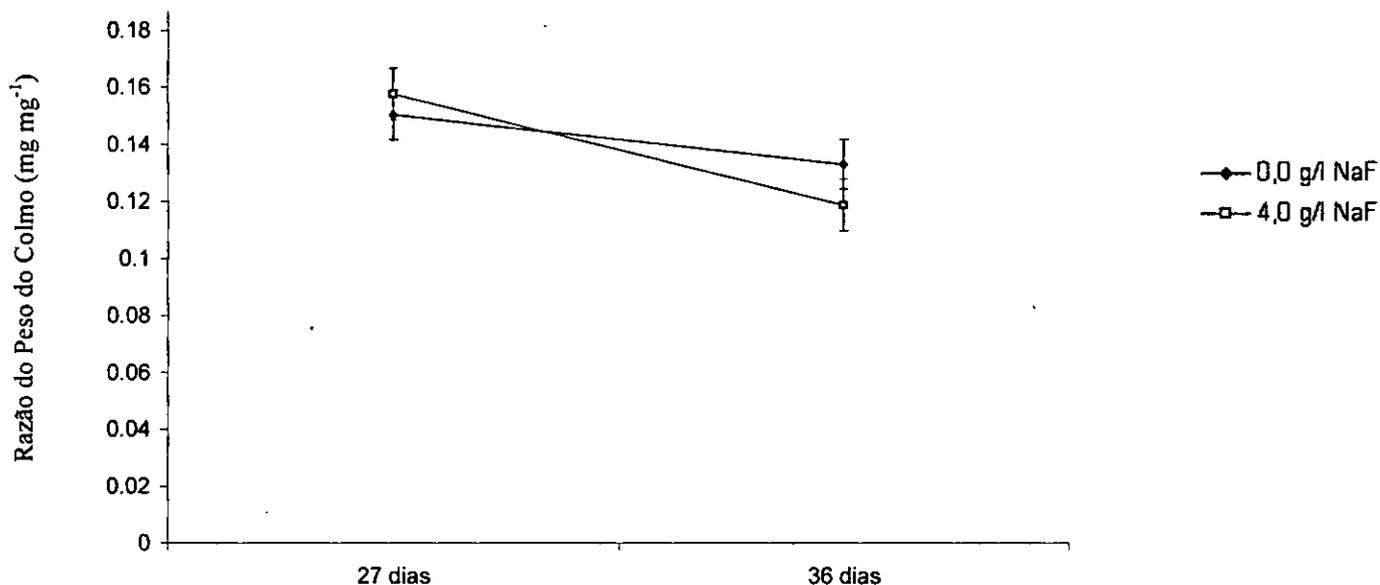


Fig. 16. Efeito do flúor na razão do peso do colmo em *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 2. Dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

A razão do peso do colmo no tratamento 4,0 g/l NaF foi maior que no tratamento 0,0 g/l NaF no dia 27 depois da sementeira ao contrário do dia 36 depois da sementeira onde a razão do peso do colmo no tratamento 4,0 g/l NaF foi menor que no tratamento 0,0 g/l NaF (figura 16).

#### 4.4.5 Razão do Peso da Raiz

A razão do peso da raiz não mostrou variações estatisticamente significativas para a rega do tipo 1 quer ao longo do tempo quer entre os tratamentos de NaF (figura 17), embora tenha mostrado tendência de diminuição ao longo do tempo e também com a presença do flúor.

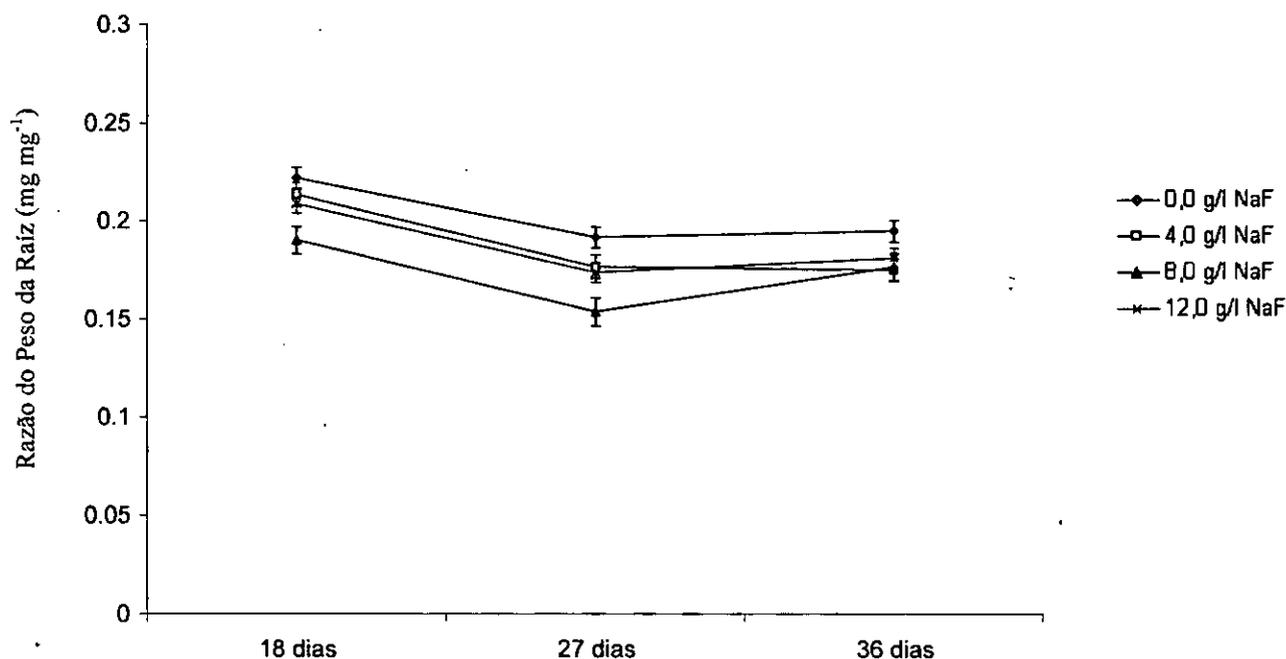


Fig. 17. Efeito do flúor na razão do peso da raiz de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 1. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

Na rega do tipo 2 a razão do peso da raiz tendeu a aumentar ao longo do tempo apesar do teste estatístico não ter detectado diferenças significativas (figura 18).

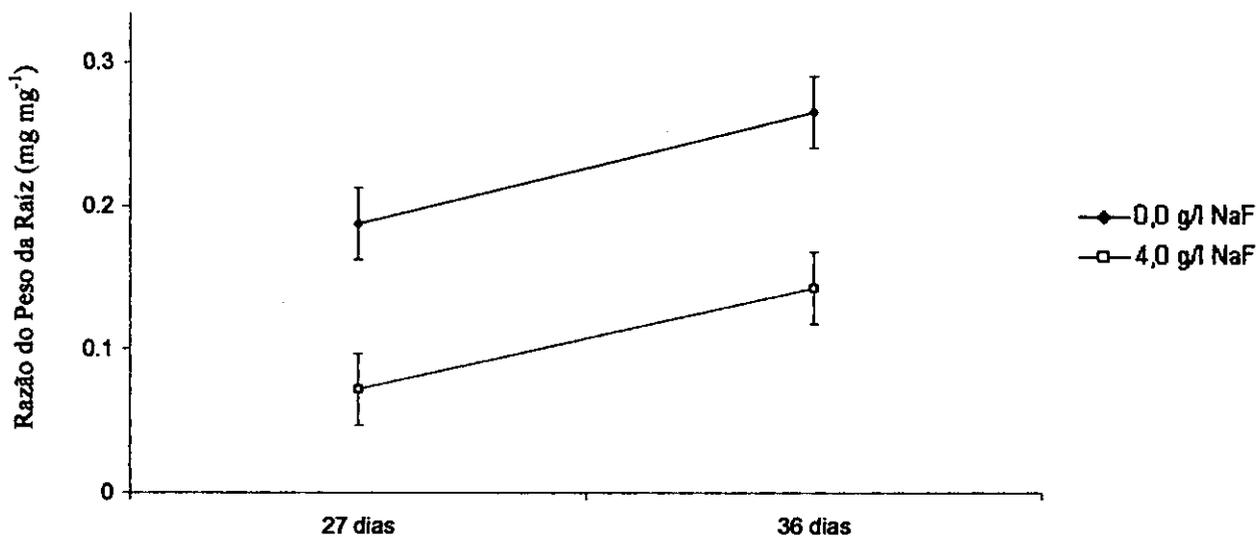


Fig. 18. Efeito do flúor na razão do peso da raiz de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 2. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

A concentração do flúor voltou a afectar negativamente a razão do peso da raiz na rega do tipo 2, nos dias 27 e 36 depois da sementeira dum forma significativa (figura 18).

#### 4.4.7 Área Específica da Folha

Quando efectuada a rega do tipo 1 a área específica da folha aumentou significativamente ao longo do tempo com excepção do controle que só aumentou entre os dias 18 e 27 depois da sementeira (figura 19).

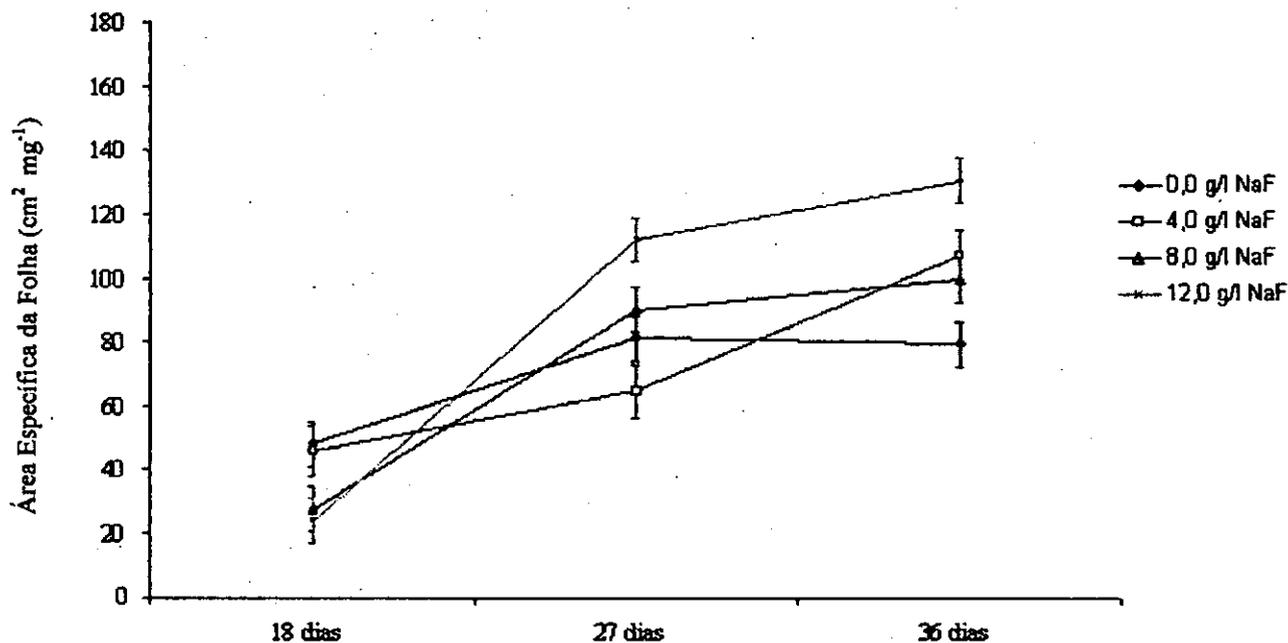


Fig. 19. Efeito do flúor na área específica da folha de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 1. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

A concentração do flúor não afectou significativamente a área específica da folha, pelo teste de kruskal-Wallis. No entanto o gráfico revela que no dia 18 depois da sementeira há uma tendência de redução da área específica da folha quando se aumenta a concentração flúor. Esta tendência inverte-se no dia 36 depois da sementeira, isto é a área específica da folha aumenta com aumento da concentração do flúor (figura 19).

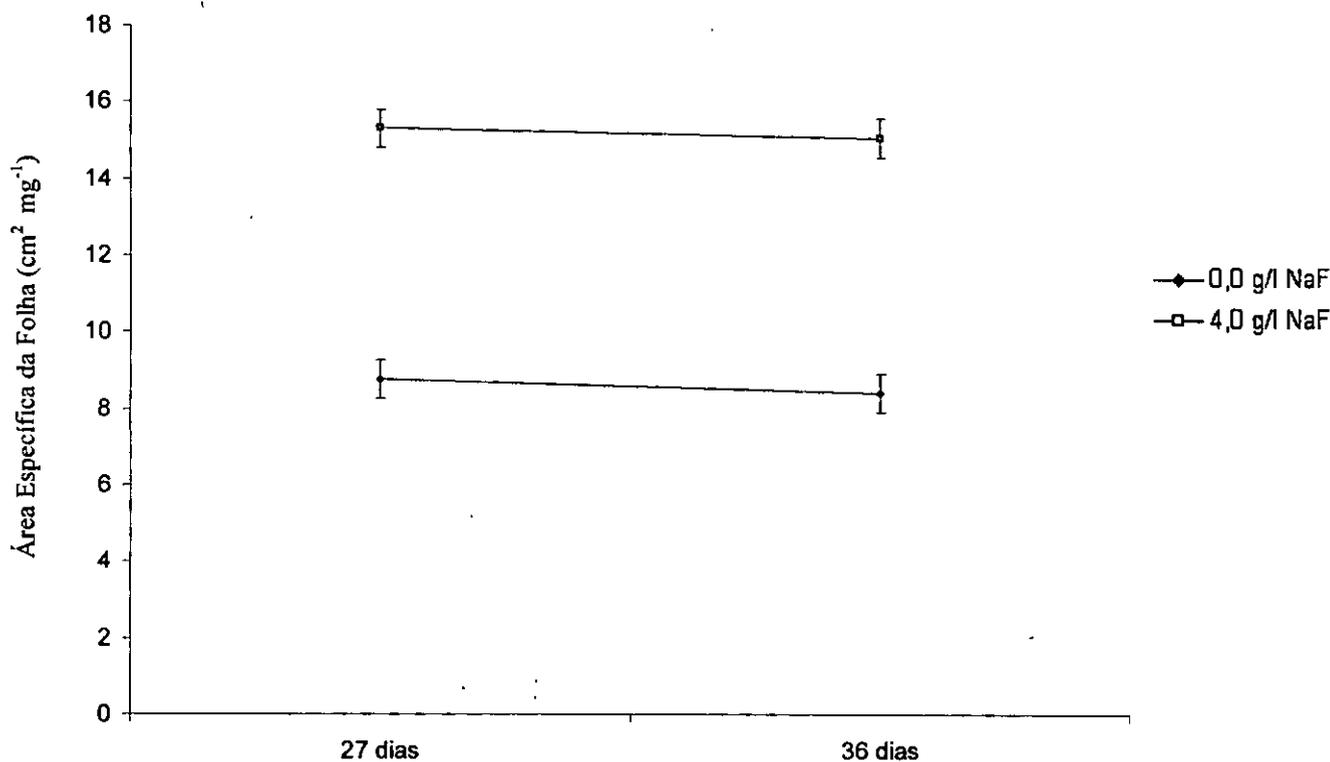


Fig. 20. Efeito do flúor na área específica da folha de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega do tipo 2. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

Na rega tipo 2 a área específica da folha não variou significativamente ao longo do tempo, mas houve uma tendência de diminuição (figura 20). O teste de Kruskal-Wallis revelou que o aumento da área específica da folha foi significativo quando cultivadas no tratamento 4,0 g/l de NaF em relação ao tratamento 0,0 g/l NaF tanto no período 27 dias como no 36 dias depois da sementeira (figura 20).

#### 4.4.8 Razão da Área Foliar

A razão da área foliar aumentou significativamente ao longo do tempo e não registou diferenças significativas entre os tratamentos sob o tipo de rega 1 (figura 21), embora, de uma forma geral se verifique que a razão da área foliar no dia 18 decresce com aumento da concentração do flúor e nos 27 e 36 dias tende a aumentar com aumento do flúor.

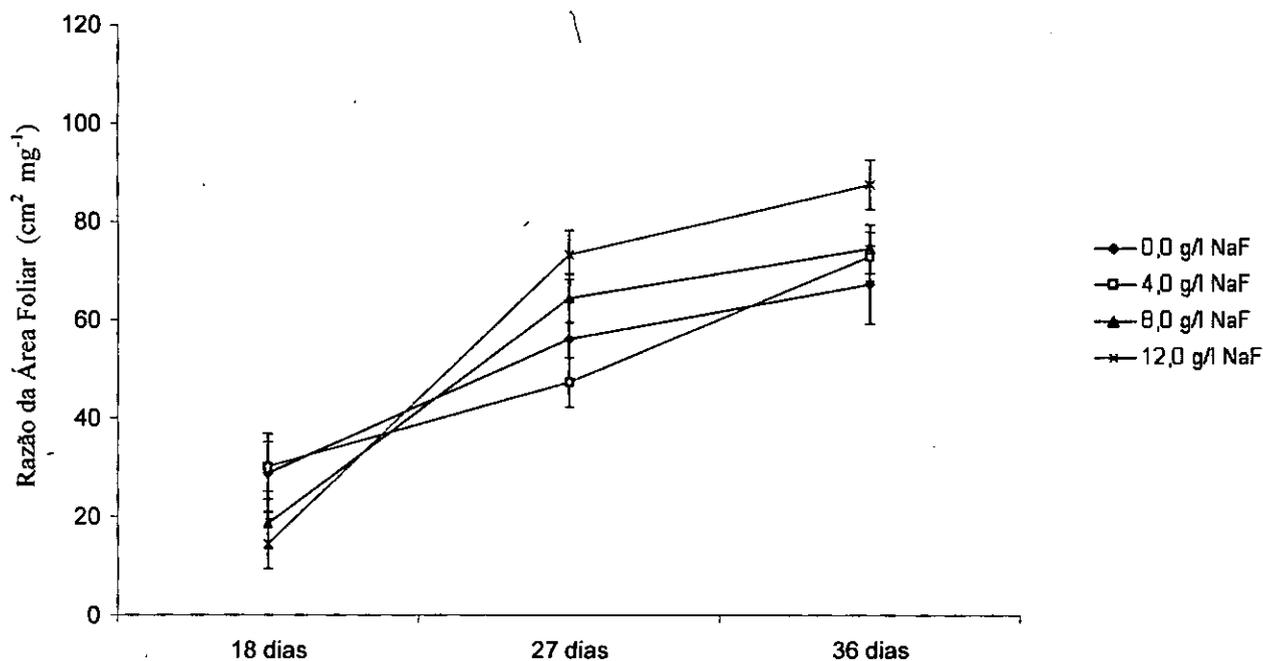


Fig. 21. Efeito do flúor na razão da área foliar de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega tipo 1. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

Sob o tipo de rega 2 ao longo do tempo não houve uma mudança estatisticamente significativa apesar da razão da área foliar mostrar um tendência de decréscimo (figura 22).

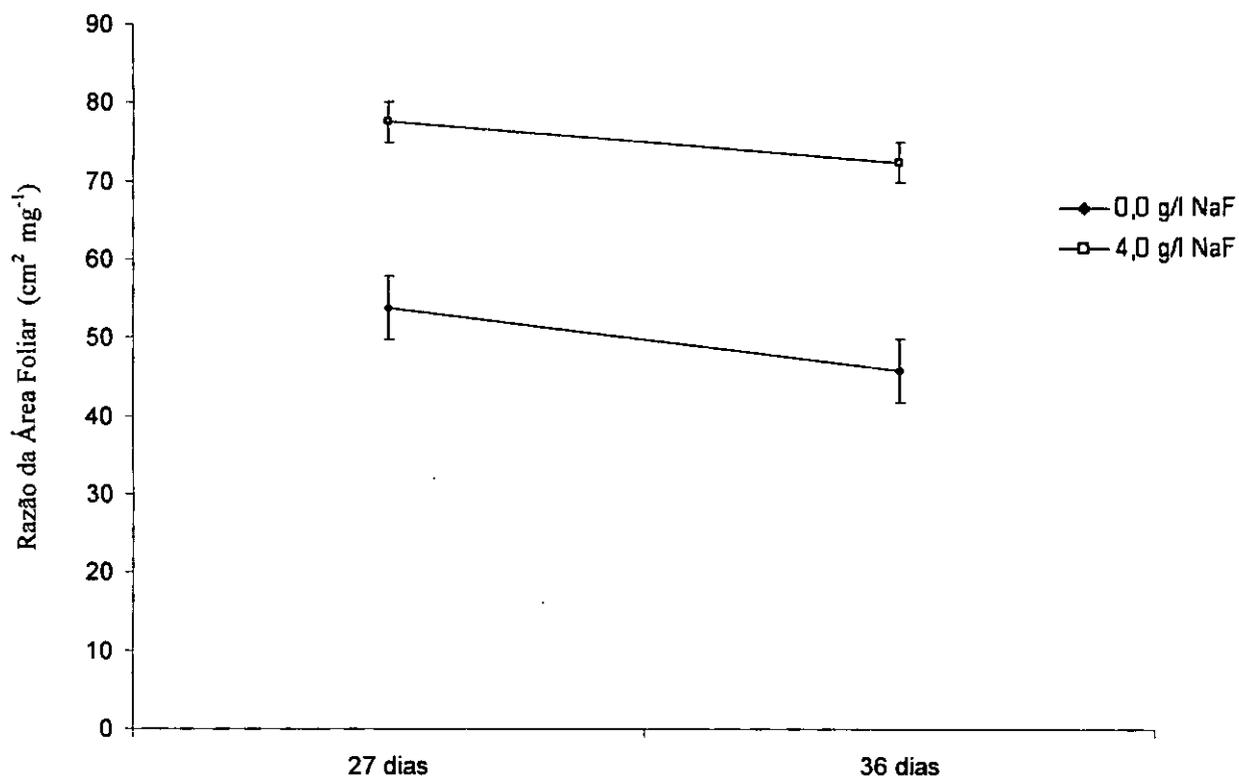


Fig. 22. Efeito do flúor na razão da área foliar de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega tipo. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

A concentração do flúor aumentou significativamente a razão da área da folha no tratamento 4,0 g/l de NaF em relação ao tratamento 0,0 g/l de NaF, nos dias 27 e 36 depois da sementeira (figura 22).

#### 4.4.9 Conteúdo de Água Foliar

Na rega tipo 1 o conteúdo de água foliar não registou diferenças significativas ao longo do tempo e nem entre as concentrações (figura 23) apesar de que houve uma tendência de redução do conteúdo de água foliar com aumento da concentração do flúor.

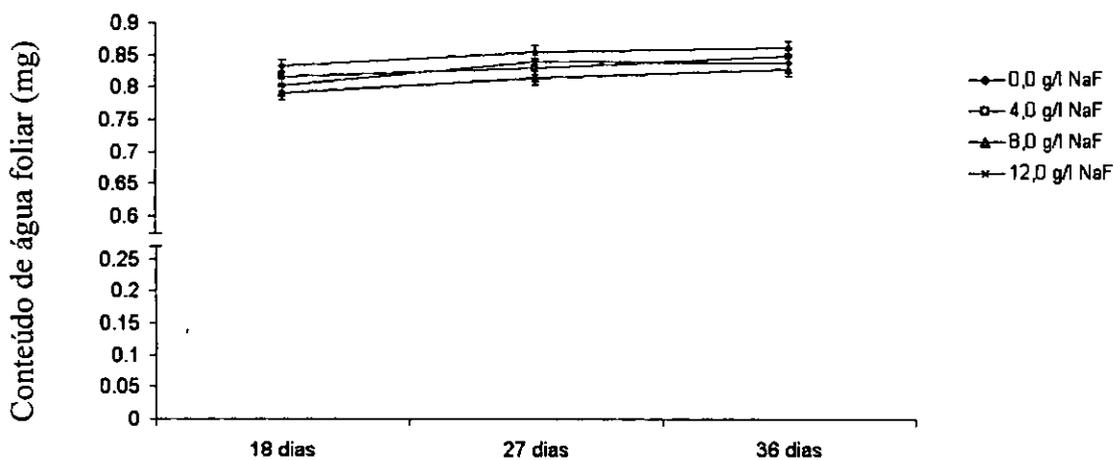


Fig. 23. Efeito do flúor no conteúdo de água foliar de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega tipo 1. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

Na rega tipo 2 o conteúdo de água foliar ao longo do tempo diminuiu ligeiramente para ambos tratamentos mas esta diminuição não foi estatisticamente significativa (figura 24).

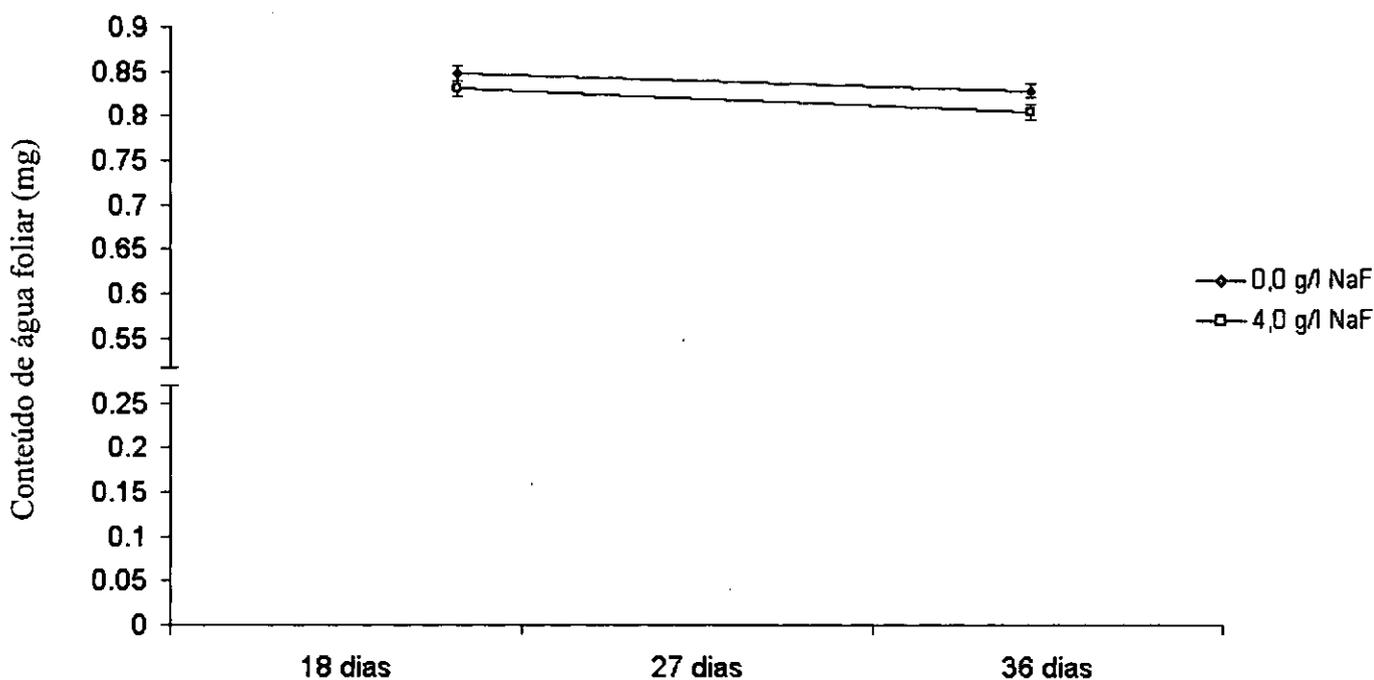


Fig. 24. Efeito do flúor no conteúdo de água foliar de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega tipo 2. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

As diferenças entre os tratamentos de 0,0 g/l e 4,0 g/l de NaF não foram estatisticamente significativas, contudo há uma tendência do flúor diminuir o conteúdo de água foliar tanto aos 27 como aos 36 dias depois da sementeira (figura 24).

#### 4.4.10 Peso Específico da Folha

Quando administrada a rega tipo 1 o peso específico da folha diminuiu significativamente entre os 18 e 27 dias depois da sementeira e aumentou significativamente com aumento da concentração do flúor somente aos 18 dias depois da sementeira (figura 25).

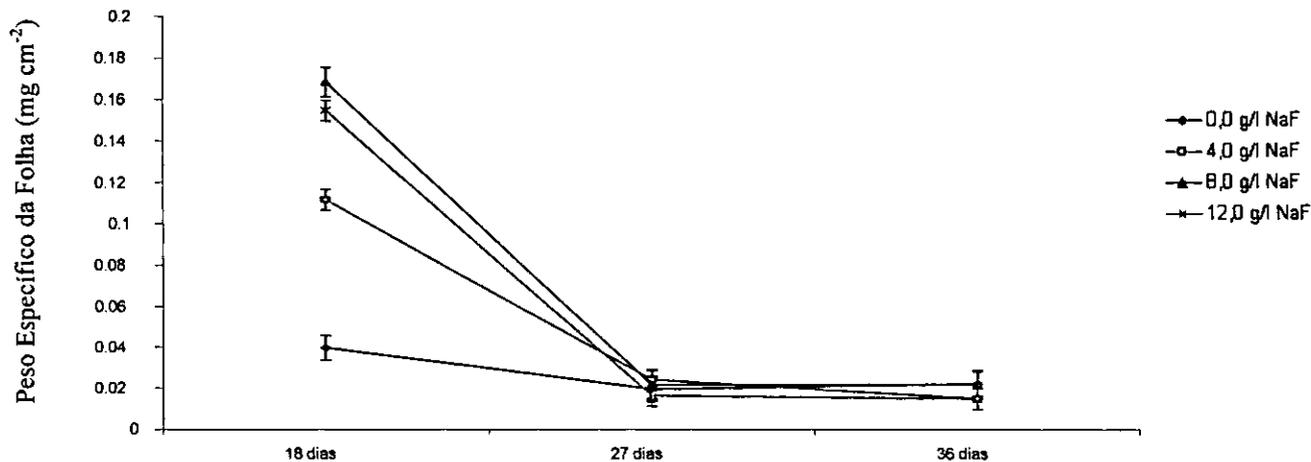


Fig. 25. Efeito do flúor no peso específico da folha de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega tipo 1. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão.

Na rega tipo 2 o peso específico da folha não se alterou significativamente ao longo do tempo registando-se, contudo, uma tendência de aumento (figura 26).

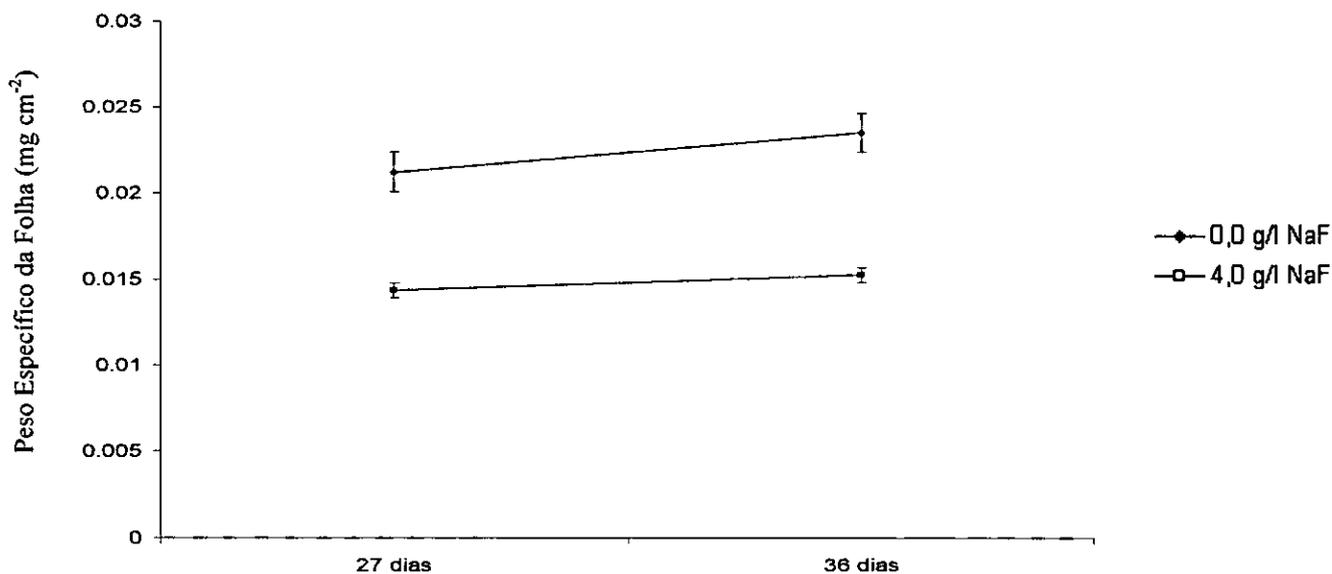


Fig. 26. Efeito do flúor no peso específico folha de *L. multiflorum* ao longo dos dias, sob a rega tipo 2. Os dados referem-se a média de 15 plantas  $\pm$  desvio padrão

O peso específico da folha diminuiu significativamente no tratamento 4,0 g/l de NaF em relação ao tratamento 0,0 g/l de NaF, tanto aos 27 como aos 36 dias depois da sementeira (figura 26).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 QUÍMICA DO SOLO

A presença do flúor mostrou que ele altera as propriedades do solo. Tem sido referido que a mobilidade do flúor no solo ou risco de contaminação de *L. multiflorum*, depende da composição química do solo. Quando o solo é fracamente ácido (pH 6,0-6,5), como o usado neste estudo (tabela 2), a possibilidade do flúor ser absorvido pela planta é mínima mas aumentaria se o solo fosse altamente ácido ou alcalino (pH < 6,0 ou pH > 6.5) (Wenzel e Blum, 1992).

O solo usado neste estudo possui uma pequena quantidade de argila (tabela 2) o que pode ter contribuído para uma baixa solubilidade do flúor, reduzindo ainda mais a possibilidades de *L. multiflorum* absorver o flúor do solo, pois, Gisiger (1968) analisando a textura do solo encontrou uma relação positiva entre a solubilidade do flúor no solo e a quantidade de argila.

Por outro lado, a crescente condutividade eléctrica registada com o aumento da concentração de NaF (tabela 2) pode ser atribuída ao facto de se ter usado o fluoreto de sódio como fonte do poluente flúor, pois a concentração de sódio aumenta a condutividade eléctrica (CE) do solo (Arnesen, 1997).

### 5.2 EFEITO DO FLÚOR NA EMERGÊNCIA DAS PLANTAS

A emergência das plantas e as concentrações de NaF mostraram uma correlação negativa (tabela 3), o que significa que com o aumento das concentrações ocorre uma redução no número de plantas a emergirem (figura 1 e 2). As diferenças encontradas entre o tipo de rega 1 e o tipo de rega 2 (tabela 3) podem ser atribuídas às diferenças na quantidade de água usada para a rega. Estas podem ter contribuído para o lixiviamento do NaF no solo (Davison, 1983; Feng, *et al.*, 2003, Mirlean *et al.* 2002). Desta maneira, na rega do tipo 1 ocorre maior remoção/diluição do poluente, o que reduziu o seu efeito de inibidor em *L. multiflorum*. Quando a quantidade de água usada na rega é reduzida (rega 2) a semente sofre maior efeito devido à inibição pelo poluente acrescida do efeito da escassez de água, pois a disponibilidade de água afecta a germinação das sementes (Taiz e Zeiger, 1998). O efeito de inibição encontrado neste estudo, está em conformidade com os resultados de Ramogopal *et al.* (1969 citado por Arnesen 1997) e Singh *et al.* (1995) que mostraram que a concentração de NaF tem um efeito inibitório nas plantas. Horner (1991, citado por Horner e Bell 1995) usando *Lolium sp.* encontrou resultado semelhante tendo atribuído a causa do efeito inibitório a flúor e não ao sódio.

Contudo, a concentração de sódio no solo aumenta a condutividade eléctrica (CE) e este factor não pode ser ignorado como contribuinte para inibição de germinação de *L. multiflorum* apesar de neste estudo o sódio não ter estado em valores críticos (tabela 2) pois muitas espécies toleram CE até  $4 \text{ mS cm}^{-1}$  (Marschner, 1986 citado por Arnesen 1997).

### 5.3 EFEITO DO FLÚOR NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

#### 5.3.1 Pigmentos Fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos como a clorofila a, clorofila b, feofitina a, feofitina b e caratenoides estão contidos nos cloroplastos (Larcher, 1995) e quando a folha cresce o número cloroplastos por célula aumenta com um correspondente aumento destes pigmentos (Atwell *et al.*, 1999). Comportamento idêntico foi encontrado neste estudo quando a espécie *L. multiflorum* está sob a rega do tipo 1 (figura 3 e 5) em que as concentrações destes componentes bioquímicos vão aumentando ao longo do tempo. Contudo este aumento ao longo dos dias pode estar dependente de outros factores como os nutrientes, água, temperatura e luz (Atwell *et al.*, 1999).

Carreras *et al.* (1996) afirma que os poluentes reduzem a concentração dos pigmentos fotossintéticos mas sob a rega do tipo 1 o flúor não reduziu significativamente nem a quantidade dos pigmentos fotossintéticos principais e nem as dos acessórios mostrando apenas uma tendência de diminuição aos 18 dias depois da sementeira (figura 3 e 5). No dia 36 após a sementeira a clorofila a e b (figura 3), feofitina a e b (figura 5) aumentaram ligeiramente nos tratamentos com NaF em relação ao controle o que pode ser atribuído ao efeito fertilizante do flúor (aumenta a matéria orgânica dissolvida) que estimula o crescimento da planta com consequente aumento dos pigmentos fotossintéticos (Nash, 1976; Kauppi, 1980; Von Arb and Brunold, 1990 citados por Carreras *et al.* 1998).

No tipo de rega 2, os pigmentos fotossintéticos diminuíram ao longo do tempo (figura 4 e 6). Este resultado pode dever-se ao facto da quantidade de água usada na rega diminuir com o tempo (ANEXO I) o que pode ter influenciado a degradação dos pigmentos principais e dos pigmentos acessórios como argumentam Wareing e Phillips (1970) devido a falta de água.

Os tratamentos de NaF na rega do tipo 2 não afectaram significativamente nem os pigmentos principais nem os acessórios embora tenderam a diminuir na concentração de 4,0 g/l de NaF, possivelmente porque o efeito do flúor é mais pronunciado nas espécies mais sensíveis dos que nas resistentes ou bioacumuladoras (Haidouti *et al.*, 1993; Moeri *et al.*, 1988, Mulgrew e Williams, 2000) como é o caso de *L. multiflorum* (Domingos *et al.*, 1998; Figueiredo, 1994; Klumpp *et al.*, 1996; Sandrin *et al.*, 2002; VDI, 2003; Zimmermann *et al.*, 2000). Por outro lado, pelo facto do poluente provir do solo e poder ser retido nas raízes, pode não ter um efeito prejudicial significativo nas folhas (Singh *et al.* 1995).

### 5.3.3 Proteína Total

O flúor afectou negativamente a quantidade de proteína total nas folhas quando cultivadas em regime da rega do tipo 1 no período de 36 dias depois da sementeira (figura 7) e da rega do tipo 2 no período 27 e 36 dias depois da sementeira (figura 8). Estes resultados estão de acordo com Godzik e Linkens (1974, citado por Carreras *et al.*, 1996) que sustentam que a quantidade de proteína diminui na presença de poluentes devido a inibição da síntese *de novo* e/ou um aumento da degradação de aminoácidos. Rabe e Kreeb (1979, citado por Carreras *et al.*, 1996) sugeriram que o decréscimo do conteúdo de proteínas nas folhas é um bom indicador dos níveis de poluição. Na rega do tipo 2 a quantidade de proteína total decresceu ao longo do tempo tanto para o tratamento 0,0 g/l NaF como para 4,0 g/l NaF (figura 8) o que pode ser também atribuído à redução da quantidade de água disponível que segundo Fitter e Hay (1987) reduz a quantidade de proteína.

### 5.3 EFEITO DO FLÚOR NOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

#### 5.4.1 Taxa de Crescimento Relativo

A taxa de crescimento relativo não foi significativamente influenciada pelas concentrações de NaF, em ambos os tipos de rega (figura 9 e 10). Estes resultados contradizem com Singh *et al.* (1995) que encontraram uma relação negativa entre o aumento do flúor e a taxa de crescimento relativo em *Abelmoschus esculentus*. Esta diferença, que era esperada em *L. multiflorum*, no entanto, não se verificou talvez porque o pH do solo e a textura não permitiram uma grande mobilidade do flúor no solo. Esta situação pode ter levado a que o flúor não estivesse acessível em quantidades tóxicas para *L. multiflorum*, tornando-se num estimulante do crescimento como foi sugerido por Singh *et al.*, (1995) e Hãni (1975, citado por Haidouti, 1995). Na presente situação o flúor aumentou a quantidade de matéria orgânica dissolvida (Braen e Weinstein, 1985). De facto, ao se examinar a tabela 2, nota-se que os solos tratados com NaF possuem menor quantidade de matéria orgânica, um indicativo de que as plantas absorveram a matéria orgânica solúvel. Apesar disso, as diferenças não foram significativas (não se registando o efeito tóxico - redução de crescimento, nem o efeito estimulante - aumento do crescimento), o que pode ser explicado pelo facto de se ter estabelecido um equilíbrio entre o efeito tóxico e o efeito estimulante de crescimento, resultando numa taxa de crescimento relativo não significativamente diferente do controle.

Ao longo do tempo a taxa de crescimento relativo no tipo de rega 2 diminuiu significativamente (figura 10) coincidindo com o pressuposto de Gardner *et al.* (1994) a redução da disponibilidade de água pode afectar negativamente a taxa de crescimento relativo. Lucero *et al.* (1997) encontraram o mesmo resultado usando *Lolium sp.* sob deficiência de água, o que pode apoiar o facto de na rega 2, além do efeito do flúor o efeito da deficiência de água pode ter tido um papel importante na taxa de crescimento relativo.

#### 5.4.2 Taxa de Crescimento Absoluto

Quando uma planta é cultivada em solo contaminado com flúor a taxa de crescimento absoluto que representa o ganho da matéria seca por dia sofre um decréscimo (Singh *et al.* 1995). A tendência de diminuição observada na taxa de crescimento absoluto de *L. multiflorum* quando cultivada em solos tratados com flúor (figura 11 e 12) demonstra que o flúor reduz a taxa de crescimento absoluto da planta. No entanto à medida que a planta vai crescendo este efeito torna-se menor e a planta reinicia um crescimento rápido. Esta situação foi verificada na rega do tipo 1 aos 36 dias depois da sementeira (figura 11).

#### 5.4.3 Taxa de Assimilação Aparente

Na presente experiência o flúor provocou uma redução na taxa de assimilação aparente (figura 13 e 14), o que pode ser explicado pelo facto do flúor inibir processos bioquímicos de fotossíntese (Cronin *et al.*, 2000) uma vez que a taxa de assimilação aparente é considerada como sendo a fotossíntese líquida (Atwell *et al.*, 1999, Cramer *et al.*, 1994, Giannini *et al.*, 1985).

Na rega do tipo 2 a taxa de assimilação aparente reduziu significativamente ao longo dos períodos (figura 14) indicando uma redução na produção de novos compostos devido a diminuição da água usada na rega, pois Atwell *et al.* (1999) afirma que a taxa de assimilação aparente depende do balanço hídrico.

#### 5.4.4 Razão do Peso do Colmo

A razão do peso do colmo não mostrou diferenças significativas entre as concentrações de NaF e entre os períodos para a rega 1 (figura 15) e rega 2 (figura 16). Mas o gráfico da rega 1 (figura 15) mostrou uma redução seguida de um aumento para os tratamentos com flúor. Esta observação pode ser devido ao início tardio da emergência da planta, porque as plantas cultivadas em solos contaminados com flúor apresentaram a fase primordial de crescimento aos 27 dias depois da sementeira. Nesta fase há proliferação foliar levando a um aumento do peso desta parte em detrimento do acréscimo dos restantes órgãos da planta, conduzindo assim a um decréscimo da razão do peso do colmo (Craker *et al.*, 1983). No tipo de rega 2, a razão do peso do colmo na concentração 4,0 g/l de NaF passa de maior valor para menor valor em relação a concentração 0,0 g/l de NaF devido ao mesmo factor – atraso na emergência. Por outro lado, ao longo do tempo em ambos tratamentos a razão do peso do colmo decresce como resultado da resposta a

diminuição da disponibilidade de água, em que a planta investe mais no crescimento das raízes contribuindo para um aumento do peso da planta total do que do colmo (figura 16).

#### 5.4.5 Razão do Peso da Raiz

O flúor afectou negativamente a razão do peso da raiz tanto na rega do tipo 1 (figura 17) como na rega do tipo 2 (figura 18). Este comportamento é resultante da inibição do crescimento da raiz pelo flúor (Horner e Bell, 1995), deste modo a raiz desenvolveu-se menos em relação a planta total quando submetida ao meio contaminado com flúor. Ao longo do tempo a razão do peso da raiz diminuiu indicando que a planta está numa fase inicial de crescimento em que a planta aumenta mais o peso que a raiz levando assim a um decréscimo da razão do peso da raiz (Atwell *et al.*, 1999). Porém na rega do tipo 2 a razão do peso da raiz aumentou ao longo do tempo como resultado da diminuição da disponibilidade da água no solo, confirmando os resultados de Kalopos *et al.* (1996) de que a redução da água provoca um aumento da razão do peso da raiz. Jupp e Newman (1987, citados por Lucero *et al.*, 1999) usando *Lolium sp.*, encontraram o mesmo resultado de que em condições de défice de água (rega 2) a razão do peso da raiz aumenta como resultado do crescimento lateral da raiz.

#### 5.4.6 Área Específica da Folha

Área específica da folha, no tipo de rega 1, aumentou significativamente ao longo do tempo nas concentrações de 4,0 g/l, 8,0 g/l e 12,0 g/l de NaF mas na concentração de 0,0 g/l de NaF só aumentou significativamente entre os 18 e 27 dias depois da sementeira (figura 19). Este resultado pode dever-se ao facto do período de rápida expansão da área foliar do controle ter terminado aos 27 dias depois da sementeira devido a alta velocidade de emissão de folhas que *L. multiflorum* possui (Groff *et al.*, 2002). Nos tratamentos 4,0 g/l, 8,0 g/l e 12,0 g/l de NaF o efeito inibidor do flúor retardou o período de início da rápida expansão, acontecendo entre os 27 e 36 dias depois da sementeira sem um correspondente aumento da biomassa (devido a redução da síntese *de novo* causada pelo flúor), resultando nessa altura numa maior área específica da folha.

O flúor provoca redução das sínteses bioquímicas das folha, conduzindo a uma diminuição do peso da folha (Lima, 2002, Souza *et al.*, 1999). Assim sendo, a razão (área foliar/peso seco da folha) aumenta nas concentrações de 4,0 g/l, 8,0 g/l e 12,0 g/l de NaF em relação ao controle. Apesar de no dia 18 depois da sementeira o controle possuir um valor maior resultante da sua

grande área foliar (primeiro a emergir), este comportamento tende a mudar ao longo do tempo à medida que novas plantas vão emergindo nos tratamentos com flúor.

Na rega tipo 2 (figura 20), a área específica da folha só mostrou diferenças significativas no período de 36 dias depois da sementeira em que o tratamento de 0,0 g/l de NaF teve menor valor em relação ao do 4,0 g/l, comportamento que também pode ser atribuído a maior expansão da lâmina foliar sem um correspondente aumento da matéria seca das folhas (Lima, 2002, Souza *et al.*, 1999) com o aumento a concentração de NaF. A pequena diminuição que se registou (figura 20) pode ser resultante da diminuição da água no solo que conduz a uma diminuição da área foliar (Fitter e Hay, 1981).

#### 5.4.8 Razão da Área Foliar

O aumento da razão da área foliar, dimensão relativa do aparelho fotossintético (Atwell *et al.* 1999), ao longo do tempo na rega tipo 1 (figura 21), pode ser devida a uma boa condição hídrica (Sharp *et al.*, 1989) pois a planta nos seus estágios iniciais de vida apresenta um aumento progressivo da razão da área foliar (Evans, 1972) enquanto que na rega tipo 2 (figura 22) a razão da área foliar diminuiu ligeiramente ao longo do tempo o que se justifica pela redução da quantidade de água pois a expansão da folha é inibida (Meyer e Boyer, 1981; Matsuda e Riazi, 1981; Michelena e Boyer, 1982; Westgate e Boyer, 1985; citados por Sharp *et al.*, 1989).

Na rega do tipo 2 registaram-se diferenças significativas entre os tratamentos sendo que o tratamento 4,0 g/l de NaF apresentou maior valor que o tratamento 0,0 g/l de NaF (figura 22). Okano e Totsuka (1985), Darrall (1989) e Wolfenden e Mansfield (1991 citado por Cañas *et al.* 1997) justificam este aumento de razão da área foliar no tratamento 4,0 g/l NaF como sendo resultado do efeito da redução na eficiência da fotossíntese pelo poluente, que em parte é compensada por um aumento da área assimilatória, sugerindo que ocorre uma resposta adaptativa de crescimento nas plantas sujeitas a poluição. Este fenómeno ocorreu na rega tipo 1 em que nos dias 27 e 36 depois da sementeira verificou-se um aumento da área assimilatória. No dia 18 depois da sementeira não se registou um aumento da razão da área foliar no tratamento com flúor provavelmente devido ao início tardio da emergência. O aumento da área foliar tem sido considerado como um indicador de danos produzidos por poluentes (Wolfenden and Mansfield, 1991 citado por Cañas *et al.* 1997).

#### 5.4.9 Conteúdo de Água Foliar

O conteúdo da água foliar não variou significativamente entre os tratamentos quando efectuada a rega tipo 1 (figura 23) ou a rega do tipo 2 (figura 24), porém nos dois tipos de rega o flúor diminuiu o conteúdo de água foliar. Este resultado entra em conformidade com os resultados de Agrawal *et al.* (1991, citado por Mulgrew e Williams, 2000) que encontraram que o flúor reduzia a quantidade relativa de água em algumas espécies de plantas, devido à perda da capacidade de regulação da água pelos estomas e pelas partes epidérmicas da planta (Wolfenden and Mansfield, 1991, citados por Cañas *et al.*, 1997).

#### 5.4.10 Peso Específico da Folha

O peso específico da folha mostrou que o aumento da matéria seca da folha e o da área foliar não são proporcionais, entre os 18 e 27 dias depois da sementeira sob o tipo de rega 1 (figura 25). A área foliar aumenta mais que o peso da matéria seca da folha, conduzindo a um decréscimo do peso específico da folha.

No rega do tipo 2 (figura 26), ao longo dos períodos o peso específico da folha não variou significativamente mas registou-se um pequeno aumento como resultado da inibição da expansão da área foliar induzida pela escassez de água. O tratamento 4,0 g/l de NaF aos 27 e 36 dias depois da sementeira reduziu significativamente o peso específico da folha em relação ao tratamento 0,0 g/l de NaF, pois a síntese de matéria orgânica diminuiu pela acção do flúor e a área foliar aumentou para compensar o crescimento (Okano e Totsuka, 1985; Darrall, 1989; Wolfenden e Mansfield, 1991, citado por Cañas *et al.*, 1997). Comportamento idêntico foi registado na rega 1 aos 18 dias depois da sementeira confirmando que o flúor reduz o peso específico da folha.

## 6. CONCLUSÕES

O flúor aumenta a condutividade eléctrica e diminui a percentagem de matéria orgânica no solo.

A emergência das plantas é fortemente inibida pelo flúor, particularmente quando a disponibilidade de água é reduzida.

O flúor em *L. multiflorum* não afecta significativamente os pigmentos fotossintéticos mas reduz a quantidade de proteína total.

O flúor reduz a taxa de assimilação aparente, a razão do peso da raíz, o conteúdo de água foliar, o peso específico da folha e aumenta a área específica da folha e a razão da área foliar, particularmente quando há redução no fornecimento de água.

O flúor não afecta significativamente a taxa de crescimento relativo da planta, a taxa de crescimento absoluto da planta e a razão do peso seco do colmo.

## 7. RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se a realização de mais estudos de longo termo, sobre o efeito de poluentes em organismos vegetais, como forma de melhorar o conhecimento existente sobre os danos causados ao ambiente pelas indústrias.

Recomenda-se, igualmente, a medição dos parâmetros de humidade relativa, luz e temperatura em estudos semelhantes a este.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Arnesen A. K. M. (1997). Availability of fluoride to plants grown in contaminated soil. Plant and Soil. **191**: 126-136.

Ashmore, M. (1997). Plants and Pollution. In: Plant Ecology. Crawley, M. J. (editor). Second Edition, Blackwell Science, Oxford, pp 568-581.

Atwell, B., Kriedemann, P., Turnbull, C. (1999). Plants in Action. Macmillan Education Australia, Australia, 664pp.

Braen, S. N., Weinstein, L. H. (1985). Uptake of Fluoride and Aluminium by Plants Grown in Contaminated Soil. Water Air Soil Pollution. **24**: 215-225.

Brown, R. H. (1984). Growth of the Green Plant. In: Tesar, M. B. (editor). Physiological Basis of Crop Growth and Development. American Society of Agronomy, USA, 341pp.

Cañas, M. S., Carreras, H. A., Orellana L., Pignata M. L. (1997). Correlation Between Environmental Conditions and Foliar Chemical Parameters in *Ligustrum lucidum* Ait. Exposed to Urban Air Pollutants. Journal of Environmental Management. **49**:167-181.

Carreras, H.A. e Pignata, M.L. (2001). Comparison among air pollutants, meteorological conditions and some chemical parameters in the transplanted lichen *Usnea amblyoclada*. Environmental Pollution, **111**:45-52.

Carreras, H.A. e Pignata, M.L. (2002). Biomonitoring of Heavy Metal and Air Quality in Córdoba City, Argentina using Transplated Lichens. Environmental Pollution, **117**:77-87.

Carreras, H.A., Cañas M. S., Pignata M.L. (1996). Differences in Responses to Urban Air Pollutants by *Ligustrum lucidum* Ait. and *Ligustrum lucidum* Ait. F. *Tricolor* (Rehd.) Rehd. Environmental Pollution. **93**: 211-218.

Carreras, H.A., Gudiño G.L., Pignata M.L. (1998). Comparative biomonitoring of atmospheric quality in five zones of Córdoba city (Argentina) employing the transplanted lichen *Usnea sp.*. Environmental Pollution, **103**: 317-325.

Copeland, R. A. (1994). Methods for Protein Analysis: A practical Guide to Laboratory Protocols. Chapman & Hall, USA, 228pp.

Craker, L.E.; Seibert, M.; Clifford, J.T. (1983). Growth and development of radish (*Raphanus sativus* L.) under selected light environments. Annals of Botany. **51**: 59-76.

Cramer, G. R.; G. J. Alberico & C. Shimidt. (1994). Leaf Expansion Limits Dry Matter Accumulation of Salt Stressed Maize. Australia Journal Plant Physiology. **21**: 63-74

Cronin, S. J., Manoharan, V., Hedley, M. J., Loganathan, P. (2000). Fluoride: A Review of its Fate, Bioavailability, and Risks of Fluorosis in Grazed-Pasture Systems in New Zealand. New Zealand Journal of Agricultural Research. **43**: 295-321.

Darrall, N.M. (1989). The effect of air pollutants on physiological processes in plants. Abstract. Plant, Cell & Environment. **12**: 1-30.

Davison, A. W. (1983). Uptake, Transport and Accumulation of Soil and Airborne Fluorides by Vegetation. In: Shupe, J. L., Petersson, H. B., Leone, N. C. (editors). Fluorides – Effects on Vegetation, Animals and Humans. Paragon Press, Salt Lake City. UT.

Domingos, M., Klumpp, A., Klumpp, G. (1998). Air pollution impact on the Atlantic forest in the Cubatão region, SP, Brazil. General Articles, **54** : 230-236.

Domingos, M., Klumpp, A., Rinaldi, M.C.S., Modesto, I.F., Klumpp, G., Delitti, W.B.C. (2003). Combined effects of air and soil pollution by fluoride emissions on *Tibouchina pulchra* Cogn., at Cubatão, SE Brazil, and their relations with aluminium. Plant and Soil. **249**: 297-308.

Evans, G. C. (1972). Quantitative Analysis of Plant Growth. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 734 pp.

Feng, Y. W., Ogura, N., Feng, Z.W., Zhang, F. Z., Shimizu, H. (2003). The Concentrations and Sources of Fluoride in Atmospheric Depositions in Beijing, China. Water, Air, and Soil Pollution **145**: 95-107.

Fernandes, A., Lournert, E., Wild, H., (1971). Flora Zambesiaca. University Press Glasgow, Volume Ten, Part One.

Figueiredo, J. Q. (1994). Avaliação de Gramíneas Tropicais como Bioindicadoras da Presença de Flúor. Universidade Federal de Viçosa, Brazil, 87pp.

Fitter, A.H. & R.K.M. Hay. (1981). Environmental Physiology of Plants. New York, Academic press, 355pp.

Gardner, F. P., Pearce, R. B., Mitchell, R. L. (1994). Physiology of Crop Plants. First Edition, Iowa State University Press, USA, 208 pp.

Garnier, E. & G. Laurent. (1994). Leaf Anatomy Specific Mass and Water Content in Congeneric Annual and Perennial grass Species. New Phytol. **128**: 725 - 736.

Giannini J.; Miller G.W.; Pushnik J.C. (1985). Effects of NaF on Biochemical Processes of Isolated Soybean Chloroplasts. Abstract. Fluoride-Quart. Rep. **18**:72-79

Gisiger, L. (1968). The Solubility of Various Fluorine compounds in Soil. Fluoride. **1**: 21-25.

González, C M., Cassonovas, S. S., Pignata, M. L. (1996). Biomonitoring of Air Pollutants from Traffic and Industries Employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) May. and Flot. in Córdoba, Argentina. Environmental Pollution, **91**: 269-277.

González, C.M., Pignata, M.L. (2000). Chemical response of transplanted lichen *Canomaculina pilosa* to different emission sources of air pollutants . Environmental Pollution, **110** : 235-242.

Groff, A. M., Moraes' A., Sousana, J. F., Carvalho, P. C. F., Louault, F. (2002). Intervalo e intensidade de desfolhação nas taxas de crescimento, senescência e desfolhação e no equilíbrio de gramíneas em associação. Revista Brasileira de Zootecnia. Vol.31, nº5.

Haidouti, C. (1995). Effects of Fluoride on the Mobilization and Leaching of Aluminum in Soils. The Science of the Total Environment. **166**: 157-160.

Haidouti, C., Chronopoulou, A., Chronopoulos, J. (1993). Effects of Fluoride Emissions form Industry on Fluoride Concentration of Soils and Vegetation. Biochemical Systematics and Ecology. **21**: 195-208.

Horner, J. M., Bell, J. N. B. (1995). Effects of Fluoride and Acidity on Early Plant Growth. Agriculture, Ecosystems and Environment. **52**: 205-211.

Hunt, R. (1990). Basic Growth Analysis. Unwin Hyman, London, 112pp.

Kalopos, T.; Van der Boogarrd, R.; Lambers, H. (1996). Effect of Soil Drying on Growth, Biomass, Allocation and Leaf Gas Exchange of Two Annual Grass Species . Plant and Soil. **185** : 137-149.

Klumpp, A., Domingos, M., Klumpp, G. (1996). Assessment of the vegetation risk by fluoride emissions from fertilizers industries at Cubatão, Brazil . The Science of the Total Environmental, **192** : 219-228.

Larcher, W. (1995). Physiological Plant Ecology. Third Edition, Springer, Australia, 506pp.

Lima, J. S. (2002). Bioindicação, Biomonitoramento: Aspectos Bioquímicos e Morfológicos. Revista TecHoje. [www.techoje.com.br](http://www.techoje.com.br).

Loganathan, P., Hedley, M. J., Wallace, G.C., Roberts, A.H.C. (2001) Fluoride accumulation in pasture forages and soils following long-term applications of phosphorus fertilizers. Environmental Pollution. **115**: 275-282.

Lucero, D. W., Grieu, P., Guckert A. (1997). Effects of water deficit and plant interaction on morphological growth parameters and yield of white clover (*Trifolium repens* L.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.) mixtures. European Journal of Agronomy. **11**: 167-177.

Mirlean, N., Casartelli, M. R., Garcia, M. R. D. (2002). Propagação Da Poluição Atmosférica Por Flúor Nas Águas Subterrâneas E Solos De Regiões Próximas Às Indústrias De Fertilizantes (Rio Grande, Rs). Química Nova **25**: 191-195.

Moeri, P. B., Contat, F., Stadelmann, F. X. (1988). Metabolic changes in gladiolus due to airborne fluoride. Abstract. Journal of Fluorine Chemistry. **41**: 101-110.

Moura, J. M. C. (1957). Estação Agrária de Úbeluzi, INIA. 1pp.

Mulgrew, A., Williams, P. (2000). Biomonitoring of Air Quality Using Plants. WHO, Air hygiene report no. 10.

Okano, K., Totsuka T. (1985). Growth responses of plants to various concentrations of nitrogen dioxide. Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological. **38**:361-373.

Pignata M.L., Gudino G.L., Cañas M.S., Orellana L. (1999). Relationship between foliar chemical parameters measured in *Melia azedarach* L. and environmental conditions in urban areas. Science of the Total Environment. **244**: 85 -96.

Pignata, M.L., Gudiño, G.L., Wannaz, E.D., Plá, R.R., González, C.M., Carreras, H.A., Orellana L. (2002). Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor Environmental Pollution, **120**: 59–68.

Pombo, L. C. A. (1995). Absorção de Metais Pesados pelo Azavém (*Lolium multiflorum*) em dois Solos do Estado do Rio Grande do Sul. Pesquisa Agropecuária Brasileira. **30**:1217-1224.

Rai, K., Agarwal, M., Dass, S., Shrivastav, R. (2000). Fluoride: Diffusive mobility in soil and some remedial measures to control its plant uptake. Current Science. **79**: 1370-1373.

Sandrin, C. Z., Domingos, M., Ribeiro, R. C. L. F. (2002). Fructan accumulation in *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* "Lema" as indicator of urban air pollution. In: Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G. (editores). EuroBionet 2002 Conference on Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness. Institute for landscape and Plant Ecology of the University of Hohenheim, Germany, 60 pp.

Sharp, R. E., Davies, W.J. Davies (1989). Regulation of Growth and Development of Plants Growing with a Restrict Supply of Water. In: Jones, H. G., Flowers, T. J., Jones M. B. (editors). Plant Under Stress. Cambridge University Press, 257pp.

Silva, R. M.; Jablonski, A.; Siewerdt, L.; Júnior, P. S. (2000). Desenvolvimento das Raízes do Azevém Cultivado em Solução Nutritiva Completa, Adicionada de Substâncias Húmicas, sob Condições de Casa de Vegetação. Revista Brasileira de Zootecnia. Vol.29, nº6.

Singh, V., Gupta, M. K., Rajwanshi, P., Mishra, S., Srivastava, S., Srivastava, R., Srivastava, M. M., Prakash, S., Dass, S. (1995). Plant Uptake of Fluoride in Irrigation Water by Ladyfinger (*Abelmoschus esculentus*). Fd. Chem. Toxic. **33**: 399-402.

Smith, B. N., Lytle, C. M. (1997). Air Pollutants. In: Prasad, M.N.V. (editor). Plant Ecophysiology, John Wiley & Sons, inc., New York, 375-392 pp.

Sokal, R. R. & F. J. Rohlf. (1995). Biometry. 3rd edition. Freeman & Company, New York, 887pp.

Souza, J. R. P., Mehl, H. O., Rodrigues, J. D., Pedras, J. F. (1999). Sombreamento e o desenvolvimento e produção de rabanete. Scientia Agricola. vol.56 n.4.

Taiz, L., Zeiger, E. (1998). Plant Physiology. Second Edition, Sinauer Associates Inc., USA. 792pp.

VDI Verein Deutscher Ingenieure (2003). VDI 3957 Biological Measuring Techniques for the Determination and Evaluation of Effects of Air Pollutants on Plants (Bioindication)-Method of Standardized Grass Exposure. VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 1a, Blatt 3, Düsseldorf, Germany, 28pp.

Wannaz, E.D., Zygadlo, J.A., Pignata, M.L. (2003). Air Pollutants Effect on Monoterpenes Composition and Foliar Chemical Parameters in *Schinus areira* L .. The Science of the Total Environment. **305**: 177 –193.

Wareing, P. F., Phillips, I.D.J. (1970). The control of Growth & Differentiation in Plants. First Edition. Peargon Press Ltd., England, 303pp.

Wenzel, W. W., Blum, W. E. H. (1992) Fluorine speciation and mobility in F-contaminated soils. Soil Science. **153**:357-364.

Zar, J. H.(1996). Biostatistical analysis. 3rd edition. Prentice Hall, New Jersey, 662pp.

Zimmermann, R.-D., Wagner,G., Finck,M. (2000). Guidelines For The Use Of Biological Monitors In Air Pollution Control (Plants): Part I Methodological Guidance for the Drawing-up of Biomonitoring Guidelines (Plants). Report 12. WHO Collaborating Centre for Quality Management and Air Pollution Control at the Federal Environmental Agency. Berlin, Germany. 70 pp.

## ANEXO I

Dias Após Plantio	Rega Tipo I	Rega Tipo II
1	100 ml	50 ml
2		
3	100 ml	50 ml
4		
5	100 ml	50 ml
6		
7	100 ml	50 ml
8		
9	50 ml	25 ml
10		
11	50 ml	25 ml
12		
13	50 ml	25 ml
14		
15	50 ml	25 ml
16		
17	50 ml	25 ml
18		
19	50 ml	25 ml
20		
21	50 ml	25 ml
22		
23	50 ml	25 ml
24		
25	50 ml	25 ml
26		
27		
28	50 ml	25 ml
29		
30		
31	50 ml	25 ml
32		
33		
34	50 ml	25 ml
35		
36		