

**CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E  
FISIOLÓGICAS NA AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL BIOINDICADOR E  
FITORREMEIADOR DE *Pistia stratiotes* L. NA  
PRESENÇA DE CÁDMIO, CHUMBO E  
ARSÊNIO**

**CYNTHIA DE OLIVEIRA**

**2010**

**CYNTHIA DE OLIVEIRA**

**CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS NA  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOINDICADOR E  
FITORREMEDIADOR DE *Pistia stratiotes* L. NA PRESENÇA DE  
CÁDMIO, CHUMBO E ARSÊNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Cynthia de.

Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de cádmio, chumbo e arsênio / Cynthia de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2010.

163 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. Fitorremediação. 2. Bioindicação. 3. Metais pesados. 4. Alface d'água. 5. Anatomia vegetal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.64041

**CYNTHIA DE OLIVEIRA**

**CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS NA  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOINDICADOR E  
FITORREMEDIADOR DE *Pistia stratiotes* L. NA PRESENÇA DE  
CÁDMIO, CHUMBO E ARSÊNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2010.

Prof. João José Granate de Sá e Melo Marques PhD UFLA

Prof. Dr. Paulo Alexandre Monteiro de Figueiredo UNESP-DRACENA

Prof. Dr. José Donizeti Alves UFLA

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

*À Deus ofereço tudo o que tenho e o que sou..*

**"Quando uma criatura humana  
desperta para um grande sonho  
e sobre ela lança toda a força de sua alma,  
todo o universo conspira a seu favor."  
(Goethe)**

*Aos meus pais, Cida e Jesu, pelo amor e incentivo e  
ao meu irmão, Marcus, que sempre acreditou em mim*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por minha vida, por todos os dons que me foram dados e por mais esta oportunidade.

Aos meus pais, Cida e Jesu, por todo amor, dedicação, carinho, auxílio e constante incentivo aos estudos.

Ao meu irmão Marcus (sempre presente), pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos meus irmãos e sobrinhos pela colaboração e carinho.

Ao meu orientador, Professor Dr. Evaristo Mauro de Castro, pelo constante apoio, amizade, pelos valiosos ensinamentos, orientação, por toda confiança demonstrada e pelo exemplo de vida durante todo este tempo de aprendizado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e fomento ao trabalho, possibilitando sua condução.

À professora Janice Guedes de Carvalho e ao professor João José Granate de Sá e Melo Marques, pela co-orientação e por permitirem o acesso aos Laboratórios de Nutrição Mineral de Plantas e de Geoquímica Ambiental (DCS).

Aos membros da banca examinadora, Dr. Evaristo Mauro de Castro, Dr. Paulo Alexandre Monteiro de Figueiredo, João José Granate de Sá e Melo Marques PhD e ao Dr. José Donizeti Alves, pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal, pelos conhecimentos adquiridos.

Aos laboratoristas Dartagnan, Adalberto e João Gualberto, pela disponibilidade, atenção e auxílio.

Em especial ao Sílvio, Fabrício, Grazielle, Giuslan e à Lívia Botelho, pela grande amizade, por todas as ideias e conhecimentos passados e pela ajuda nas análises.

Às estagiárias: Samara, Renata, Mírian, Ana Luísa e Natália por todo o acompanhamento e auxílio nos trabalhos, e por todos os momentos divididos.

Às pós-graduandas dos laboratórios de Fisiologia Molecular e Nutrição e Metabolismo de Plantas (DBI), Kamila, Marilza e Aretusa, pela colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (DCS): Guilherme, Lívia Coelho e Viviane, pelas dicas e amizade.

Aos amigos Kamila, Marinês, André, Joyce, Dalíhia e Fabiane, por todo apoio, carinho e incentivo.

Aos colegas do setor de Fisiologia Vegetal, pela convivência e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela colaboração e troca de experiências.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	vi
RESUMO GERAL .....	vii
GENERAL ABSTRACT .....	ix
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral .....	2
2 Referencial Teórico.....	4
2.1 Contaminação por elementos-traço.....	4
2.1.1 Cádmio.....	5
2.1.2 Chumbo.....	6
2.1.3 Arsênio.....	7
2.2 Fitorremediação .....	8
2.3 Bioindicação .....	11
2.4 Plantas aquáticas .....	13
2.4.1 <i>Pistia stratiotes</i> L.....	14
2.5 Crescimento clonal .....	17
2.6 Anatomia radicular .....	17
2.7 Sistema antioxidante .....	18
2.7.1 Superóxido dismutase .....	18
2.7.2 Catalase.....	19
2.7.3 Peroxidase do ascorbato.....	19
3 Referências Bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2 - Potencial bioindicador de <i>Pistia stratiotes</i> L. sob concentrações crescentes de cádmio.....	26

1 Resumo .....	27
2 Abstract.....	28
3 Introdução .....	29
4 Material e Métodos .....	30
4.1 Obtenção do material vegetal .....	31
4.2 Instalação do Experimento.....	31
4.3 Crescimento clonal, número de estruturas reprodutivas e determinação da biomassa .....	33
4.4 Diagnose visual.....	34
4.5 Análise da bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de cádmio.....	34
4.6 Análise estatística .....	35
5 Resultados e Discussão.....	36
5.1 Crescimento clonal, número de estruturas reprodutivas, biomassa e diagnose visual.....	36
5.2 Bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de cádmio .....	40
6 Conclusões.....	46
7 Referências Bibliográficas.....	47
CAPÍTULO 3 – Respostas estruturais radiculares e atividade do sistema antioxidante de <i>Pistia stratiotes</i> L. sob concentrações de cádmio.....	49
1 Resumo .....	50
2 Abstract.....	51
3 Introdução .....	52
4 Material e Métodos .....	54

4.1 Coleta do material vegetal .....	54
4.2 Imposição dos tratamentos.....	54
4.3 Atividade das enzimas do sistema antioxidante.....	55
4.4 Anatomia radicular .....	57
4.5 Análise estatística .....	58
5 Resultados e discussão.....	59
5.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante.....	59
5.2 Anatomia radicular .....	63
6 Conclusões.....	70
7 Referências Bibliográficas .....	71
CAPÍTULO 4 – Uso de <i>Pistia stratiotes</i> L. como fitorremediadora da poluição por chumbo .....	74
1 Resumo .....	75
2 Abstract.....	76
3 Introdução .....	77
4 Material e Métodos .....	79
4.1 Obtenção do material vegetal .....	79
4.2 Instalação do Experimento.....	79
4.3 Crescimento clonal, número de estruturas reprodutivas e determinação da biomassa .....	80
4.4 Diagnose visual.....	81
4.5 Bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de chumbo .....	81
4.6 Análise estatística .....	82
5 Resultados e Discussão.....	83

5.1 Crescimento clonal, número de estruturas reprodutivas, biomassa e diagnose visual.....	83
5.2 Bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de chumbo .....	86
6 Conclusões.....	92
7 Referências Bibliográficas.....	93
CAPÍTULO 5 – Efeitos da concentração de chumbo sobre a estrutura radicular e sistema antioxidante de <i>Pistia stratiotes</i> L. ....	95
1 Resumo .....	96
2 Abstract.....	97
3 Introdução .....	98
4 Material e Métodos .....	100
4.1 Coleta do material vegetal .....	100
4.2 Imposição dos tratamentos.....	100
4.3 Atividade das enzimas do sistema antioxidante.....	101
4.4 Anatomia radicular .....	102
4.5 Análise estatística .....	103
5 Resultados e Discussão.....	105
5.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante.....	105
5.2 Anatomia radicular .....	109
6 Conclusões.....	114
7 Referências Bibliográficas.....	115
CAPÍTULO 6 – Potencial fitorremediador de <i>Pistia stratiotes</i> L. na presença de arsênio .....	118
1 Resumo .....	119
2 Abstract.....	120

3	Introdução .....	121
4	Material e Métodos .....	123
4.1	Obtenção do material vegetal .....	123
4.2	Instalação do Experimento.....	123
4.3	Crescimento clonal, número de inflorescências e determinação da biomassa .....	124
4.4	Sintomas visuais .....	124
4.5	Análise da bioconcentração e determinação do bioacúmulo, translocação e absorção de arsênio .....	125
4.6	Análise estatística .....	126
5	Resultados e Discussão.....	127
5.1	Crescimento clonal, número de inflorescências, biomassa e sintomas visuais .....	127
5.2	Bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de arsênio.....	130
6	Conclusão .....	136
7	Referências Bibliográficas.....	137
CAPÍTULO 7 – Anatomia radicular e atividade de enzimas antioxidantes de <i>Pistia stratiotes</i> L. sob concentrações de arsênio .....		
1	Resumo .....	140
2	Abstract.....	141
3	Introdução .....	142
4	Material e Métodos .....	144
4.1	Obtenção do material vegetal .....	144
4.2	Imposição dos tratamentos.....	144
4.3	Atividade das enzimas do sistema antioxidante.....	145

4.4 Anatomia radicular .....	147
4.5 Análise estatística .....	148
5 Resultados e Discussão .....	149
5.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante.....	149
5.2 Anatomia radicular .....	153
6 Conclusões.....	159
7 Referências Bibliográficas.....	160

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Introdução Geral.

FIGURA 1 *Pistia stratiotes* L. .... 16

CAPÍTULO 2: Potencial bioindicador de *Pistia stratiotes* L. sob concentrações crescentes de cádmio.

FIGURA 1 Rosetas de *Pistia stratiotes* L. .... 33

FIGURA 2 Crescimento clonal e número de estruturas reprodutivas de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de Cd na solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 38

FIGURA 3 Biomassa da raiz ( $\text{g.planta}^{-1}$ ), parte aérea e total de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de Cd na solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 39

FIGURA 4 Plantas de *Pistia stratiotes* submetidas a doses crescentes de Cádmio ..... 40

FIGURA 5 Concentrações acumuladas de Cd em *Pistia stratiotes* ( $\mu\text{g de Cd .g}^{-1}$  MS) nas diferentes concentrações de Cd em solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 42

FIGURA 6 Bioacúmulo de Cd em *Pistia stratiotes* ( $\mu\text{g . planta}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de Cd em solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 43

FIGURA 7 Eficiência na translocação de Cd (%) em *Pistia stratiotes* nas diferentes concentrações de Cd em solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 44

FIGURA 8 Eficiência das raízes de *Pistia stratiotes* na absorção de Cd ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de Cd em solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 45

CAPÍTULO 3: Respostas estruturais radiculares e atividade do sistema antioxidante de *Pistia stratiotes* L. sob concentrações de cádmio.

FIGURA 1 Rosetas de *Pistia stratiotes* submetidas aos tratamentos ..... 55

FIGURA 2	Atividade da enzima SOD (unidade de SOD g.MF <sup>-1</sup> ) do sistema radicular e de folhas de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Cd em solução (mg.L <sup>-1</sup> ) .....	59
FIGURA 3	Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$ ) do sistema radicular e de folhas de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Cd em solução (mg.L <sup>-1</sup> ) .....	60
FIGURA 4	Atividade da enzima APX ( $\mu\text{mol ascorbato}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) do sistema radicular e de folhas de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Cd em solução (mg.L <sup>-1</sup> ) .....	62
FIGURA 5	Fotomicrografia de secção transversal da zona pilífera da raiz de <i>Pistia stratiotes</i> .....	64
FIGURA 6	Espessura ( $\mu\text{m}$ ) de tecidos radiculares de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Cd em solução (mg.L <sup>-1</sup> ) .....	65
FIGURA 7	Fotomicrografia de secções transversais da zona pilífera de raízes de <i>Pistia stratiotes</i> sob a contaminação por Cd .....	66
FIGURA 8	Fotomicrografia de secções transversais da zona pilífera de raízes de <i>Pistia stratiotes</i> sob a contaminação por Cd .....	67
FIGURA 9	Proporção de aerênquimas no córtex radicular de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Cd em solução (mg.L <sup>-1</sup> ) .....	68
FIGURA 10	Fotomicrografia de secções transversais da zona pelífera de raízes de <i>Pistia stratiotes</i> sob a contaminação por Cd .....	69
CAPÍTULO 4: Uso de <i>Pistia stratiotes</i> L. como fitorremediadora da poluição por chumbo.		
FIGURA 1	Crescimento clonal e número de estruturas reprodutivas de <i>Pistia stratiotes</i> , em função da concentração de Pb na solução (mg.L <sup>-1</sup> ) .....	84
FIGURA 2	Biomassa da raiz (g.planta <sup>-1</sup> ), parte aérea e total de <i>Pistia stratiotes</i> , em função da concentração de Pb na solução (mg.L <sup>-1</sup> ) .....	85

FIGURA 3 Plantas de <i>Pistia stratiotes</i> submetidas a doses crescentes de Chumbo .....	86
FIGURA 4 Concentrações acumuladas de Pb em <i>Pistia stratiotes</i> ( $\mu\text{g}$ de Pb . $\text{g}^{-1}$ MS) .....	88
FIGURA 5 Bioacúmulo de Pb em <i>Pistia stratiotes</i> ( $\mu\text{g}$ . $\text{planta}^{-1}$ ) .....	89
FIGURA 6 Eficiência na translocação de Pb em <i>Pistia stratiotes</i> .....	90
FIGURA 7 Eficiência das raízes de <i>Pistia stratiotes</i> na absorção de Pb ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de Pb em solução ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) .....	91
CAPÍTULO 5: Efeitos da concentração de chumbo sobre a estrutura radicular e sistema antioxidante de <i>Pistia stratiotes</i> L.	
FIGURA 1 Atividade da enzima SOD (unidade de SOD $\text{g} \cdot \text{MF}^{-1}$ ) do sistema radicular e de folhas de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Pb ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) .....	106
FIGURA 2 Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína}$ ) do sistema radicular e de folhas de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Pb ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) .....	107
FIGURA 3 Atividade da enzima APX ( $\mu\text{mol ascorbato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ MF) do sistema radicular e de folhas de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Pb ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) .....	108
FIGURA 4 Espessura ( $\mu\text{m}$ ) de tecidos radiculares de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Pb ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) .....	110
FIGURA 5 Fotomicrografia de secções transversais da zona pilífera de raízes de <i>Pistia stratiotes</i> sob a contaminação por Pb .....	111
FIGURA 6 Fotomicrografia de secções transversais da zona pilífera de raízes de <i>Pistia stratiotes</i> sob a contaminação por Pb .....	111
FIGURA 7 Proporção de aerênquimas no córtex radicular de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de Pb ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) .....	112

FIGURA 8 Fotomicrografia de secções transversais de raízes de *Pistia stratiotes* sob a contaminação por chumbo ..... 113

CAPÍTULO 6: Potencial fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de arsênio.

FIGURA 1 Crescimento clonal e número de estruturas reprodutivas de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de Pb na solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 128

FIGURA 2 Biomassa da raiz ( $\text{g.planta}^{-1}$ ), parte aérea e total de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de As na solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 129

FIGURA 3 Plantas de *Pistia stratiotes* submetidas a doses crescentes de Pb ..... 130

FIGURA 4 Concentrações acumuladas de As em *Pistia stratiotes* ( $\mu\text{g de As g}^{-1}$  MS) nas diferentes concentrações de As em solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 131

FIGURA 5 Bioacúmulo de As em *Pistia stratiotes* ( $\mu\text{g . planta}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de As em solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 133

FIGURA 6 Eficiência na translocação de As (%) em *Pistia stratiotes* nas diferentes concentrações de As em solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 134

FIGURA 7 Eficiência das raízes de *Pistia stratiotes* na absorção de As ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de As em solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 135

CAPÍTULO 7: Anatomia radicular e atividade de enzimas antioxidantes de *Pistia stratiotes* L. sob concentrações de arsênio

FIGURA 1 Atividade da enzima SOD (unidade de SOD  $\text{g.MF}^{-1}$ ) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de As ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 150

FIGURA 2 Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{proteína}$ ) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de As ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ..... 151

FIGURA 3 Atividade da enzima APX ( $\mu\text{mol ascorbato}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) do sistema radicular e de folhas de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de As ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) .....	152
FIGURA 4 Espessura ( $\mu\text{m}$ ) de tecidos radiculares de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de As ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) .....	154
FIGURA 5 Fotomicrografia de secções transversais de raízes de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de arsênio .....	155
FIGURA 6 Fotomicrografia de secções transversais de raízes de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de arsênio .....	155
FIGURA 7 Proporção de aerênquimas no córtex radicular de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de As ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) .....	157
FIGURA 8 Fotomicrografia de secções transversais de raízes de <i>Pistia stratiotes</i> sob concentrações crescentes de arsênio .....	158

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: Potencial bioindicador de *Pistia stratiotes* L. sob concentrações crescentes de cádmio.

TABELA 1 Concentração de Cd na solução para cada tratamento ..... 32

CAPÍTULO 4: Uso de *Pistia stratiotes* L. como fitorremediadora da poluição por chumbo.

TABELA 1 Concentração de Pb na solução para cada tratamento ..... 80

CAPÍTULO 6: Potencial fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de arsênio.

TABELA 1 Concentração de As na solução para cada tratamento ..... 124

## RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Cynthia de. **Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de cádmio, chumbo e arsênio.** 2010. 163p. (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O intenso desenvolvimento das atividades industriais e agrícolas tem contribuído de maneira significativa para o aumento da poluição ambiental por elementos traço, em que os ecossistemas aquáticos têm sido altamente impactados, podendo limitar a utilização de recursos hídricos. Entre os poluentes de maior periculosidade liberados em ecossistemas aquáticos por meio de efluentes industriais, encontram-se os elementos-traço cádmio (Cd), chumbo (Pb) e arsênio (As), que podem ser prontamente introduzidos na cadeia trófica, representando alta toxicidade à saúde de animais e seres humanos. A fitorremediação tem sido indicada como uma técnica eficiente de recuperação de ambientes aquáticos a baixo custo, a fim de reduzir os impactos gerados por esses poluentes. Diversas plantas aquáticas têm sido utilizadas tanto em programas de fitorremediação, como no biomonitoramento da poluição por elementos-traço, devido à sua tolerância e capacidade de absorção e acúmulo de substâncias inorgânicas presentes nesses sistemas, o que é possibilitado devido às estratégias e mecanismos desenvolvidos contra a fitotoxicidade desses elementos, sendo variável entre as diferentes espécies e para diferentes substâncias. Por isso, tornam-se necessários estudos visando o conhecimento da potencial tolerância dessas plantas a esses poluentes, a fim de que sejam futuramente utilizadas como filtros biológicos em ambientes aquáticos contaminados. Nessa perspectiva, objetivou-se avaliar o comportamento da espécie *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Cd, Pb e As, por meio de análises populacionais, sintomas visuais, estrutura interna radicular, atividade de enzimas do sistema antioxidante e o teor, acúmulo, translocação e absorção dos elementos-traço, visando a indicação desta espécie para programas de biomonitoramento e fitorremediação de efluentes contaminados pelos elementos estudados. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Universidade Federal de Lavras, onde as plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland & Arnon 40% e submetidas a diferentes concentrações dos elementos-traço, separadamente. Foram realizadas análises dos teores acumulados dos elementos-traço por meio de absorção atômica, análises anatômicas radiculares em microscopia de luz, avaliação do crescimento clonal e

---

\* Comitê Orientador: Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Orientador), Janice Guedes de Carvalho – UFLA e João José Granate de Sá e Melo Marques - UFLA

da biomassa e a atividade das enzimas do sistema antioxidante peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Os sintomas visuais foram analisados *in situ* e registrados por meio de fotografias. Conforme os resultados, a espécie *P. stratiotes* concentrou teores consideráveis de Cd, Pb e As em seus tecidos, porém na presença de Cd foram observados efeitos de toxidez como clorose nas maiores concentrações. A ação combinada das enzimas do sistema antioxidante e alterações estruturais como espessamento de epiderme, exoderme e endoderme, foram detectadas nas raízes de *P. stratiotes* de acordo com o aumento da concentração dos elementos estudados em solução, funcionando como estratégias adaptativas que permitem a tolerância da espécie a estes elementos. Portanto, *P. stratiotes*, pode ser utilizada no biomonitoramento de ambientes aquáticos contaminados por Cd, pela facilidade de detecção dos efeitos de toxidez causados por este elemento, além de apresentar potencial promissor na utilização em programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por Pb e As.

**Palavras – chave:** fitorremediação, biomonitoramento, metal pesado, alface d'água, poluição ambiental, morfoanatomia, sistema antioxidante.

## GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, Cynthia de. **Morphoanatomical and physiological characteristics in the evaluation of the bioindicator and phytoremediator potential of *Pistia stratiotes* L. in the presence of cadmium, lead and arsenic.** 2010. 163p. (Master in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

The intensive development of industrial and agricultural activities have contributed significantly to the increase in environmental pollution by trace elements, where aquatic ecosystems have been highly affected, restricting the use of water resources. Among the most hazardous pollutants released into aquatic ecosystems through industrial effluents are the trace elements cadmium (Cd), lead (Pb) and arsenic (As), which can be readily introduced in the food chain, representing high toxicity to animal and human health. Phytoremediation has been indicated as an effective, low cost technique to recover aquatic environments in order to reduce the impact of these pollutants. Several aquatic plants have been used both in phytoremediation as well as the biomonitoring of pollution by trace elements due to the plant tolerance and their capacity to absorb and accumulate inorganic substances present in these systems. This is made possible due to the strategies and mechanisms developed against phytotoxicity of these elements, that is variable among different species and different substances. Therefore studies on potential plant tolerance to these pollutants becomes necessary, so that in the future they can be used as biological filters in contaminated aquatic environments. From this perspective, the objective was to evaluate the behavior of the *Pistia stratiotes* specie under increasing concentrations of Cd, Pb and As. This was conducted through the analysis of population, visual symptoms, internal root structure, antioxidant enzyme activity system and content, accumulation, translocation and absorption of trace elements, seeking an indication of this species for biomonitoring programs and phytoremediation of effluents contaminated by the elements studied. The experiments were conducted in a greenhouse at the Federal University of Lavras, where plants were grown in 40% Hoagland & Arnon nutrient solution which were previously and individually exposed to different concentrations of the three trace elements. Trace element accumulation analyses were made by atomic absorption, the root anatomical analysis under light microscopy. The growth and biomass, and the ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) antioxidant enzyme activity

---

\* Guidance Committee: Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Adviser), Janice Guedes de Carvalho – UFLA and João José Granate de Sá e Melo Marques – UFLA

were assessed. Visual symptoms were analyzed *in situ* and register by photography. According to results, the species *P. stratiotes* concentrated considerable levels of Cd, Pb and As in its tissues. However, toxic effects such as chlorosis were observed at the higher Cd concentrations. The considered effects of antioxidant system enzymes and structural alterations such as the thickening of epidermis, exodermis and endodermis were detected in the roots, according to the increase solution concentration of the studied elements. These alterations function as adaptive strategies which permit species tolerance to these elements. Therefore, *P. stratiotes* can be utilizing in the Cd contaminated aquatic environments, due to its facility in the detection of toxic effects caused by this element. Furthermore, this species presents promise potential to be used in phytoremediation programs of Pb and As contaminated aquatic environments.

**Key-words:** phytoremediation, biomonitoring, heavy metal, water lettuce, environmental pollution, morphoanatomy, antioxidant system.

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

Em decorrência da ação antrópica, cada vez mais intensa devido à alta demanda por produtos industrializados para o suprimento das necessidades da crescente população, os ecossistemas aquáticos têm sido impactados de diversas maneiras, o que pode limitar a utilização dos recursos hídricos, afetando todos os seres vivos.

Entre as atividades responsáveis por estas alterações, destacam-se o uso inadequado de fertilizantes e pesticidas, bem como o aumento das atividades mineradoras e industriais (Melo et al., 2009). Esta grande dependência tecnológica tem ocasionado a constante liberação de grande quantidade de poluentes no ambiente aquático.

Os elementos-traço cádmio (Cd), chumbo (Pb) e arsênio (As) são exemplos destes poluentes. Dessa forma, ocorre entrada destes elementos bioacumulativos na cadeia trófica, podendo ainda representar alta toxicidade sobre a biota aquática (Zhou et al., 2008).

A recuperação dos ecossistemas aquáticos contaminados pode ser realizada por processos químicos, físicos ou biológicos. Os agentes químicos responsáveis pela precipitação e redução, e agentes físicos como membranas artificiais, são tecnologias de alto custo, que podem ainda gerar resíduos de difícil eliminação. O método biológico, que utiliza plantas para a retirada de contaminantes da água, a fitorremediação, tem se mostrado uma alternativa eficiente e de baixo custo (Suñe et al., 2007).

Para a implantação de um sistema de fitorremediação é necessária a identificação de plantas que desempenhem de forma eficaz a função fitorremediadora, justificando-se o estudo do comportamento das espécies frente à contaminação por diferentes elementos. Para que uma espécie seja considerada fitorremediadora, ela deve atender a alguns requisitos, tais como fácil aquisição

e multiplicação, tolerância aos poluentes e alta produção de biomassa. Por outro lado, se determinada espécie for capaz de extrair os poluentes, mas não de se desenvolver adequadamente, apresentando sintomas de toxicidade, ela pode ser utilizada no biomonitoramento da poluição destes sistemas, pelas mudanças biológicas nela ocorridas ou pela substância química por ela absorvida e acumulada (Zhou et al., 2008).

Em geral, as plantas aquáticas são indicadas para estudos de bioindicação por exibirem características vantajosas a este tipo de avaliação, como alta tolerância a elementos-traço, facilidade de manipulação em laboratórios e por permitirem a visualização de sintomas causados pela toxicidade dos poluentes ou por acúmulo dos mesmos (Zhou et al., 2008).

A espécie *Pistia stratiotes* L. tem sido utilizada e indicada para remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e sólidos suspensos na água, melhorando a qualidade dos sistemas aquáticos (Lu et al., 2010), e indicada como bioacumuladora de cromo (Maine et al., 2004), demonstrando seu potencial uso como fitorremediadora, contribuindo para a melhoria da qualidade da água.

Nesta perspectiva, o trabalho teve por objetivo avaliar o potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes* submetida à contaminação por Cd, Pb e As. Foram analisados dados populacionais, sintomas visuais, estrutura interna radicular, atividade de enzimas do sistema antioxidante e o teor, acúmulo, translocação e absorção dos elementos-traço, visando à indicação desta espécie para programas de biomonitoramento e/ou fitorremediação de efluentes contaminados pelos elementos estudados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Contaminação por elementos-traço

Embora o termo elemento-traço ainda não tenha definição precisa, tem sido utilizado em ciências biológicas para denominar elementos químicos que ocorrem em organismos vivos em concentrações menores do que  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  (0,1%), em analogia à sua denominação geoquímica, a qual indica elementos presentes na crosta terrestre em concentrações semelhantes. No entanto, nem sempre um elemento considerado traço em biologia, é também considerado em geoquímica, como por exemplo, o ferro (Fe), que apresenta-se na superfície terrestre em concentrações muito superiores às encontradas em materiais biológicos (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007). A designação elemento-traço em biologia abrange, portanto, os metais pesados, que são aqueles que possuem densidade atômica superior a  $6 \text{ g.cm}^3$  (Gardea-Torresdey et al., 2005) como o cádmio (Cd) e o chumbo (Pb), bem como metaloides, como o arsênio (As). Estes são elementos não-essenciais aos seres vivos, porém elementos essenciais como o manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e ferro (Fe) também fazem parte deste grupo de elementos (Padmavathiamma & Li, 2007).

A contaminação de ambientes aquáticos por elementos-traço tem sido considerada um sério problema ambiental (Maine et al., 2004; Miretzky et al., 2006; Mishra & Tripathi, 2008), pois além de inviabilizar o uso de recursos hídricos, aumenta o risco de entrada destes elementos bioacumulativos na cadeia trófica (Oliveira et al., 2001; Melo et al., 2009).

Estes elementos são introduzidos em ecossistemas naturais por meio da ação humana, como resultado de diferentes atividades industriais e agrícolas, ou por causas naturais devido à ação de intemperismo sobre rochas que os contêm (Gabos et al., 2009). Efluentes industriais provenientes de atividades como fundição, mineração, galvanoplastia, produção de cerâmica e vidro, bem como

resíduos da indústria têxtil, são fontes comuns de contaminação de corpos d'água com metais e metalóides traço (Keskinan et al., 2003). Outras atividades antrópicas como a utilização de pesticidas e herbicidas na agricultura também têm sido indicadas como causadoras de impactos ambientais a ecossistemas aquáticos, por meio da contaminação por elementos-traço (Melo et al., 2009).

Águas residuais contendo elementos-traço solúveis sob a forma de íons devem ser tratadas antes de serem lançadas no ambiente, bem como os corpos d'água poluídos por estes elementos devem ser depurados, com o intuito de evitar riscos à saúde humana e animal (Espinoza-Quiñones et al., 2009). Com este objetivo, vários estudos com plantas aquáticas têm sido realizados, para que possam ser utilizadas na remediação de ecossistemas aquáticos, evitando o fluxo destes elementos na cadeia alimentar (Peng et al., 2008).

### **2.1.1 Cádmió (Cd)**

O elemento-traço cádmio (Cd) está entre os metais potencialmente mais perigosos para a biosfera, apresentando-se na superfície terrestre na concentração média de 0,1 a 0,2 mg.kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007), cujo valor máximo permitido (VMP) de Cd total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce é de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de Cd (Brasil, 2005).

Este é um elemento não-essencial introduzido no ambiente por meio de incineração, descarte de produtos residuais de indústrias metalúrgicas e mineradoras, e principalmente como subproduto de fertilizantes fosfatados (Toppi et al., 2007).

O Cd é considerado como um dos metais mais ecotóxicos, por provocar efeitos adversos sobre processos biológicos de animais, plantas e seres humanos, sendo ainda um elemento bioacumulativo. A contaminação de cádmio em humanos e animais se dá principalmente por alimentos e água contaminadas com este metal, causando diversos problemas como dano renal, hipertensão,

enfisema, baixa função reprodutiva, deformação da estrutura óssea devido ao efeito prejudicial ao metabolismo do cálcio, e em casos mais graves alterações cancerígenas (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007).

Embora não seja essencial às plantas, os íons de Cd são prontamente absorvidos pelas raízes e translocados para a parte aérea, afetando o crescimento, processos fotossintéticos e a absorção de nutrientes (Misra & Tripathi, 2008).

De forma geral, o efeito do Cd em plantas é o enrolamento e clorose nas folhas e redução no crescimento, podendo ocorrer ainda inibição da atividade de diversas enzimas, como a da redutase do nitrato, ou ocasionando ainda danos ao aparelho fotossintético e inibindo a fosforilação oxidativa mitocondrial. Por outro lado, o Cd pode inibir ou estimular a atividade de várias enzimas antioxidantes (Toppi & Gabbrielli, 1999).

### **2.1.2 Chumbo (Pb)**

O Pb é um dos poluentes ambientais mais conhecidos, por sua persistência no ambiente e por seu efeito nocivo aos ecossistemas e à saúde humana. No entanto, o Pb é considerado também um metal de grande utilidade, sendo empregado de diversas maneiras nos processos industriais. A concentração média deste metal encontrada na crosta terrestre é de 15 mg.kg<sup>-1</sup>, o que o coloca entre os elementos-traço relativamente mais abundantes (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007). Seu VMP total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce é de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (Brasil, 2005).

As principais fontes de poluição por Pb são em decorrência de suas aplicações, como resíduos de indústrias mineradoras, siderúrgicas, aeronáuticas, têxteis, de fundição, refinarias de petróleo, de material fotográfico, vidros, cerâmicas e explosivos, pelo uso do metal em revestimento e acabamento, uso de compostos que o contêm como fertilizantes e pesticidas e como aditivos em

tintas e gasolina, além de baterias (Sharma & Dubey, 2005; Lalhruaitluanga et al., 2010). Desta forma, o metal traço pode ser lixiviado para a superfície e por meio de fluxos de água, contaminar o solo e ecossistemas aquáticos (Sharma & Dubey, 2005).

O Pb é um elemento-não essencial ao seres humanos, plantas e animais, de fácil bioacumulação em ambientes aquáticos, podendo ser prontamente introduzido na cadeia trófica (Kabata-Pendias, 2004; Bi et al., 2010).

Em humanos, a contaminação com Pb pode causar doenças crônicas no sistemas renal e nervoso, com potencial cancerígeno (Bi et al, 2010). Na água para consumo humano, mesmo em baixas concentrações, o Pb pode desencadear anemia, encefalopatia e hepatite, podendo ainda ser acumulado nos músculos e ossos (Lalhruaitluanga et al., 2010).

Nas plantas, o excesso deste elemento pode causar o aparecimento de cloroses, o escurecimento das raízes e a diminuição do crescimento, devido a inibição da fotossíntese, modificações hormonais e interferir na regulação da nutrição mineral (Romeiro et al., 2007).

### **2.1.3 Arsênio (As)**

O As é um metaloide amplamente distribuído no ambiente, cujos níveis médios encontrados na crosta terrestre e nos rios são de 0,5 a 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> e 0,11 a 9,4 µg.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Kabata-pendias & Mukherjee, 2007). É um elemento não essencial e tóxico às plantas e animais, podendo colocar em risco à vida dos seres humanos. Sua incorporação na cadeia alimentar se dá principalmente por meio da absorção pelas plantas e contaminação da água (Zhao et al., 2009).

A contaminação de ambientes aquáticos por arsênio tem origem por meio da ação antrópica ou pela liberação de altos níveis deste elemento por processos naturais. Entre as fontes de contaminação, destacam-se aquelas

ocasionadas pela atividade humana, via aplicação de produtos agrícolas ou de rejeitos de mineração (Folkes et al., 2001; Melo et al., 2009). Alguns insumos agrícolas contêm compostos como o arsenato de chumbo ( $PbHAsO_4$ ) e o arsenato de cálcio ( $CaAsO_4$ ), que são facilmente lixiviados para os corpos d'água (Calzada et al., 1998). Os rejeitos da atividade mineradora, por meio da drenagem ácida, incorporam vários elementos tóxicos, como o arsênio, o cádmio, o chumbo e o mercúrio, contaminando o meio ambiente, principalmente os aquáticos (Mello et al., 2006), o que torna a mineração altamente impactante.

Os altos níveis de As originados por processos naturais são provenientes da lixiviação de resíduos minerais liberados pela ação do intemperismo de rochas magmáticas e sedimentares (Melo et al., 2009).

A toxicidade de As em plantas pode resultar em interrupção do fluxo energético entre as células, por este elemento competir com o elemento fósforo (P), devido às suas semelhanças químicas (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007).

## **2.2 Fitorremediação**

A recuperação dos ecossistemas aquáticos contaminados pode ser realizada por processos químicos, físicos, tidos como convencionais, ou por meio de técnicas alternativas, como o método biológico (Keskinkan et al., 2003).

As técnicas de biorremediação no tratamento de resíduos tóxicos são, em geral, menos onerosas, do ponto de vista econômico, do que os métodos tradicionais de tratamento de resíduos como destruição catalítica, adsorção por membranas, complexação, oxidação ou redução, precipitação, filtração, coagulação, evaporação e incineração (Singh & Fulekar, 2010). Além disso, as técnicas convencionais demandam alto consumo de reagentes e energia, possuem baixa seletividade provocando perdas na diversidade de organismos, além de serem responsáveis pela geração de resíduos de difícil descarte

(Lalhruaitluanga et al., 2010), o que não é atribuído aos processos alternativos de remediação por técnicas biológicas (Espinoza-Quiñones et al., 2008).

Entre as técnicas de biorremediação está a fitorremediação, processo o qual utiliza plantas e organismos a elas associados para a remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos do ambiente, processo que tem sido indicado como eficiente e de baixo custo, podendo ser aplicado a grandes áreas (Suñe et al., 2007). Outra vantagem que é atribuída à fitorremediação, é por esta ser considerada uma tecnologia 'limpa', por utilizar vegetais para a retirada de contaminantes, não prejudicando outros organismos presentes nesses sistemas (Pilon-Smith, 2005), sendo, portanto, um método ecologicamente viável.

A fitorremediação pode ser realizada por meio de diferentes processos como degradação do poluente na própria planta ou na rizosfera, que neste caso não se aplica aos poluentes inorgânicos, ou por mecanismos como o de fitoextração em que os poluentes são absorvidos e acumulados nas plantas. Outros processos como a fitoestabilização que reduz a biodisponibilidade dos contaminantes, a fitovolatilização dos poluentes, e a fitoestimulação da biorremediação por outros organismos também são consideradas respostas fitorremediadoras (Salt et al., 1998; Pilon-Smith, 2005).

No entanto, a técnica de fitorremediação também apresenta algumas limitações tais como a necessidade da biodisponibilização dos poluentes e a dificuldade na escolha de espécies fitorremediadoras, as quais devem possuir raízes capazes de alcançar estas substâncias e serem tolerantes às mesmas, estando ainda sujeitas à ação dos fatores edafo-climáticos, que devem permitir o seu crescimento e desenvolvimento adequados. Além disso, o processo de fitorremediação é geral, considerado um tratamento de longo prazo, possuindo outros complicadores como a necessidade de remoção da biomassa extratora dos contaminantes, no intuito de que estes não sejam repassados a cadeia trófica, e o

possível impedimento à introdução de vegetais em locais com elevadas taxas de contaminação (Pires et al., 2003).

Apesar da existência dessas limitações, os efeitos benéficos da técnica de fitorremediação a tornam um método alternativo que oferece boas perspectivas. Porém, esta técnica ainda requer pesquisas multidisciplinares para a identificação de espécies com possibilidade para utilização em projetos de descontaminação de solos e ambientes aquáticos, visando à superação das restrições existentes (Wolff et al., 2009).

Portanto, anteriormente à implantação de programas de fitorremediação, é necessária a escolha de plantas que apresentem maior potencial fitorremediador, utilizando-se algumas características indicativas para a seleção como capacidade de absorção, acumulação e/ou metabolização e tolerância ao poluente, alta taxa de crescimento e produção de biomassa, que permita uma fácil colheita, quando for necessária a remoção da planta da área contaminada, resistência a pragas e doenças, seja de fácil aquisição ou multiplicação de propágulos e que tenha capacidade de desenvolver-se em ambientes diversificados. Além da seleção prévia da espécie a ser utilizada, é essencial que todos os fatores negativos às plantas fitorremediadoras sejam controlados ou corrigidos, para que elas possam expressar seu máximo potencial de remediação (Salt et al., 1998; Pires et al., 2003).

Porém é válido ressaltar que dificilmente uma espécie terá todas essas características agrupadas, contudo deverá ser selecionada aquela que reunir o maior número de pré-requisitos possíveis (Wolff et al., 2009).

Diversas plantas são capazes de acumular poluentes, em que a concentração final dos mesmos em seus órgãos, é maior do que no meio contaminado, o que é possível devido às estratégias e mecanismos desenvolvidos contra a fitotoxicidade desses elementos. Por isso, tornam-se necessários estudos visando o conhecimento da potencial tolerância destas

plantas a estas substâncias, a fim de que sejam futuramente utilizadas como filtros biológicos para ambientes aquáticos contaminados (Miretzky et al., 2004).

### **2.3 Bioindicação**

A análise da matriz ambiental tem sido amplamente utilizada com o intuito de se obter informações sobre os níveis de poluição de um determinado local, processo conhecido como monitoramento ambiental. De forma análoga à remediação, o monitoramento da poluição ambiental também pode ser realizado por meio de técnicas físicas, químicas e biológicas (Niemi & McDonald, 2004).

A técnica de biomonitoramento pode ser empregada isoladamente ou como alternativa complementar a outras técnicas em programas de monitoramento da poluição ambiental, permitindo o melhor entendimento das relações ecológicas envolvidas no processo. Porém, tem sido bastante utilizada de maneira isolada, por apresentar diversas vantagens sobre análises químicas e físicas, sendo capazes de integrar flutuações das concentrações de poluentes, por meio do tempo, além de acompanhar o aumento destas concentrações por meio da bioacumulação. Outras vantagens seriam o baixo custo, praticidade e a precisão das análises, pela alta sensibilidade do método que proporciona a detecção de poluentes próximos ao limite mínimo de detecção de outros métodos (Azevedo et al., 2009).

O biomonitoramento é uma técnica científica de avaliação da poluição ambiental por meio da análise de marcadores refletidos pelos organismos indicadores, quando expostos aos poluentes. Os marcadores utilizados nessa técnica podem ser a própria substância poluente acumulada, ou alterações por eles causadas nos organismos (Niemi & McDonald, 2004).

Desta forma, a bioindicação por meio do biomonitoramento, pode oferecer informações sobre potenciais e reais efeitos de toxicidade dos poluentes

e demonstrar efeitos deletérios por eles ocasionados no ambiente (Zhou et al., 2008).

São considerados indicadores ambientais e ecológicos de poluição, ou bioindicadores, organismos ou populações que sejam capazes de responder a agentes químicos, físicos ou biológicos com características mensuráveis em sua estrutura, composição ou função. Portanto, suas principais funções são as de detectar e responder à perturbação ambiental seja ela de origem natural ou por ação antrópica (Niemi & McDonald, 2004).

Os bioindicadores podem ser classificados de acordo com seus mecanismos de identificação da poluição, podendo ser caracterizados como bioindicadores de acumulação, aqueles capazes de acumular concentrações relativamente elevadas do poluente, sem que o indivíduo seja lesado, ou como bioindicadores de reação, em que neste caso o indivíduo possui susceptibilidade ao poluente, apresentando alterações em sua morfologia, citologia, entre outras (Wolff et al., 2009).

Portanto, as características esperadas de um bom bioindicador são: alto potencial de acúmulo de poluentes sem que ocorra morte, disponibilidade de repetições para amostragem, o que exige abundância de indivíduos no local contaminado, ciclo de vida longo para que possibilite comparações entre diferentes idades, altas taxas de propagação em laboratório e capacidade de se manter vivo em ambiente aquático. Além disso, um indicador ecológico de poluição deve ainda ocupar posições iniciais na cadeia trófica, apresentar relação dose-efeito de fácil visualização e permitir a análise microscópica de danos em seus tecidos e células. Porém, a possibilidade de se encontrar um bioindicador com todas estas características é mínima, logo, sendo indicado que o mesmo seja escolhido em função do objetivo do programa de monitoramento (Zhou et al., 2008).

Pelo fato de a qualidade da água afetar diretamente a vida da população de ambientes aquáticos, indivíduos destes ecossistemas podem ser utilizados como indicadores ecológicos de poluição. Portanto, organismos e populações biológicas em diferentes níveis tróficos podem ser utilizados como bioindicadores do efeito de um ou mais poluentes (Malik & Zeb, 2009).

Diversas plantas aquáticas têm sido utilizadas como bioindicadoras ecológicas de poluição devido às vantagens apresentadas pela maioria destas espécies, como alta tolerância à poluição por elementos-traço, facilidade de amostragem, indivíduos grandes e de fácil manipulação em laboratório. Algumas das possíveis respostas mensuráveis destas plantas à exposição a elementos poluentes como os elementos-traço são inibição da fotossíntese e fixação de nitrogênio, alteração da capacidade respiratória e inibição do crescimento (Zhou et al., 2008).

#### **2.4 Plantas aquáticas**

As plantas vasculares, visíveis a olho nu que se desenvolvem na água e, portanto, denominadas plantas aquáticas, podem ser sub-classificadas quanto ao seu hábito de desenvolvimento como: emersas as que apresentam a maior parte do caule e das folhas acima da superfície da água, também chamadas de marginais, por se desenvolverem nas margens ou em locais rasos; emersas com folhas flutuantes as que possuem a maior parte das folhas e do caule abaixo da superfície da água; flutuantes as que possuem raízes livres na água e apresentam folhas e flores acima da superfície da água e as submersas, que possuem a maior parte das folhas e do caule abaixo da superfície da água podendo ser enraizadas ou livres (Tanaka et al., 2002).

Diversas plantas aquáticas de diferentes grupos e famílias foram indicadas por meio de estudos como acumuladoras de quantidades relevantes de elementos-traço em seus tecidos, podendo ser utilizadas em programas de

fitorremediação ou no monitoramento da poluição de ambientes aquáticos por estes poluentes (Peng et al., 2008).

A utilização destas plantas na remoção e monitoramento da poluição de recursos hídricos é altamente competitiva, quando comparada aos métodos tradicionais (Maine et al., 2001; Miretzky et al., 2004). Esta forma de remoção de poluentes é possibilitada pela absorção radicular e acúmulo destes elementos, devido à tolerância das espécies a estes poluentes, aliados a grande produção de biomassa e fácil propagação, características geralmente presentes na maioria das espécies aquáticas (Miretzky et al., 2004).

Porém, várias plantas aquáticas apresentam comportamentos específicos quanto à sua capacidade e mecanismo de absorção de poluentes, portanto, sendo necessários, estudos que visem à identificação de qual órgão acumula maior quantidade de poluentes e seus mecanismos de tolerância a estas substâncias. A análise dos tecidos destas espécies podem ainda fornecer informações ao longo do tempo, sobre a qualidade da água (Baldantoni et al., 2005).

#### **2.4.1 *Pistia stratiotes* L.**

A espécie *Pistia stratiotes*, conhecida popularmente como alface d'água, flor-d'água, erva-de-santa-luzia, lentilha-d'água, mururé, golfo, muréré-pagé, pagé ou pasta (Lorenzi, 1982), é uma planta aquática flutuante, amplamente distribuída por todo o mundo, cuja origem ainda não foi totalmente definida, sendo atribuída à África ou América do Sul (Lorenzi, 1982; Cardoso et al., 2005). É também considerada espécie ornamental, por auxiliar na estética de ambientes aquáticos artificiais (Lorenzi, 1982).

*Pistia stratiotes* é uma espécie pertencente à família Araceae, de porte herbáceo, acaule, estolonífera, com propagação sexuada e assexuada por meio de seus estolões (Lorenzi, 1982), cuja via preferencial de reprodução é a vegetativa (Cardoso et al., 2005). Possui folhas sésseis, esponjosas, espatuladas,

obtusas e densamente pubescentes, dispostas em rosetas, em que as radicais têm o pecíolo maior e mais largo do que as outras, de coloração verde aveludada na face adaxial e verde pálida esbranquiçada na face abaxial (Figura 1A). A inflorescência é pequena e de cor branca e creme (Figura 1B), composta por espádice cercada por uma espata pilosa, característica das aráceas, encontrando-se no centro da roseta (Lorenzi, 1982; Coelho et al., 2005).

Por sua alta capacidade de reprodução vegetativa e rápido crescimento, a alface d'água geralmente é responsável pela formação de densos tapetes de plantas sobre a superfície aquática (Coelho et al., 2005), sendo considerada como uma espécie daninha, afetando o aproveitamento econômico dos sistemas aquáticos (Lorenzi, 1982).

A macrófita aquática *Pistia stratiotes* tem sido utilizada para a remoção de mercúrio de efluentes de mineração, por esta acumular o metal em suas raízes (Skinner et al., 2007; Espinoza-Quñones et al., 2009), indicada para remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e sólidos suspensos na água, melhorando a qualidade dos sistemas aquáticos (Lu et al., 2010), e para o tratamento de esgoto urbano, por sua elevada taxa de crescimento (Zimmels et al., 2006), demonstrando seu potencial uso na fitorremediação, como medida mitigadora da contaminação de efluentes, por sua capacidade de absorção e acúmulo de poluentes (Skinner et al., 2007).



FIGURA 1 *Pistia stratiotes* L. **A** - Planta inteira; **B** - Detalhe da inflorescência de *Pistia stratiotes*, UFLA, 2009.

## **2.5 Crescimento clonal**

O crescimento clonal é denominado como um conjunto de atributos que permitem à planta a produção de descendentes geneticamente iguais, com potencial para tornar-se independentes da planta-mãe (Sosnová et al., 2010).

A reprodução clonal de muitas espécies aquáticas tem sido considerada como um fator positivo na alta produção de biomassa, prerequisite básico para a indicação de uma espécie como fitorremediadora e/ou bioindicadora (Coelho et al, 2005).

Plantas que se propagam vegetativamente são encontradas em todos os tipos de habitat, e no ambiente aquático esta via de reprodução é predominante. Porém em condições de estresse, esta via preferencial pode ser deslocada para a via sexuada, no intuito de se evitar estas condições e obter maiores chances de perpetuação da espécie (Coelho et al., 2005; Sosnová et al., 2010).

## **2.6 Anatomia radicular**

Em contraste com as plantas terrestres, plantas aquáticas raramente têm sido estudadas quanto a suas características anatômicas específicas quando presentes em corpos d'água contaminados por elementos-traço (Mufarrege et al., 2009).

Alterações na estrutura interna de raízes estão associadas às exigências ecológicas e fisiológicas de espécies vegetais, como capacidade de absorção de água e nutrientes, podendo afetar a habilidade de sobrevivência das plantas em ambientes aquáticos contaminados (Pilon-Smith, 2005; Mufarrege et al., 2009).

Visto que muitas plantas aquáticas respondem à contaminação por elementos-traço por meio de modificações em sua estrutura interna (Zhou et al., 2008), tornam-se necessários estudos da anatomia destas plantas, como meio de avaliar e elucidar possíveis mecanismos de tolerância à estes poluentes, a fim de

empregar tais plantas em programas de fitorremediação ou de monitoramento da poluição ambiental (Mufarrege et al., 2009; Wolff et al., 2009).

## **2.7 Sistema antioxidante**

A exposição de plantas à contaminação por elementos-traço podem desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, os quais podem causar a peroxidação lipídica, danos ao DNA, alteração da homeostase de outros elementos como o cálcio (Ca) e esgotamento de grupos sulfidrila. Os tecidos danificados pelo estresse oxidativo provocam ainda aumento na produção de proteínas carboniladas e aldeídos reativos que podem causar a distorção das camadas lipídicas de membranas (Tewari et al., 2008), modificando sua atividade enzimática e de transporte.

Porém, as plantas possuem mecanismos de combate a EROs tanto enzimáticos como não enzimáticos, os quais compõem o sistema antioxidante, responsável por evitar ou reduzir os danos oxidativos (Sinha et al., 2005). As vias enzimáticas de remoção de EROs são compostas pela ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX). Os antioxidantes não enzimáticos comumente encontrados são o ácido ascórbico, carotenóides, glutatona e tocoférois (Upadhyay & Panda, 2009).

### **2.7.1 Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)**

Entre as enzimas que estão envolvidas na exclusão de EROs, a enzima superóxido dismutase (SOD) pode ser considerada como uma enzima chave (Sinha et al., 2005), por constituir a primeira linha de defesa do sistema antioxidante (Gratão et al., 2005).

Esta enzima é responsável pela conversão de radicais superóxidos, que é danosa a membranas, a peróxido de hidrogênio que será removido pela catalase

(CAT), o que demonstra a importância da combinação das atividades da SOD e da CAT para manutenção dos processos celulares (Chen et al., 2003).

### **2.7.2 Catalase (EC 1.11.1.6)**

A enzima catalase (CAT) é responsável por remover o peróxido de hidrogênio formado espontaneamente ou pela dismutação do radical superóxido por ação da SOD (Gratão et al., 2005).

A quebra de  $H_2O_2$  por meio da CAT pode envolver dois processos distintos. Em um dos processos o  $H_2O_2$  pode reagir com grupos heme da enzima, formando peróxido de ferro, que por sua vez, pode reagir novamente com outra molécula de  $H_2O_2$  formando  $H_2O$  e  $O_2$ , caso o peróxido de hidrogênio esteja em altas concentrações. Por meio de outro processo, o peróxido de ferro pode ser reduzido por antioxidantes não enzimáticos, como por exemplo, o ácido ascórbico (Chen et al., 2003).

### **2.7.3 Peroxidase do ascorbato (EC 1.11.1.11)**

A peroxidase do ascorbato (APX) é a enzima do sistema antioxidante responsável pela oxidação de duas moléculas de ascorbato para a redução uma molécula de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  (Sinha et al., 2005). O ascorbato necessário a esta enzima é regenerado por meio da oxidação da glutatona reduzida (GSH) e sua subsequente regeneração pela glutatona redutase (GR), no ciclo da glutatona-ascorbato (Asada, 1992).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide- scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 235-241, Dec. 1992.

AZEVEDO, J. S.; FERNANDEZ, W. S.; FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. T. I.; BRAGA, E. S. Use of *Cathorops spixii* as bioindicator of pollution of trace metals in the Santos Bay, Brazil. **Ecotoxicology**, New York, v. 18, n. 5, p. 577-586, July 2009.

BALDANTONI, D.; MAISTO, G.; BARTOLI, G.; ALFANI, A. Analyses of three native aquatic plant species to assess spatial gradients of lake trace element contamination. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 46-60, Sept. 2005.

BI, X.; REN, L.; GONG, M.; HE, Y.; WANG, L.; MA, Z. Transfer of cadmium and lead from soil to mangoes in an uncontaminated area, Hainan Island, China. **Geoderma**, Amsterdam, v. 155, n. 1/2, p. 115-120, Feb. 2010.

BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2005.

CALZADA, A.T. de la; VILLA-LOJO, M. C.; BECEIRO-GONZÁLEZ, E.; ALONSO-RODRIÈGUEZ, E.; PRADA-RODRIÈGUEZ, D. Determination of arsenic species in environmental samples: use of the alga *Chlorellavulgaris* for arsenic, (III) retention. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 167-175, Mar. 1998.

CARDOSO, L. R.; MARTINS, D.; MORI, E. S.; TERRA, M. A. Variabilidade genética entre populações de *Pistia stratiotes*. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 23, n. 2, p. 181-185, abr. 2005.

CHEN, Y. X.; HE, Y. F.; LUO, Y. M.; YU, Y. L.; LIN, Q.; WONG, M. H. Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 789-793, Feb. 2003.

COELHO, F. F.; DEBONI, L.; LOPES, F. S. Density-dependent reproductive and vegetative allocation in the aquatic plant *Pistia stratiotes* (Araceae). **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 53, n. 3/4, p. 369-376, Sept./Dec. 2005.

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; SILVA, E. A.; RIZZUTTO, M. A.; PALÁCIO, S. M.; MÓDENES, A. N.; SZYMANSKI, N.; MARTIN, N.; KROUMOV, A. D. Chromium ions phytoaccumulation by three floating aquatic macrophytes from a nutrient medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 3063-3070, Dec. 2008.

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; MARTIN, N.; STUTZ, G.; TIRAO, G.; PALÁCIO, S. M.; RIZZUTTO, M. A.; MÓDENES, A. N.; SILVA JR, F. G.; SZYMANSKI, N.; KROUMOV, A. D. Root uptake and reduction of hexavalent chromium by aquatic macrophytes as assessed by high-resolution X-ray emission. **Water Research**, New York, v. 43, n. 17, p. 4159-4166, Sept. 2009.

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; MÓDENES, A. N.; COSTA JUNIOR, I. L.; PALÁCIO, S. M.; SZYMANSKI, N.; TRIGUEIROS, D. E. G.; KROUMOV, A. D.; SILVA, E. A. Kinetics of lead bioaccumulation from a hydroponic medium by aquatic macrophytes *Pistia stratiotes*. **Water, Air and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 203, n. 1/4, p. 29-37, Oct. 2009a.

FOLKES, D. J.; KUEHSTER, T. E. Contributions of pesticide use to urban background concentrations of arsenic in Denver, Colorado, U.S.A. **Environmental Forensics**, London, v. 2, n. 2, p. 127-139, June 2001.

GABOS, M. B.; ABREU, C. A.; COSCIONE, A. R. EDTA assisted phytoremediation of a Pb contaminated soil: metal leaching and uptake by Jack beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 4, p. 506-514, July 2009.

GARDEA-TORRESDEY, J. L.; PERALTA-VIDEA, J.; LA ROSA, G.; PARSON, J. G. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 249, n. 17/18, p. 1797-1810, Sept. 2005.

GRATÃO, P. L.; PRASSAD, M. N. V.; CARDOSO, P. F.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 1, p. 53-64, jan./mar. 2005.

KABATA-PENDIAS, A. Soil-plant transfer of trace elements-an environmental issue. **Geoderma**, Amsterdam, v.122, n. 2/4, p. 143-149, Oct. 2004.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer, 2007. 550p.

KESKINKAN, O.; GOKSU, M. Z. L.; YUCEER, A.; BASIBUYUK, M.; FOSTER, C. F. Heavy metal adsorption characteristics of a submerged aquatic plant (*Myriophyllum spicatum*). **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 2, p. 179-183, Oct. 2003.

LALHRUAITLUANGA, H.; JAYARAM, K.; PRASAD, M. N. V.; KUMAR, K. K. Lead(II) adsorption from aqueous solutions by raw and activated charcoals of *Melocanna baccifera* Roxburgh (bamboo)—A comparative study. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 175, n. 1/3, p. 311-318, Mar. 2010.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. São Paulo: Nova Odessa, 1982. 425p.

LU, Q.; HE, Z. L.; GRAETZ, D. A.; STOFFELLA, P. J.; YANG, X. Phytoremediation to remove nutrients and improve eutrophic stormwaters using water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). **Environmental Science Pollution Research**, Florida, v. 17, n. 1, p. 84-96, Jan. 2010.

MAINE, M. A.; DUARTE, M. V.; SUÑÉ, N. L. Cadmium uptake by floating macrophytes. **Water Research**, New York, v. 35, n. 11, p. 2629-2634, Aug. 2001.

MAINE, M. A.; SUÑÉ, N. L.; LAGGER, S. C. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. **Water Research**, New York, v. 38, n. 6, p. 1494-1501, Mar. 2004.

MALIK, R.N.; ZEB, N. Assessment of environmental contamination using feathers of *Bubulcus ibis* L., as a biomonitor of heavy metal pollution, Pakistan. **Ecotoxicology**, New York, v. 18, n. 5, p. 577-586, July 2009.

MELO, E. E. C.; COSTA, E. T. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; NASCIMENTO, C. W. A. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 479-483, Aug. 2009.

MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; CIRELLI, A. F. Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 247-254, Jan. 2006.

MISHRA, V. K.; TRIPATHI, B. D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 15, p. 7091-7097, Oct. 2008.

MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R.; MAINE, M. A. Response of *Pistia stratiotes* to Heavy Metals (Cr, Ni, and Zn) and Phosphorous. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Alexandria, v. 58, n. 1, p. 53-61, Jan. 2009.

NIEMI, G. J.; MCDONALD, M. E. Application of ecological indicators. **Annual Review Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 35, p. 89-111, Dec. 2004.

OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de *Salvinia* e aguapé. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.

PADMAVATHIAMMA, P. K.; LI, L. Y. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 184, n. 1/4, p. 105-126, Sept. 2007.

PENG, K.; LUO, C.; LOU, L.; LI, X.; SHEN, Z. Bioaccumulation of heavy metals by the aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton malaianus* Miq. and their potential use for contamination indicators and in wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, New York, v. 392, n. 1, p. 22-29, Mar. 2008.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, n. 1, p. 15-39, June 2005.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 21, n. 2, p. 335-341, out./dez. 2003.

ROMEIRO, S.; LAGOA, A. M. M. A.; FURLANI, P. R.; ABREU, C. A.; PEREIRA, B. F. F. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformis* L. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 2, p. 327-334, 2007.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 643-68, June 1998.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plant. **Brazilian Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 35-52, jan. 2005.

SINGH, D.; FULEKAR, M. H. Benzene bioremediation using cow dung microflora in two phase partitioning bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 175, n. 1/3, p. 336-343, Mar. 2010.

SINHA, S.; SAXENA, R.; SINGH, S. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. **Chemosphere**, Oxford, v.58, n. 5, p. 595-604, Feb. 2005.

SKINNER, K.; WRIGHT, N.; PORTER-GOFF, E. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 1, p. 234-237, Jan. 2007.

SOSNOVÁ, M.; DIGGELEN, R. van; KLIMESÒVA, J. Distribution of clonal growth forms in wetlands. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 33-39, Jan. 2010.

SUÑÈ, N.; SÁNCHEZ, G.; CAFFARATTI, S.; MAINE, M. A. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 2, p. 467-473, Jan. 2007.

TANAKA, R. H.; CARDOSO, L. R.; MARTINS, D.; MARCONDES, D. A. S.; MUSTAFÁ, A. L. Ocorrência de plantas aquáticas nos reservatórios da companhia energética de São Paulo. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 20, p.101-111, 2002. Edição Especial.

TEWARI, A.; SINGH, R.; SINGH, N. K.; RAI, U. N. Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 18, p. 8715-8721, Dec.2008.

TOPPI, L. S. di; GABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam v. 41, n. 2, p. 105-130, Apr. 1999.

TOPPI, L. S. di; VURRO, E.; ROSSI, L.; MARABOTTINI, R.; MUSETTI, R.; CARERI, M.; MAFFINI, M.; MUCCHINO, C.; CORRANDI, C.; BDIANI, M. Different compensatory mechanisms in two metal-accumulating aquatic macrophytes exposed to acute cadmium stress in outdoor artificial lakes. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, n. 4, p. 769-780, June 2007.

UPADHYAY, R.; PANDA, S. K. Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). **Comptes rendus Biologies**, Paris, v. 332, n. 7, p. 623-632, July 2009.

WOLFF, G.; ASSIS, L. R.; PEREIRA, G. C.; CARVALHO, J. G.; CASTRO, E. M. Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 27, n. 1, p.133-137, Jan. 2009.

ZHAO, F. J.; MA, J. F.; MEHARG, A. A.; MCGRATH, S. P. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v.181, n. 4, p. 777-794, Mar. 2009.

ZHOU, Q. A.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 606, n. 2, p. 135-150, Jan. 2008.

ZIMMELS, Y.; KIRZHNER, F.; MALKOVSKAJA. Application of *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes* for treatment of urban sewage in Israel. **Journal of Environmental Management**, London, v. 81, n. 4, p.420-428, Dec. 2006.

**CAPÍTULO 2**  
**POTENCIAL BIOINDICADOR DE *Pistia stratiotes* L. SOB**  
**CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE CÁDMIO**

## 1 RESUMO

A técnica de biomonitoramento tem sido amplamente empregada em programas de monitoramento da poluição ambiental, devido à sua eficiência, praticidade, alta sensibilidade e baixo custo. Diversas plantas aquáticas têm sido utilizadas como bioindicadoras ecológicas de poluição por elementos-traço, devido a sua capacidade de resposta a esta perturbação ambiental de forma mensurável. Em vista disso, tornam-se necessários estudos visando o conhecimento das respostas dessas plantas à contaminação de elementos-traço, a fim de que sejam futuramente utilizadas como bioindicadoras. No presente estudo *Pistia stratiotes* foi avaliada quanto ao seu potencial bioindicador da poluição pelo elemento-traço cádmio (Cd), por meio da análise de dados populacionais, sintomas visuais e pelo teor, acúmulo, absorção e translocação de Cd, visando sua indicação para programas de biomonitoramento de efluentes contaminados pelo elemento estudado. Rosetas de *P. stratiotes* foram cultivadas em solução nutritiva e submetidas aos tratamentos com Cd nas seguintes concentrações: 0; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup> por um período de 15 dias, após o qual foram realizadas a contagem do número de rosetas filhas e inflorescências da roseta mãe, a determinação da biomassa aérea e radicular, o registro fotográfico para observações dos sintomas visuais e análise do teor de Cd na parte aérea e sistema radicular por meio de espectrofotometria de absorção atômica. A planta concentrou teores consideráveis de Cd, principalmente nas raízes, concentração esta que aumentou linearmente com o aumento do elemento Cd na solução, bem como a translocação, acúmulo e a absorção do elemento. Foi observado decréscimo no surgimento de novas rosetas e na alocação de biomassa por *P. stratiotes* com o aumento da concentração do elemento na solução. *P. stratiotes* apresentou maior número de estruturas reprodutivas de acordo com o aumento da concentração de Cd, demonstrando uma correlação positiva entre esses fatores. Foi observado o surgimento de clorose proporcional ao aumento da concentração de Cd em solução. Por sua função de bioacúmulo ser de fácil detecção, *P. stratiotes* pode ser utilizada no biomonitoramento de ambientes aquáticos contaminados por Cd.

**Palavras-chave:** biomonitoramento, metal pesado, alface d'água.

## 2 ABSTRACT

The biomonitoring technique has been widely used in monitoring environmental pollution programs due to its efficiency, convenience, high sensitivity, and low cost. Several aquatic plants have been used as bioindicators of environmental pollution by trace elements, due to their ability to measurably respond to this environmental perturbation. As a result, studies aimed at understanding plants response plants to trace element contamination become necessary so that in the future such plants can be used as bioindicators. In the present study *Pistia stratiotes* was evaluated for its bioindicator potential for Cd trace element pollution. The evaluation of consisted, through the analysis of population data, visual symptoms and the accumulated level of Cd, seeking the plants indication for biomonitoring programs of Cd contaminated effluents. Rosettes of *P. stratiotes* were grown in nutrient solution and submitted to treatment with Cd at following concentrations: 0, 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mg.L<sup>-1</sup> for a period of 15 days, after which the number of daughter rosettes and mother rosette flowers were counted. The determination of root and shoot biomass, the photographic record for visual observations of symptoms as well as analysis of Cd content in shoot and root system by atomic absorption spectrophotometry were conducted. The plant concentrated considerable Cd levels, particularly in the roots, which increased linearly with the increase in the solution. A linear decrease in the emergence of new rosettes and biomass allocation of *P. stratiotes* was observed with increasing solutions concentrations. *P. stratiotes* showed a higher number of reproductive structures and according to the increase in Cd concentration, showed a positive correlation between these factors. The appearance of chlorosis proportional to the increase of the Cd concentration in solution was observed. Because its bioaccumulation function is easy to detect, *P. stratiotes* can be used in biomonitoring of Cd contaminated aquatic environments.

**Key-words:** biomonitoring, heavy metal, water lettuce.

### 3 INTRODUÇÃO

A contaminação de ecossistemas aquáticos por elementos-traço tem sido considerada um problema causador de grande impacto ambiental (Mishra & Tripathi, 2008), pois pode inviabilizar a utilização de corpos d'água, além de ser fonte de contaminação destes elementos bioacumulativos a toda cadeia trófica. Este é um problema crescente, devido à intensa e constante ação antrópica, principal origem da contaminação por estes elementos.

O elemento-traço cádmio (Cd) é considerado como um dos metais mais perigosos ao ambiente, devido à sua ação tóxica aos animais, às plantas e seres humanos, sendo ainda um elemento bioacumulativo. A contaminação de Cd em humanos e animais se dá principalmente por alimentos e água contaminados com este metal, provocando efeitos adversos nestes organismos (Bi et al., 2010).

Nos vegetais a contaminação por Cd em geral provoca uma série de alterações no metabolismo fotossintético e na absorção de nutrientes, afetando seu crescimento e desenvolvimento. Portanto este elemento é considerado não essencial às plantas, apesar de ser facilmente absorvido e translocado (Mishra & Tripathi, 2008).

A avaliação da presença de elementos-traço contaminantes em ecossistemas aquáticos é realizada primeiramente pela análise visual das plantas, pois estas apresentam sintomas de fácil detecção, como manchas cloróticas e necróticas nas folhas, coloração avermelhada, redução na biomassa e diminuição do rendimento (Wolff et al., 2009).

A técnica de biomonitoramento da poluição ambiental tem sido amplamente utilizada devido à sua eficiência, praticidade, alta sensibilidade e baixo custo, na qual diversas plantas aquáticas têm sido utilizadas como bioindicadoras ecológicas da poluição por elementos traço, devido a sua capacidade de resposta a esta perturbação ambiental de forma mensurável

(Munteanu & Munteanu, 2005). Em vista disso, tornam-se necessários estudos visando o conhecimento das respostas dessas plantas à contaminação de elementos-traço, afim de que sejam futuramente utilizadas como bioindicadoras.

A espécie *Pistia stratiotes* L., comumente conhecida como alface d'água, é uma planta aquática flutuante, com alta produção de biomassa e rápida taxa de multiplicação pela via vegetativa e sexuada (Cardoso et al., 2005), que tem sido apontada como espécie bioacumuladora de elementos-traço como o cromo (Cr), sendo indicada para programas de bioindicação da poluição por este metal (Maine et al., 2004). Porém, como a tolerância das plantas aos metais é específica para cada elemento, torna-se necessário o conhecimento do potencial bioindicador desta espécie frente à contaminação por outros elementos-traço comumente encontrados como poluentes de ecossistemas aquáticos.

Diante do exposto, este estudo objetivou verificar o potencial bioindicador da espécie aquática *P. stratiotes* à contaminação por Cd, por meio da análise de dados populacionais (biomassa, número de rosetas filhas e número de inflorescências da roseta mãe), sintomas visuais, concentração, acúmulo, translocação e absorção de Cd, visando sua indicação para programas de biomonitoramento de efluentes contaminados pelo elemento estudado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do material vegetal

Para a realização do experimento de diagnose visual, análise populacional, absorção e acúmulo do elemento Cd, rosetas de *P. stratiotes* foram coletadas em uma lagoa artificial, livre de suspeita de contaminação por Cd no município de Lavras – MG (44° 55' W; 21° 05' S). Após a coleta, as plantas foram lavadas em água corrente a fim de eliminar partículas aderidas. Foram selecionadas plantas livres de patógenos e uniformes quanto ao tamanho, as quais foram posteriormente cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde inicialmente passaram por um período de aclimatização, sendo cultivadas em bandejas plásticas com capacidade para 20 L, contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total, até a quinta geração clonal de plantas, para a eliminação de resíduos do elemento-traço que porventura pudessem estar presentes nas plantas matrizes coletadas do ambiente. O período de desenvolvimento de cada geração clonal foi de 15 dias.

### 4.2 Instalação do Experimento

Após o período de aclimatização, as plantas da quinta geração clonal foram selecionadas quanto à uniformidade do tamanho e transferidas para recipientes individuais, contendo 4 L da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) como descrita para a aclimatização, contendo concentrações crescentes de Cd na forma de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

Os valores das concentrações de Cd utilizadas para os diferentes tratamentos foram obtidos com base no valor máximo permitido (VMP) de Cd total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce (Brasil, 2005). Neste caso, o VMP segundo esta resolução é de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd.

TABELA 1 Concentração de Cd na solução para cada tratamento.

<b>Tratamento</b>	<b>Concentrações de Cd (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Percentual do VMP (%)</b>
<b>T1 (Controle)</b>	0,0	0
<b>T2</b>	0,4	200
<b>T3</b>	0,8	400
<b>T4</b>	1,6	800
<b>T5</b>	3,2	1600

Foram eliminadas todas as estruturas reprodutivas das plantas antes da imposição dos tratamentos. As plantas foram submetidas aos tratamentos por um período de 15 dias, após o qual, foram realizadas as análises. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos com cinco repetições, com a parcela experimental composta por três rosetas.



FIGURA 1 Rosetas de *Pistia stratiotes*. **A** - em aclimatização; **B** – submetidas aos tratamentos, dispostas em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e três plantas por bandeja.

#### **4.3 Crescimento clonal, número de estruturas reprodutivas e determinação da biomassa**

O crescimento clonal foi determinado pela contagem do número de rosetas filhas ao final do período experimental. Para a determinação da

biomassa, foi realizada a separação da parte aérea e sistema radicular, que foram secas em estufa durante 72 horas, a 60°C até peso constante, sendo posteriormente pesadas em balança analítica. O número de inflorescências foi contado ao final do experimento.

#### **4.4 Diagnose visual**

As alterações na morfologia externa foram observadas diariamente e registradas ao final do período experimental, com auxílio de uma câmera digital.

#### **4.5 Análise da bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de cádmio**

Para a determinação das concentrações de Cd, foram utilizados 0,5 e 1,0 g de matéria seca de raízes e da parte aérea, respectivamente, obtidos no processo de secagem para análise de alocação da biomassa, que foram posteriormente trituradas em moinho do tipo Wiley. Estas alíquotas foram digeridas em 10 mL de HNO<sub>3</sub> p.a. e aquecidos em forno de microondas, durante 10 minutos, à pressão de 0,76 MPa. Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado para 20 mL com água destilada. A digestão das amostras foi feita segundo o protocolo do método 3051 A da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 1998).

A determinação da concentração de Cd nas amostras foi obtida por meio de espectrofotômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite utilizando o equipamento AAnalyst 800 da Perkin Elmer.

Cada bateria de análise continha uma amostra em branco com a finalidade de controle de qualidade do método de extração e determinação deste elemento-traço. A amostra em branco foi obtida utilizando-se o mesmo procedimento de digestão, porém contendo somente o HNO<sub>3</sub>. A partir da leitura desta amostra, determinou-se o branco do método, que foi utilizado no cálculo

do limite de detecção do método (LDM), que por sua vez, foi utilizado para calcular o limite de quantificação do método (LQM). Foram utilizados como materiais de referência amostras da solução nutritiva acrescidas do elemento-traço nas concentrações representativas de cada tratamento.

O acúmulo de Cd nos tecidos de *P. stratiotes* foi calculado com base nas concentrações encontradas e produção de biomassa. Para os cálculos de translocação e absorção do Cd foram utilizadas as seguintes fórmulas:

Translocação do Cd:

$$(\text{acúmulo de Cd na parte aérea}) / (\text{acúmulo total de Cd na planta}) \times 100$$

Absorção de Cd:

$$(\text{acúmulo total de Cd na planta}) / (\text{matéria seca das raízes})$$

#### **4.6 Análise estatística**

As variáveis obtidas foram submetidas à análise de variância e regressão para o fator concentrações de Cd na solução. A fim de verificar a diferença entre os tratamentos para os parâmetros número de rosetas filhas e número de inflorescências da roseta mãe, foram utilizadas barras correspondentes ao erro-padrão da média e realizada a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Crescimento clonal, número de estruturas reprodutivas, biomassa e diagnose visual

O aparecimento de novas rosetas foi detectado a partir do quinto dia no tratamento controle e a partir do oitavo dia nos tratamentos com presença de Cd, esses dados demonstram um atraso de 60% no tempo de multiplicação das plantas sob efeito desse elemento. No término do período experimental foi observado maior número de rosetas no tratamento sem Cd (Figura 2), havendo uma diminuição no número de rosetas de acordo com o acréscimo na concentração de Cd, demonstrando uma relação negativa entre esses fatores. Porém não houve diferença significativa para estes parâmetros entre as maiores concentrações testadas (1,6 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup>).

Foi observado maior número de estruturas reprodutivas (inflorescências) nas rosetas mãe de acordo com o aumento da concentração de Cd na solução (Figura 2), provavelmente em resposta à condição de estresse induzido, na tentativa de perpetuação da espécie.

Embora a via de reprodução preferencial da espécie *P. stratiotes* seja a vegetativa (Cardoso et al., 2005), em condições de estresse, como condições de elevada densidade populacional, *P. stratiotes* tende a investir mais em reprodução sexuada (Coelho et al., 2005), fato que corrobora com os resultados encontrados, em que as plantas encurtam o ciclo de vida como adaptação da espécie para evitação dessas condições adversas.

Em relação à alocação de biomassa, o tratamento controle apresentou maior crescimento de parte aérea e maior desenvolvimento de raízes. A biomassa da planta diminuiu com o aumento da concentração de Cd na solução (Figura 3). O tratamento T2 apresentou uma redução na biomassa das raízes de 13,54% em relação ao T1 (controle – ausência de Cd). O decréscimo foi mais

acentuado na parte aérea, 21,19% de redução. (FIGURA 3), provavelmente pelo fato do Cd afetar a taxa fotossintética.

Foram detectadas cloroses nas folhas jovens, expostas às maiores concentrações de Cd (1,6 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup>), além da diminuição gradual do tamanho das plantas de acordo com o aumento da concentração de Cd (Figura 4A). Estes são considerados sintomas gerais de plantas à toxicidade por Cd (Zhou et al., 2008).

O Cd interfere na absorção de nitrato e seu transporte das raízes para a parte aérea, por inibição da atividade da redutase do nitrato. Por ser quimicamente semelhante ao íon Fe<sup>2+</sup>, o Cd também é apontado como responsável pela redução na absorção de Fe, provocando deficiência deste elemento, prejudicando o processo fotossintético (Toppi et al., 1999), o que consequentemente afeta o crescimento, corroborando com os resultados encontrados.

Portanto, a queda da taxa fotossintética ocasionada pela toxicidade do Cd é devido ao fato deste elemento induzir a deficiência de Fe por competição na absorção. Pelo fato de o Fe ser um elemento envolvido nas reações de transferência de elétrons, como acontece nos citocromos e por também possuir importante função na síntese de clorofilas e proteínas no cloroplasto, sua deficiência afeta diretamente a fotossíntese, podendo provocar sintomas como cloroses e redução da biomassa da parte aérea.

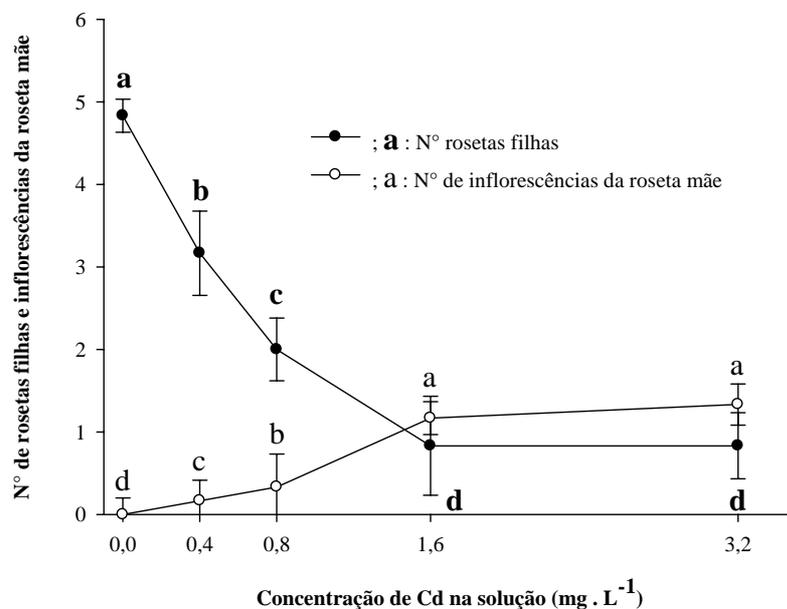


FIGURA 2 Crescimento clonal e número de estruturas reprodutivas de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de Cd na solução (mg.L<sup>-1</sup>). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Cd testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

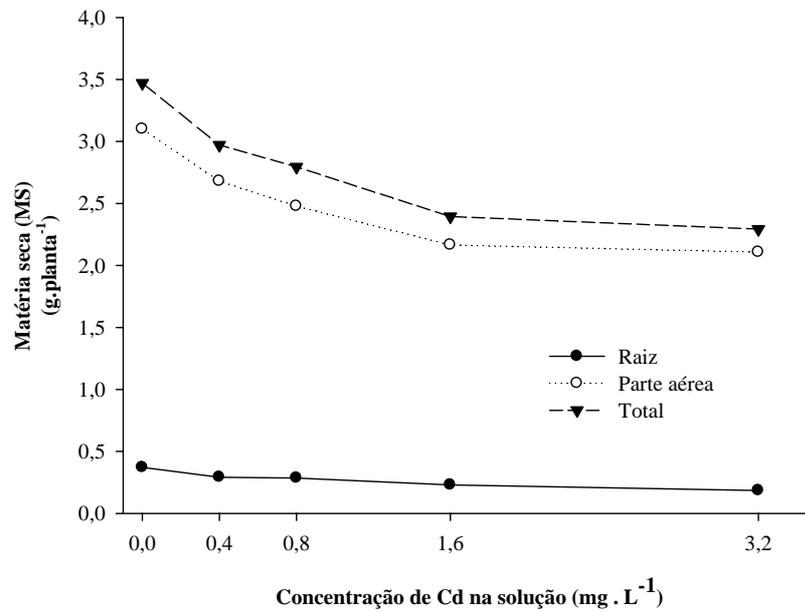


FIGURA 3 Biomassa da raiz (g.planta<sup>-1</sup>), parte aérea e total de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de Cd na solução (mg.L<sup>-1</sup>). Biomassa raiz ( $R^2 = 0,96$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 0,3577 - 0,1134x + 0,0187x^2$ ), parte aérea ( $R^2 = 0,99$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 3,0567 - 0,8591x + 0,1764x^2$ ) e total ( $R^2 = 0,97$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 3,4171 - 0,9592x + 0,1904x^2$ ).

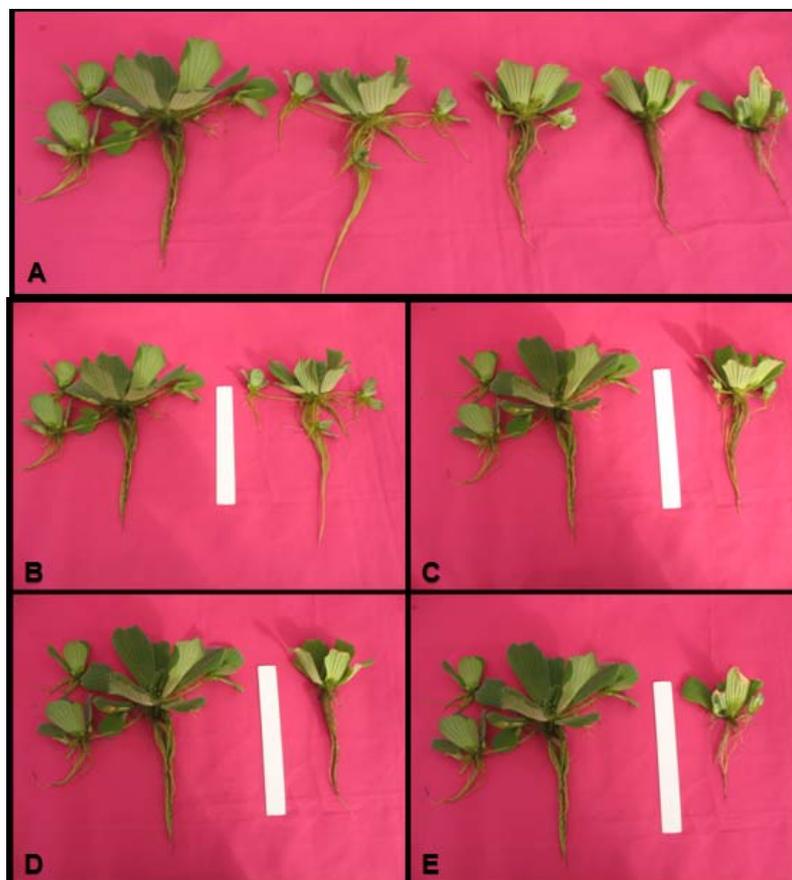


FIGURA 4 Plantas de *Pistia stratiotes* submetidas a doses crescentes de Cádmiio. (A– 0; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; B– 0 e 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; C– 0 e 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; D– 0 e 1,6 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; E– 0 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de Cd). Barra = 20 cm.

## 5.2 Bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de cádmio

Em todas as concentrações testadas de Cd em solução, foram encontradas concentrações superiores ao limite de quantificação do método (LQM), possibilitando a quantificação das concentrações de Cd na raiz e na parte aérea. O LQM calculado para o Cd foi de 0,064 mg.L<sup>-1</sup>.

A espécie *P. stratiotes* demonstrou aptidão para a extração e acúmulo de Cd da solução nutritiva, concentrando e acumulando quantidades relevantes deste elemento em seus tecidos, principalmente em seu sistema radicular (Figura 5 e 6), por este ser o órgão responsável pela absorção do poluente, podendo retê-lo em grande parte em seus tecidos por meio de barreiras apoplásticas, no intuito de se evitar que o mesmo seja translocado para a parte aérea afetando o processo fotossintético e assim comprometendo o desenvolvimento da planta. Em todos os tratamentos com a presença de Cd, o sistema radicular foi responsável por mais de 91% da concentração total do poluente (Figura 5B).

Em trabalhos realizados com diversas macrófitas aquáticas verificou-se que a absorção de Cd pelas raízes é mais rápida do que a translocação para a parte aérea, podendo contribuir para o maior acúmulo do elemento no sistema radicular (Maine et al., 2001). Porém, no presente estudo tanto a eficiência de translocação quanto a eficiência na absorção aumentaram linearmente de acordo com o aumento da concentração de Cd na solução (Figuras 7 e 8).

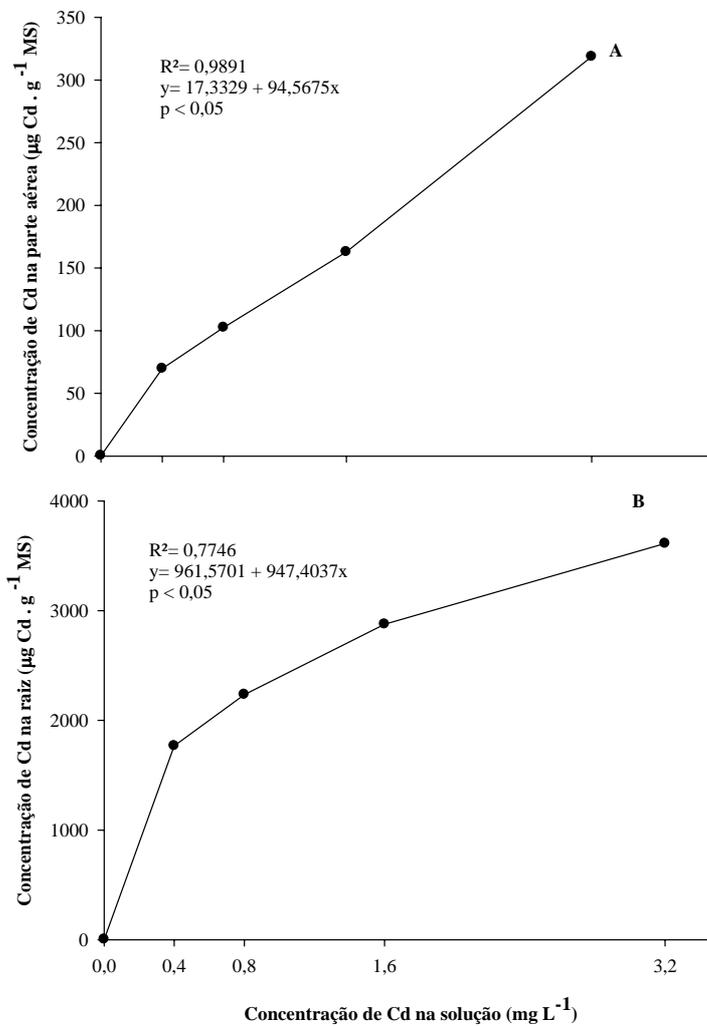


FIGURA 5 Concentrações acumuladas de Cd em *Pistia stratiotes* (µg de Cd.g<sup>-1</sup> MS) nas diferentes concentrações de Cd em solução (mg.L<sup>-1</sup>). A - Concentração acumulada na parte aérea; B - Concentração acumulada no sistema radicular.

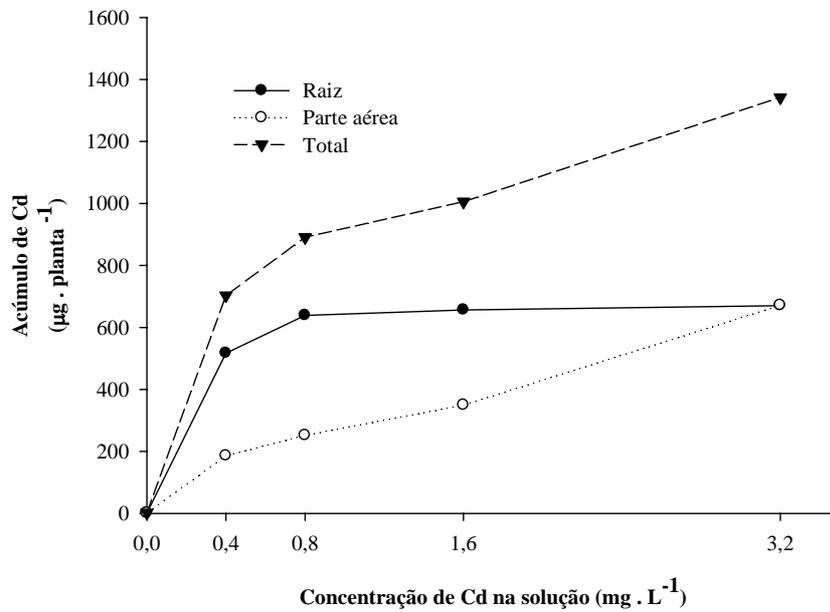


FIGURA 6 Bioacúmulo de Cd em *Pistia stratiotes* ( $\mu\text{g} \cdot \text{planta}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de Cd em solução ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Acúmulo raiz ( $R^2 = 0,91$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 84,2858 + 201,2071x$ ), parte aérea ( $R^2 = 0,99$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 8,6781 + 101,5784x$ ) e total ( $R^2 = 0,95$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 92,9639 + 302,7855x$ ).

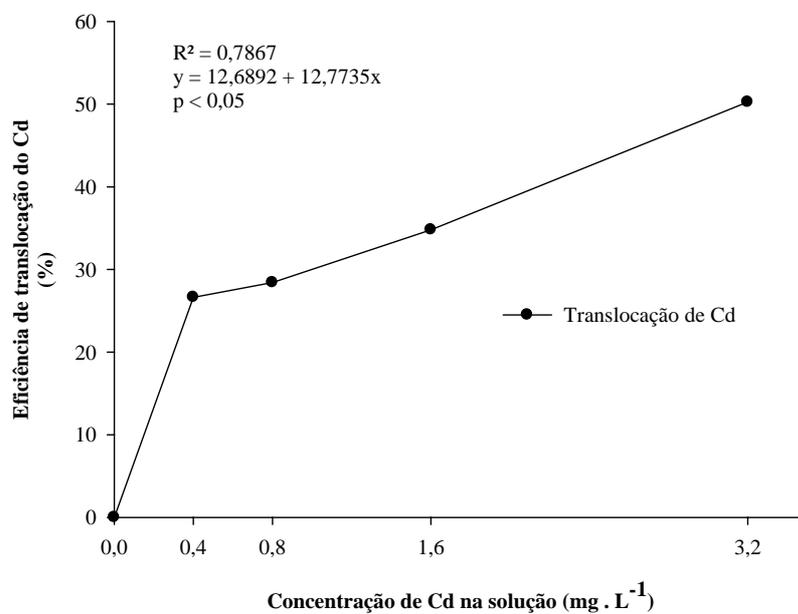


FIGURA 7 Eficiência na translocação de Cd (%) em *Pistia stratiotes* nas diferentes concentrações de Cd em solução (mg.L<sup>-1</sup>).

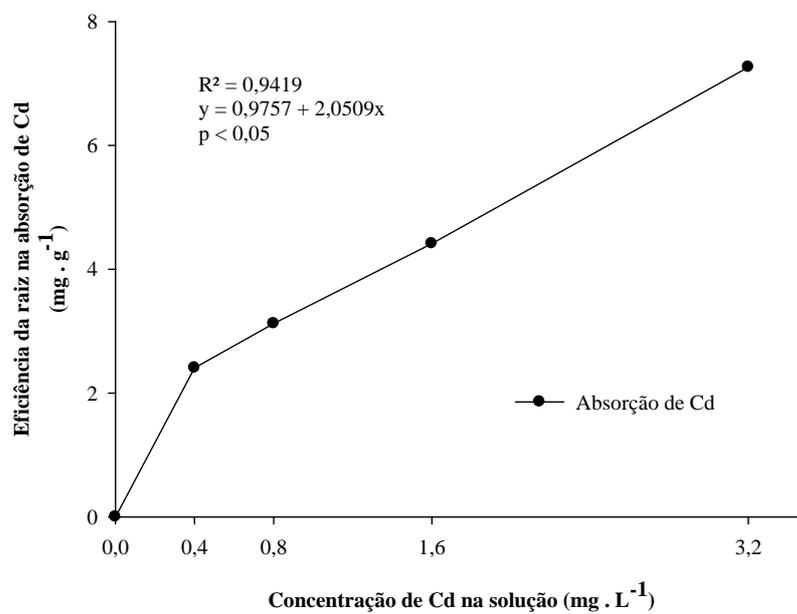


FIGURA 8 Eficiência das raízes de *Pistia stratiotes* na absorção de Cd (mg.g<sup>-1</sup>) nas diferentes concentrações de Cd em solução (mg.L<sup>-1</sup>).

Devido às altas concentrações de Cd extraídas e acumuladas por *P. stratiotes*, esta espécie pode ser indicada como bioindicadora de Cd por acumulação.

## 6 CONCLUSÕES

Diante do exposto, a espécie *Pistia stratiotes* submetida a concentrações crescentes de Cd apresentou alterações morfológicas, diminuição no crescimento clonal, aumento do número de estruturas reprodutivas, redução da biomassa, aumento da eficiência de absorção e translocação de Cd, bem como o aumento do teor e acúmulo de Cd nas plantas proporcionais ao aumento da concentração de Cd aplicada em solução. Por sua característica bioacumuladora ser de fácil detecção, *P. stratiotes* pode ser indicada para utilização no biomonitoramento de ambientes aquáticos contaminados por Cd.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BI, X.; REN, L.; GONG, M.; HE, Y.; WANG, L.; MA, Z. Transfer of cadmium and lead from soil to mangoes in an uncontaminated area, Hainan Island, China. **Geoderma**, Amsterdam, v. 155, n. 2, p. 115-120, Feb. 2010.

BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2005.

CARDOSO, L. R.; MARTINS, D.; MORI, E. S.; TERRA, M. A. Variabilidade genética entre populações de *Pistia stratiotes*. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 23, n. 2, p. 181-185, abr. 2005.

COELHO, F. F.; DEBONI, L.; LOPES, F. S. Density-dependent reproductive and vegetative allocation in the aquatic plant *Pistia stratiotes* (Araceae). **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 53, n. 3/4, p. 369-376, Sept./Dec. 2005.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular 347).

MAINE, M. A.; DUARTE, M. V.; SUÑÉ, N. L. Cadmium uptake by floating macrophytes. **Water Research**, New York, v. 35, n. 11, p. 2629-2634, Aug. 2001.

MAINE, M. A.; SUÑÉ, N. L.; LAGGER, S. C. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. **Water Research**, New York, v. 38, n. 6, p. 1494-1501, Mar. 2004.

MISHRA, V. K.; TRIPATHI, B. D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 15, p. 7091-7097, Oct. 2008.

MUNTEANU, G. G.; MUNTEANU, V. I. Bioindication of mercury pollution of the dubossary reservoir. **Water Resources**, New York, v. 32, n. 4, p. 422-426, July, 2005.

TOPPI, L. S. di; GABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 105–130, Apr. 1999.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3051 A: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: \_\_\_\_\_. **SW – 84**: test methods for evaluating solid waste, physical and chemical methods. Washington, 1998. 20p.

WOLFF, G.; ASSIS, L. R.; PEREIRA, G. C.; CARVALHO, J. G.; CASTRO, E. M. Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 27, n. 1, p.133-137, mar. 2009.

ZHOU, Q. A.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 606, n. 2, p. 135-150, Jan. 2008.

**CAPÍTULO 3**  
**RESPOSTAS ESTRUTURAIS RADICULARES E ATIVIDADE DO**  
**SISTEMA ANTIOXIDANTE DE *Pistia stratiotes* L. SOB**  
**CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO**

## 1 RESUMO

O cádmio (Cd) é um elemento traço tóxico às plantas, capaz de causar danos de membrana, mudanças estruturais e inibição de processos metabólicos, alterando seu o crescimento e desenvolvimento. A contaminação por Cd estimula a formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs), podendo causar danos oxidativos a biomoléculas. Porém, as plantas possuem um conjunto de enzimas antioxidantes, capaz de combater as EROs. O bom funcionamento do sistema antioxidante e alterações anatômicas como respostas plásticas ao estresse ocasionado pelo metal, podem proporcionar tolerância das espécies a este poluente. Com isso, o presente trabalho objetivou avaliar a anatomia radicular e a atividade das enzimas do sistema antioxidante peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), em plantas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Cd, com o intuito de detectar estratégias de tolerância da espécie ao metal. Indivíduos de *P. stratiotes* foram cultivados em solução nutritiva e submetidos a diferentes concentrações de Cd: 0; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup> por um período de 15 dias. Ao término do período experimental, foram feitas avaliações da anatomia radicular e o ensaio da atividade das enzimas antioxidantes APX, CAT e SOD. A atividade da SOD aumentou em ambas as partes da planta com a presença de Cd até a concentração de 0,8mg.L<sup>-1</sup>, por indução enzimática como resposta à ação tóxica deste elemento. Nas concentrações mais altas, o Cd promoveu redução na atividade desta enzima, indicando, possivelmente, que o estresse oxidativo ultrapassou a capacidade de controle de EROs pela SOD, resultando em inibição enzimática da mesma, ou por efeito inibitório na via de síntese desta proteína. A atividade da CAT e APX aumentou de acordo com o aumento da concentração de Cd em ambas as partes da planta, conferindo tolerância ao metal. Alterações estruturais como espessamento de epiderme, exoderme e endoderme, foram detectadas nas raízes de *P. stratiotes* de acordo com o aumento da concentração de Cd em solução. A porcentagem do córtex ocupada por aerênquimas não foi afetada, permitindo a flutuação das rosetas, mesmo em concentrações de Cd mais elevadas. As modificações estruturais observadas funcionam como estratégias adaptativas que permitem tolerância de *P. stratiotes* a este metal.

**Palavras-chave:** enzimas antioxidantes, elemento-traço, potencial bioindicador, anatomia radicular.

## 2 ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a trace element toxic to plants, capable of causing membrane damage, structural changes and inhibition of metabolic processes altering plant growth and development. Cadmium contamination stimulates the formation of reactive oxygen species (ROS), being able to cause oxidative damage to biomolecules. However, plants possess a set of antioxidant enzymes, capable of combating the ROS. The proper functioning of the antioxidant system and morphological changes, such as plastic responses to stress caused by metal, can provide species tolerance to this pollutant. Thus, this study aimed to evaluate the ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzyme antioxidant activity in *Pistia stratiotes* plants under increasing Cd concentrations, in order to detect species strategy tolerances to the metal. Individuals of *P. stratiotes* were grown in nutrient solution and subjected to different concentrations of Cd: 0, 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mg.L<sup>-1</sup> for a period of 15 days. At the end of the trial period, assessments were made of the root anatomy and the SOD, CAT and APX antioxidant enzyme activity was tested. The CAT and APX activity increased with increasing Cd concentrations in the leaves and roots. The SOD activity increased in both parts of the plant with the presence of Cd until a concentration of 0.8 mg.L<sup>-1</sup>, by enzyme induction in response to the toxic action of this element. At higher concentrations, Cd promoted the SOD activity reduction, possibly indicating that oxidative stress has exceeded the control of ROS by SOD, resulting in its inhibition or causing an inhibitory effect in its synthesis. The CAT and APX activity increased with increasing Cd concentrations in both parts of the plant, providing tolerance to the metal. Structural changes such as epidermal, exodermal and endodermal thickening were detected in the *P. stratiotes* roots according to the increase of the Cd concentration in solution. The size of aerenchyma was not affected, allowing the floatation of the rosettes, even at higher Cd concentrations. The structural changes observed may serve as adaptive strategies that may allow tolerance of *P. stratiotes* to this metal.

**Key-words:** antioxidant enzymes, trace element, bioindicator potential, root anatomy.

### 3 INTRODUÇÃO

Métodos que utilizam plantas para remoção de elementos-traço da água tem se mostrado um processo alternativo de baixo custo quando comparado às técnicas convencionais de remediação de áreas contaminadas (Suñe et al., 2007). Várias plantas aquáticas têm demonstrado grande potencial para a utilização em programas de monitoramento ou remediação da poluição em ecossistemas aquáticos, devido a atributos, como grande produção de biomassa, fácil propagação e tolerância a poluentes.

O elemento-traço cádmio (Cd) tem sido considerado como um dos metais mais perigosos ao ambiente, devido à sua ação tóxica aos animais, às plantas e seres humanos, sendo ainda um elemento bioacumulativo. A contaminação de Cd em humanos e animais se dá principalmente por alimentos e água contaminados com este metal, provocando efeitos adversos nestes organismos (Bi et al., 2010).

Nos vegetais, a contaminação por Cd em geral provoca uma série de alterações no metabolismo fotossintético e na absorção de nutrientes, afetando seu crescimento e desenvolvimento. Portanto, este elemento é considerado não essencial às plantas, apesar de ser facilmente absorvido e translocado (Misra & Tripathi, 2008).

A exposição de plantas à contaminação por elementos-traço pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, os quais podem causar a peroxidação lipídica, alteração da homeostase de outros elementos como o cálcio (Ca) e esgotamento de grupos sulfidrilas. Os tecidos danificados pelo estresse oxidativo provocam ainda aumento na produção de proteínas carboniladas e aldeídos reativos que podem causar a distorção das camadas

lipídicas de membranas (Tewari et al., 2008), modificando sua atividade enzimática e de transporte.

Outro tipo de respostas dos vegetais relacionadas ao estresse ocasionado por elementos-traço são alterações na estrutura interna de raízes, que estão associadas às exigências ecológicas e fisiológicas de espécies vegetais, como capacidade de absorção de água e nutrientes, podendo afetar a habilidade de sobrevivência das plantas em ambientes aquáticos contaminados (Pilon-Smith, 2005; Mufarrege et al., 2009).

Com isso, o presente trabalho objetivou avaliar a anatomia radicular e a atividade das enzimas do sistema antioxidante peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), em plantas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Cd, com intuito de detectar estratégias de tolerância da espécie ao metal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do material vegetal

A obtenção das rosetas de *P. stratiotes* foi feita em uma lagoa artificial, livre de suspeita de contaminação por Cd no município de Lavras – MG (44° 55' W; 21° 05' S). Após a coleta, as plantas foram lavadas em água corrente para a eliminação de impurezas e selecionadas pelo tamanho e pelas boas condições fitopatológicas. Posteriormente foram transferidas para casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde inicialmente passaram por um período de aclimatização, sendo cultivadas em bandejas plásticas com capacidade para 20 L, contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total, até a quinta geração clonal de plantas, para a eliminação de resíduos do elemento-traço que porventura pudessem estar presentes nas plantas matrizes coletadas do ambiente. O período de desenvolvimento de cada geração clonal foi de 15 dias.

### 4.2 Imposição dos tratamentos

Após o período de aclimatização, as plantas da quinta geração clonal foram selecionadas quanto à uniformidade do tamanho e transferidas para recipientes individuais, contendo 4L da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) como descrita para a aclimatização, contendo concentrações crescentes de Cd na forma de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 0; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Cd. Os valores das concentrações de Cd utilizadas para os diferentes tratamentos foram obtidos com base no valor máximo permitido (VMP) de Cd total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce (Brasil, 2005). Neste caso, o VMP segundo esta resolução é de 0,2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Cd.

Foram montados experimentos distintos para as análises anatômicas e para o ensaio das atividades enzimáticas.



FIGURA 1 Rosetas de *Pistia stratiotes* submetidas aos tratamentos, dispostas em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e uma planta por bandeja.

As plantas foram submetidas aos tratamentos por um período de 15 dias, após o qual, realizou as coletas para posteriores análises. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos com cinco repetições, com a parcela experimental composta por uma roseta.

#### **4.3 Atividade das enzimas do sistema antioxidante**

Ao término do período experimental foram coletados no período da manhã, cerca de 1,5 g de matéria fresca de raízes e de folhas separadamente, os quais em foram em seguida envolvidos por papel alumínio e acondicionados em caixa de isopor, até a chegada ao laboratório onde o material foi mantido em

freezer -86°C até o momento de sua utilização no processo de extração enzimática.

Para a extração das enzimas SOD (EC 1.15.1.1), CAT (EC 1.11.1.6) e APX (EC 1.11.1.11) foram utilizados 0,5 g de raízes e folhas, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido e 2 mL de tampão de extração contendo: 1,924 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7; 40 µL de MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 0,5 mol.L<sup>-1</sup>; 20 µL de EDTA 0,1 mol.L<sup>-1</sup>; 8µL de DTT 0,5 mol.L<sup>-1</sup>; 16µL de PMSF 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e 40 mg de PVPP. Após o processo de maceração, o material foi centrifugado a 14000 RPM, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante no qual permaneceram as enzimas foi coletado e o pellet descartado. As amostras foram mantidas a 4°C durante todo o procedimento (Bor et al., 2003 adaptado). O mesmo extrato enzimático foi utilizado para o ensaio da atividade das três enzimas analisadas.

Para o ensaio enzimático da atividade da SOD foi utilizado o volume final de 3 mL do meio de reação contendo: 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7,8; 30 µL de EDTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>; 4,5 µL de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) 50 mmol.L<sup>-1</sup>; 156 µL de metionina 0,25 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7,8; 60 µL de riboflavina 100 µmol.L<sup>-1</sup> e 1,2295 mL de água acrescidos a 20 µL do extrato enzimático. A reação foi realizada em uma câmara com luz fluorescente de 15 watts na qual foram expostos tubos de vidro contendo o meio de reação por um período de 10 minutos. A atividade da SOD foi determinada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT na presença de luz. Portanto, esta reação foi iniciada pela presença da luz e paralisada pela ausência da mesma. Posteriormente, em uma sala escura foi feita a leitura do produto formado por esta reação, a formazana azul, em espectrofotômetro a 560 nm (Giannopolitis & Reis, 1977 adaptado).

A atividade da CAT foi analisada com 1 mL de meio de reação contendo: 160 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7; 125 µL de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,0125 μmol.L<sup>-1</sup>; 680 μL de água e 35 μL de extrato enzimático. A determinação da atividade enzimática da CAT foi realizada por meio do acompanhamento da queda na absorbância, a 240 nm durante 1 minuto e 30 segundos, com intervalos de 30 segundos e o fator de extinção de 0,0394 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Azevedo et al., 1998 modificado).

Para a atividade da APX, foi utilizado 1 mL de meio de reação composto por 160 μL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7, 100 μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,0125 mol.L<sup>-1</sup>, 100 μL de ácido ascórbico 0,005 mol.L<sup>-1</sup> e 605 μL de água adicionados a 35μL de extrato enzimático. A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da queda na absorbância a 290 nm, durante dois minutos, em intervalos de 30 segundos e com o fator de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Nakano & Asada, 1981 modificado).

#### **4.4 Anatomia radicular**

Foram coletadas raízes de uma planta de cada uma das cinco repetições de cada um dos tratamentos, que em seguida foram lavadas em água corrente para a retirada de impurezas e fixadas em F.A.A. 70% - (formol 37%, ácido acético glacial p.a. e álcool etílico 70% na proporção de 0,5:0,5:9), (Johansen, 1940) por um período de 72 horas e posteriormente conservadas em etanol 70° G.L. (Jensen, 1962).

Cortes transversais foram feitos na região pilífera das raízes das rosetas filhas (crescidas sob contaminação por Cd), com o auxílio do micrótomo manual Ranvier (micrótomo de mesa), utilizando-se isopor como suporte. Em seguida, as secções foram coradas com a mistura de azul de astra – safranina (safrablau), seguindo-se os métodos descritos por Bukatsch, (1972) e Burger & Richter, (1991). Foram montadas lâminas semipermanentes em glicerina a 50% e feita a lutagem com esmalte incolor.

Foram obtidas fotomicrografias com auxílio de uma câmera digital - Canon PowerShot A620 8.0 megapixels, acoplada ao microscópio KEN-A-VISION TT18, para a realização das análises anatômicas no software de medições Image Tool.

A espessura da epiderme, exoderme e endoderme foi avaliada a partir de medições realizadas em cinco pontos distintos de cada fotomicrografia. Foram obtidas cinco fotomicrografias para cada raiz analisada, perfazendo um total de 125 observações por tratamento. Para a análise da porcentagem de aerênquimas no córtex, foi determinada a área total do córtex segundo Pereira et al., (2009), e o somatório das áreas individuais dos aerênquimas. Neste caso foram analisadas cinco fotomicrografias para cada raiz de cada repetição, tendo sido realizadas no total de 25 observações referentes à porcentagem de aerênquimas para cada tratamento.

#### **4.5 Análise estatística**

Para análise do comportamento da atividade das enzimas testadas e para análise das características anatômicas foram feitas análises de variância e de regressão para o fator concentrações de Cd na solução. Para a detecção de diferenças entre os tratamentos foram colocadas barras representativas do erro-padrão da média e realizada a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante

Foi observado aumento significativo da atividade da enzima SOD, tanto nas raízes quanto nas folhas de *Pistia stratiotes*, na presença de Cd em solução nas concentrações iniciais (0,4 e 0,8 mg.L<sup>-1</sup>), de acordo com o incremento de Cd na solução. No entanto, nas concentrações mais elevadas de Cd em solução (1,6 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup>), houve decréscimo em sua atividade, comportamento o qual também foi verificado tanto em raízes, quanto em folhas (Figura 2).

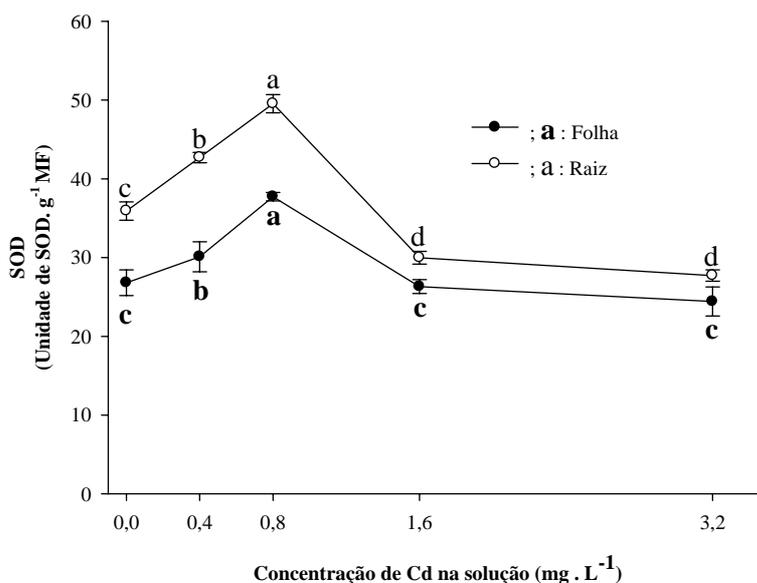


FIGURA 2 Atividade da enzima SOD (unidade de SOD g.MF<sup>-1</sup>) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Cd em solução (mg.L<sup>-1</sup>). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Cd testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

A elevação da atividade da enzima SOD, na presença do elemento Cd, pode ter sido ocasionada pela formação de EROs induzida por este metal. Porém, o decréscimo observado nas maiores concentrações indica que possivelmente o estresse oxidativo ultrapassou a capacidade de controle de EROs pela SOD, resultando em inibição enzimática da mesma, ou por efeito inibitório na via de síntese desta proteína.

A contaminação por elementos-traço desencadeia a produção de EROs como foi constatado em diversos estudos com plantas aquáticas, inclusive com a espécie *P. stratiotes* sob contaminação por cobre (Upadhyay & Panda, 2010) sob concentrações de cromo (Sinha et al., 2005), muitas vezes estimulando o funcionamento do sistema antioxidante, porém em algumas situações o inibindo (Toppi et al., 1999), como no caso de estresse oxidativo severo.

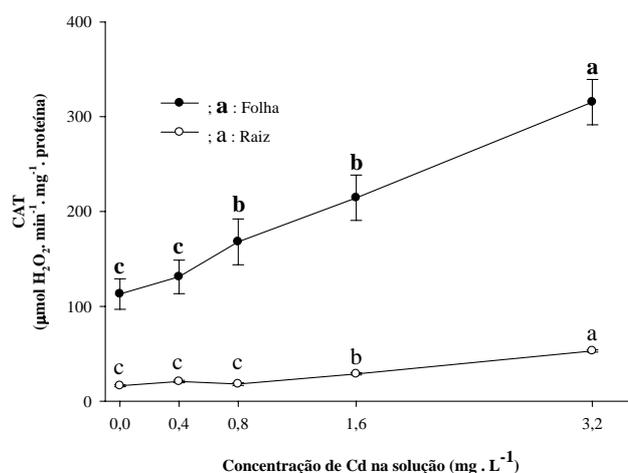


FIGURA 3 Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{proteína}$ ) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Cd em solução ( $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ ). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Cd testadas na solução ( $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ ), pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

A atividade da enzima CAT em plantas de *P. stratiotes* aumentou de acordo com o aumento da concentração de Cd em solução a partir da concentração de 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de Cd, em que sua maior atividade foi encontrada na maior concentração do elemento na solução (Figura 3). Porém nas raízes este aumento foi significativo somente nas maiores doses (1,6 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup>).

Estudos relataram que a contaminação por Cd resulta em estresse oxidativo, porém diferentemente da maioria dos metais, este elemento parece não agir diretamente na produção de espécies reativas de oxigênio a partir das reações de Fenton ou Haber-Weiss (Toppi et al., 1999), na qual é formado o íon superóxido, que poderá ser combatido pela SOD (Resende et al., 2003).

Portanto, se o Cd não está diretamente ligado a formação dos radicais combatidos pela SOD, o decréscimo ocorrido pode não comprometer fatalmente o sistema antioxidante, fato que auxiliado pela maior atividade encontrada nas maiores concentrações pelas enzimas CAT e APX, podem contribuir para a manutenção do funcionamento do sistema antioxidante, devido a esta ação combinada de enzimas, possibilitando desta forma mais um mecanismo de tolerância da espécie a este metal.

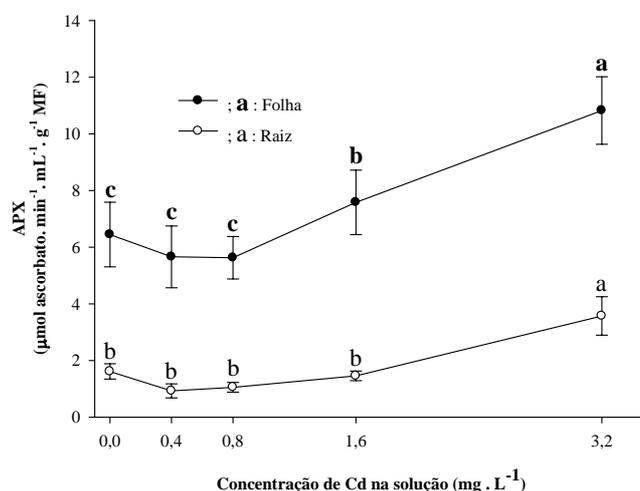


FIGURA 4 Atividade da enzima APX ( $\mu\text{mol ascorbato}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  MF) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Cd em solução ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Cd testadas na solução ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), pelo teste de Scott-Knott ( $p<0,05$ ).

Para a enzima APX, embora tenha sido observado pequeno decréscimo da atividade nos tratamentos iniciais com a presença de Cd ( $0,4$  e  $0,8$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), esta redução não foi significativa, indicando que o estresse oxidativo ocasionado por estas concentrações provavelmente não foi suficiente para estimular o aumento da atividade desta enzima (Figura 4). A partir da concentração de  $1,6$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a atividade da peroxidase do ascorbato, assim como a da catalase foi aumentada com a exposição crescente do elemento para as folhas, e nas raízes este aumento só foi significativo na maior concentração testada ( $3,2$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

A atividade das enzimas CAT e APX foi maior nas folhas do que nas raízes, porém o comportamento dessas enzimas tanto nas folhas quanto nas raízes foi semelhante. No entanto a atividade da enzima SOD nas raízes foi

superior do que nas folhas, demonstrando o mesmo padrão de comportamento em ambos os órgãos analisados.

Pelo fato da SOD ser considerada a primeira linha de defesa do sistema antioxidante, o decréscimo em sua atividade como foi constatado nas concentrações mais altas de Cd em solução, poderia resultar em uma menor capacidade do sistema no combate a EROs. Porém a capacidade do sistema antioxidante em combater os produtos gerados pelo estresse oxidativo depende da ação combinada das enzimas constituintes deste sistema (Chen et al., 2003), fato também observado por meio deste estudo, visto que nas maiores concentrações de Cd, onde a atividade da SOD decresceu, houve um aumento na atividade das enzimas CAT e APX, provavelmente no intuito de manter a ação do sistema antioxidante nestas concentrações do metal, e pela indução da produção de tipos de EROs combatidas pela CAT e APX. Portanto, nas maiores concentrações de Cd, a ação combinada da CAT e APX, aliadas ao aumento de suas atividades tanto nas folhas quanto nas raízes de *P. stratiotes*, indicam boa capacidade do sistema antioxidante da espécie em combater o estresse oxidativo desencadeado pela ação do metal.

## **5.2 Anatomia radicular**

As raízes de *P. stratiotes* são compostas por epiderme unisseriada, córtex, o qual pode ser dividido em externo, mediano e interno e cilindro vascular (Figura 5). A espécie *P. stratiotes* apresenta no córtex externo exoderme uniestratificada não lignificada e não suberizada, e no córtex mediano câmaras de ar, denominadas aerênquimas, neste caso, constitutivos, por se tratar de uma planta aquática, sendo necessários ao suprimento de O<sub>2</sub> às raízes. A endoderme é uniestratificada com presença de estrias de Caspary e o periciclo composto por uma única camada de células.

Algumas espécies aquáticas da família Eriocaulaceae (Coan et al., 2002) e anfíbias da família Cyperaceae (Leite et al., 2009) também utilizam a classificação do córtex como externo, mediano e interno.

Em geral espécies aquáticas apresentam exoderme, nem sempre lignificada ou suberizada, em alguns casos em substituição à epiderme, por esta geralmente ser delgada nestas plantas e, portanto, normalmente rompida e por fim eliminada caso ocorra o crescimento das raízes em diâmetro. Porém, como na maioria das espécies aquáticas o crescimento secundário é incipiente, a epiderme persiste, sendo que a principal função da exoderme em plantas aquáticas é a mesma das plantas terrestres (Bona & Morretes, 2003), ou seja, funcionando como uma barreira apoplástica.

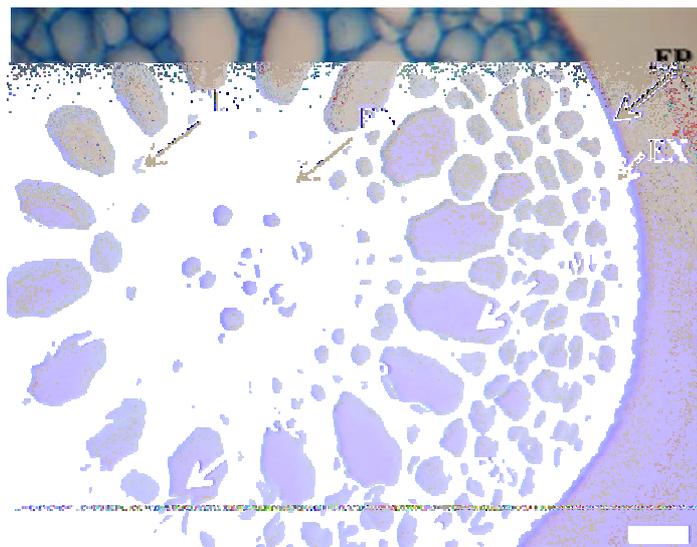


FIGURA 5 Fotomicrografia de secção transversal da zona pilífera da raiz de *Pistia stratiotes*. (EP – epiderme; EX – exoderme; EN – endoderme; CEX – córtex externo; CM – córtex Mediano; CIN – córtex interno; CV – cilindro vascular; ARQ – aerênquima; P – periciclo; X – xilema; F – Floema). UFLA, Lavras – MG, 2009.

A espessura da epiderme não foi alterada significativamente, exceto na concentração mais alta, na qual o espessamento deste tecido foi superior ao encontrado nos demais tratamentos. Este fato pode ter ocorrido em resposta à toxicidade do elemento Cd nesta concentração, como forma de se evitar o excesso deste elemento.

A espessura da exoderme e da endoderme foi aumentada significativamente de acordo com o incremento da concentração de Cd na solução (Figuras 6, 7 e 8). Foi observado também o aumento proporcional de deposição de lignina e/ou suberina na exoderme de acordo com o aumento do metal na solução, provavelmente em resposta à entrada de íons tóxicos (Figura 7), como forma de impedimento ao transporte destes elementos.

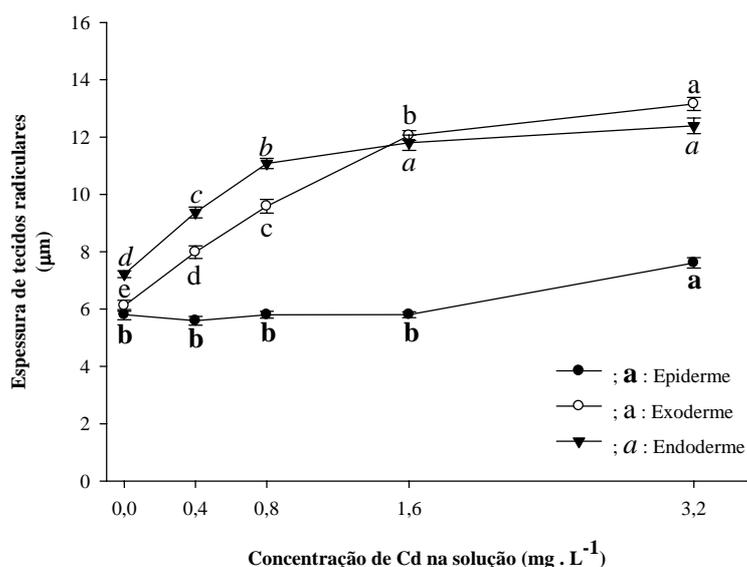


FIGURA 6 Espessura ( $\mu\text{m}$ ) de tecidos radiculares de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Cd em solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Cd testadas na solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

As alterações observadas na exoderme e endoderme podem funcionar como estratégias adaptativas conferindo às plantas de *P. stratiotes* tolerância ao Cd, por formarem barreiras apoplásticas que dificultam a translocação do elemento à parte aérea, reduzindo possíveis danos ao sistema fotossintético, evitando que o crescimento e o desenvolvimento da espécie sejam prejudicados.

Os metais absorvidos pelas raízes sofrem transporte radial na raiz, essencialmente via aposplasto, encontrando na exoderme e endoderme filtros de difusão e regulação. Dessa forma menores concentrações do poluente irão alcançar a parte aérea, o que reduz o efeito danoso as células fotossintéticas e consequentemente o desenvolvimento vegetal (Soares et al., 2001).

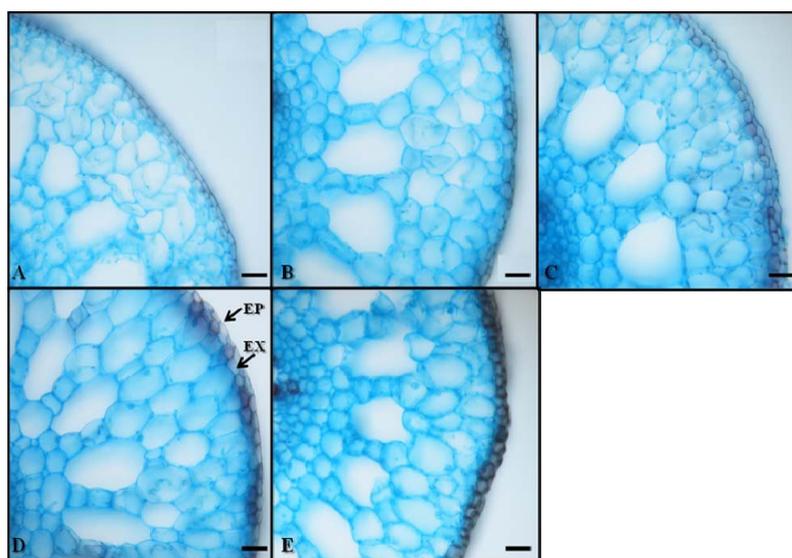


FIGURA 7 Fotomicrografia de secções transversais da zona pilífera de raízes de *Pistia stratiotes* sob a contaminação por Cd. **A** - 0 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **B** - 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **C** - 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **D** - 1,6 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **E** - 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de Cd. **EP**: Epiderme; **EX**: Exoderme. Barra = 30 µm.

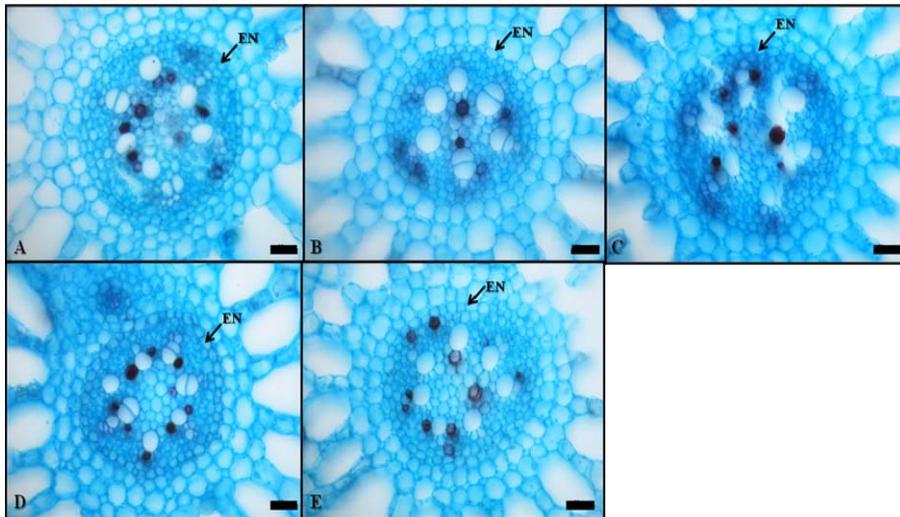


FIGURA 8 Fotomicrografia de secções transversais da zona pilífera de raízes de *Pistia stratiotes* sob a contaminação por Cd. **A** - 0 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **B** - 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **C** - 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **D** - 1,6 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **E** - 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de Cd. **EN**: Endoderme. Barra = 30 µm.

A percentagem de aerênquimas no córtex não apresentou diferenças significativas com a presença do metal (Figura 9) e não foram detectados danos às estas câmaras de ar (Figura 10), o que permitiu a flutuação normal das rosetas, mesmo nas concentrações mais elevadas de Cd, contribuindo para que esta espécie tenha condições de se manter no ambiente aquático, mesmo na presença deste poluente.

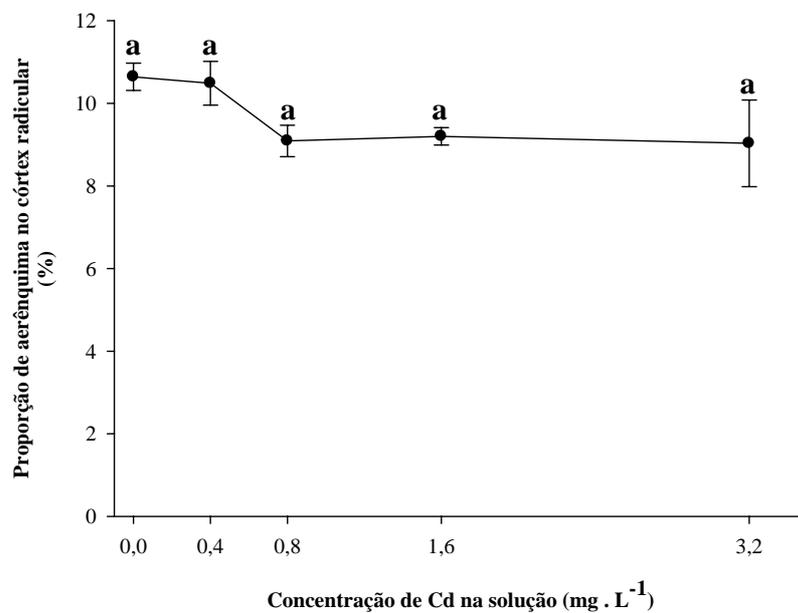


FIGURA 9 Proporção de aerênquimas no córtex radicular de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Cd em solução (mg.L<sup>-1</sup>). As barras representam o erro-padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa entre as médias nas concentrações de Cd testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

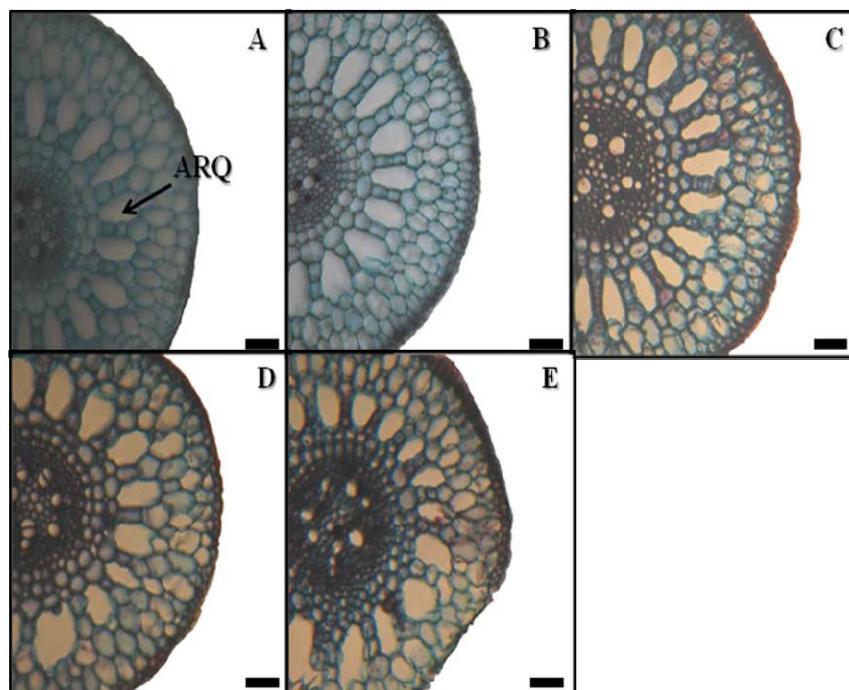


FIGURA 10 Fotomicrografia de secções transversais da zona pelífera de raízes de *Pistia stratiotes* sob a contaminação por Cd. **A** - 0 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **B** - 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **C** - 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **D** - 1,6 mg.L<sup>-1</sup> de Cd; **E** - 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de Cd. **ARQ**: Aerênquima. Barra = 50 µm.

## 6 CONCLUSÕES

O decréscimo observado para a atividade da enzima SOD em detrimento à CAT e APX nas maiores concentrações de Cd, sugerem que nestas concentrações tenha ocorrido a maior produção do tipo de EROs combatidas pela ação conjunta da CAT e APX, demonstrando a capacidade do sistema antioxidante de *P. stratiotes* no combate ao estresse oxidativo desencadeado pela ação deste metal.

O espessamento da exoderme e da endoderme foi detectado proporcionalmente ao aumento de Cd em solução, em resposta a entrada destes íons, funcionando como barreiras apoplásticas.

A ação combinada das enzimas do sistema antioxidante, mantendo a atividade deste sistema e as modificações estruturais observadas nas plantas de *P. stratiotes* submetidas a doses crescentes de Cd, contribui para a tolerância da espécie à contaminação por este metal, como mecanismos adaptativos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p.280-292, Feb. 1998.
- BI, X.; REN, L.; GONG, M.; HE, Y.; WANG, L.; MA, Z. Transfer of cadmium and lead from soil to mangoes in an uncontaminated area, Hainan Island, China. **Geoderma**, Amsterdam, v. 155, n. 1/2, p. 115-120, Feb. 2010.
- BONA, C.; MORRETES, B. L. Anatomia das raízes de *Bacopa salzmanii* (Benth.) Wettst. Ex Edwall e *Bacopa monnierioides* (Cham.) Robinson (Scrophulariaceae) em ambientes aquático e terrestre. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 155-170, jan./mar. 2003.
- BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, Clare, v. 164, n. 1, p. 77-84, Jan. 2003.
- BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2005.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.
- BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 160 p.
- CHEN, Y. X.; HE, Y. F.; LUO, Y. M.; YU, Y. L.; LIN, Q.; WONG, M. H. Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 789-793, Feb. 2003.
- COAN, A. I.; SCATENA, V. L.; GIULIETTI, A. M. Anatomia de algumas espécies aquáticas de Eriocaulaceae brasileiras. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 16, n. 4, p. 371-384, mar. 2002.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular 347).

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principle and practice**. San Francisco: W.H. Freeman, 1962. 408 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

LEITE, K.R.B.; FRANÇA, F.; SCATENA, V.L. Anatomia de espécies anfíbias de Cyperaceae de lagoas do semi-árido, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 3, p. 786-796, 2009.

MISHRA, V. K.; TRIPATHI, B. D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 15, p. 7091-7097, Oct. 2008.

MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R.; MAINE, M. A. Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 58, n. 1, p. 53-61, Jan. 2009.

NAKANO, Y.; ASSADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2008.

PILON- SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 15-39, June 2005

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.

SINHA, S.; SAXENA, R.; SINGH, S. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. **Chemosphere**, Oxford, v.58, n. 5, p. 595-604, Feb. 2005.

SOARES, C. R. F. S.; ACCIOLY, A. M. A.; MARQUES, T. C. L. L. S. M.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 302-315, 2001.

SUÑÈ, N.; SÁNCHEZ, G.; CAFFARATTI, S.; MAINE, M.A. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 2, p. 467-473, Jan. 2007.

TEWARI, A.; SINGH, R.; SINGH, N. K.; RAI, U. N. Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 18, p. 8715–8721, Dec. 2008.

TOPPI, L. S. di; GABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 105–130, Apr. 1999.

UPADHYAY, R.; PANDA, S.K. Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). **Comptes rendus Biologies**, Paris, v. 332, n. 7, p. 623–632, July 2009.

**CAPÍTULO 4**  
**USO DE *Pistia stratiotes* L. COMO FITORREMEIADORA DA**  
**POLUIÇÃO POR CHUMBO**

## 1 RESUMO

O chumbo (Pb) é um dos poluentes ambientais mais conhecidos, por sua persistência no ambiente e por seu efeito nocivo aos ecossistemas e à saúde humana. No entanto, o Pb é considerado também um metal de grande utilidade, sendo empregado de diversas maneiras nos processos industriais, o que tem provocado a contaminação de muitos corpos d'água devido ao lançamento de efluentes poluídos por este metal. O Pb é um elemento não essencial às plantas que pode ser absorvido causando vários danos ao desenvolvimento vegetal, como diminuição do crescimento, inibição da fotossíntese e alterações hormonais. Contudo, muitas plantas são capazes de absorvê-lo e acumulá-lo em seus tecidos, por possuírem mecanismos que permitem tolerância a este elemento, sendo consideradas fitorremediadoras. Com isso, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial fitorremediador de *Pistia stratiotes* frente à contaminação por Pb, analisando-se dados populacionais, diagnose visual e a bioconcentração, o bioacúmulo, a translocação e absorção desse elemento em seus tecidos, afim de fornecer subsídios para a indicação desta espécie para programas de biorremediação. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva e submetidas a concentrações crescentes de Pb: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> pelo período experimental de 15 dias. Ao término deste período, foram feitas as contagens do número de rosetas filhas e inflorescências da roseta mãe, a determinação da biomassa das raízes e parte aérea, observação dos sintomas visuais e análise do teor de Pb na parte aérea e sistema radicular por meio de espectrofotometria de absorção atômica. A planta concentrou teores linearmente crescentes de Pb, principalmente no sistema radicular, de acordo com o aumento da concentração do elemento na solução. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos em relação ao número de rosetas filhas. O número de inflorescências da roseta mãe aumentou de acordo com o aumento da concentração de Pb na solução. Foi detectado pequeno decréscimo na alocação de biomassa por *P. stratiotes* com o aumento da concentração do elemento na solução, embora o crescimento clonal não tenha sido afetado. Pelas concentrações consideráveis de Pb acumuladas nos tecidos de *P. stratiotes*, sem que sua capacidade reprodutiva e morfologia fossem alteradas, a espécie apresenta potencial promissor na utilização em programas de fitorremediação.

**Palavras- chave:** fitorremediação, metal pesado, planta aquática

## 2 ABSTRACT

Lead (Pb) is one of the best-known environmental pollutants, for his persistence in the environment and its negative effect on ecosystems and human health. However, Pb is also considered a widely used metal, being employed in different ways in industrial processes, such use has led to the contamination of many water bodies. Pb is a nonessential element to plants, but which can be absorbed causing extensive damage to plant development, such as reduced growth, photosynthesis inhibition and hormonal changes. However, many plants are able to absorb and accumulate it in their tissues, because they have mechanisms that allow tolerance to this element. Such plants are considered as phytoremediators. Therefore, the objective was to investigate the phytoremediator potential of *Pistia stratiotes* against Pb contamination, analyzing population data, visual diagnosis and bioconcentration of this element in the plant tissues in order to provide additional indication of this species for bioremediation programs. The plants were grown in nutrient solution and submitted to increasing Pb concentrations: 0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup> for the an experimental period of 15 days. At the end of this period, the number of daughter rosettes and number and mother flowers were counted. The determination of root and shoot biomass, visual observation of symptoms were conducted. The Pb level analysis in shoot and root system was conducted by atomic absorption spectrophotometry. The plant concentrated linearly increasing lead levels, especially in the root system, according to the concentration of the solution. There was no significant difference between treatments as to the daughter rosetts number and the mother flower quantity. There was a slight decrease in biomass allocation of *P. stratiotes* with increasing concentrations of the solution, although the clonal growth was not affected. The considerable concentrations of Pb accumulated in the of *P. stratiotes* tissues, without altering its reproductive capacity and morphology, the species has a promising potencial for use in phytoremediation programs.

**Key-words:** phytoremediation, trace element, aquatic plant

### 3 INTRODUÇÃO

A recuperação dos ecossistemas aquáticos contaminados pode ser realizada por processos químicos, físicos ou biológicos. Os agentes químicos responsáveis pela precipitação e redução, e agentes físicos como membranas artificiais, são tecnologias de alto custo, que podem ainda gerar resíduos de difícil eliminação. O método biológico, que utiliza plantas para a retirada de contaminantes da água, a fitorremediação, tem se mostrado uma alternativa eficiente e de baixo custo (Suñe et al., 2007).

O chumbo (Pb) é um elemento-traço amplamente utilizado pela humanidade (Sharma & Dubey, 2005), muitas vezes causando problemas a saúde humana por ser um resíduo tóxico. Atividades de mineração e fundição são as principais fontes de Pb, além de fertilizantes, pesticidas e gasolina (Eick et al., 1999), poluindo lagos, rios e oceanos através de deposição direta da atmosfera ou do escoamento superficial do solo. Uma vez liberado, o Pb possui um longo tempo de residência comparado com a maioria dos poluentes (Alloway, 1993).

O Pb é um elemento não-essencial, porém possui alta taxa de absorção e acúmulo em vegetais, com isso, são vários os estudos que tem demonstrado a capacidade de vegetais acumularem concentrações consideráveis deste metal em seus órgãos, principalmente na raiz (Sharma & Dubey, 2005), por se tratar de um elemento pouco mobilizado para a parte aérea.

Diversas espécies aquáticas tem sido utilizadas como fitorremediadoras de Pb. Porém, seus mecanismos e graus de tolerância são variáveis de espécie para espécie (Miretzky et al., 2004).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi verificar o potencial fitorremediador de *Pistia stratiotes* frente à contaminação por Pb, analisando-se dados populacionais, diagnose visual e a bioconcentração desse elemento em

seus tecidos, a fim de fornecer subsídios para a indicação desta espécie para programas de biorremediação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do material vegetal

Para a realização do experimento de diagnose visual, análise populacional, absorção e acúmulo do elemento Pb, rosetas de *P. stratiotes* foram coletadas em uma lagoa artificial, livre de suspeita de contaminação por Pb no município de Lavras – MG (44° 55' W; 21° 05' S). Após a coleta, as plantas foram lavadas em água corrente a fim de eliminar partículas indesejadas. Posteriormente, as plantas foram selecionadas quanto à sua qualidade fitossanitária e por uniformidade de tamanho. Depois de feita esta seleção, as rosetas foram cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde inicialmente passaram por um período de aclimatização, sendo cultivadas em bandejas plásticas com capacidade de 20 L, contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total, até a quinta geração clonal de plantas, para a eliminação de resíduos do elemento-traço que porventura pudessem estar presentes nas plantas matrizes coletadas do ambiente. O período de desenvolvimento de cada geração clonal foi de 15 dias.

### 4.2 Instalação do Experimento

Após a aclimatização, as plantas da quinta geração clonal foram selecionadas quanto ao tamanho e transferidas para recipientes individuais, contendo 4 L da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) como descrita para a aclimatização, contendo concentrações crescentes de Pb na forma de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ .

Os valores das concentrações de Pb utilizadas para os diferentes tratamentos foram obtidos com base no valor máximo permitido (VMP) de Pb total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce (Brasil, 2005). Neste caso, o VMP segundo esta legislação é de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de Pb.

TABELA 1 Concentração de Pb utilizada na solução para cada tratamento.

Tratamento	Concentrações de Pb ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Percentual do VMP (%)
<b>T1 (Controle)</b>	0,0	0
<b>T2</b>	0,5	100
<b>T3</b>	1,0	200
<b>T4</b>	2,0	400
<b>T5</b>	4,0	800

Foram eliminadas todas as estruturas reprodutivas das plantas antes da imposição dos tratamentos. As plantas foram submetidas aos tratamentos por um período de 15 dias, após o qual, foram realizadas as análises. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos com cinco repetições, com a parcela experimental composta por três rosetas.

#### **4.3 Crescimento clonal, número de estruturas reprodutivas e determinação da biomassa**

O crescimento clonal foi determinado pela contagem do número de rosetas filhas ao final do período experimental. Para a determinação da biomassa, foi realizada a separação da parte aérea e sistema radicular, que foram secas em estufa durante 72 horas, a  $60^\circ\text{C}$  até peso constante, sendo posteriormente pesadas em balança analítica. O número de inflorescências da roseta mãe foi contado ao término do período experimental.

#### **4.4 Diagnose visual**

As alterações na morfologia externa foram observadas diariamente e registradas ao final do experimento, com auxílio de uma câmera digital.

#### **4.5 Bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de chumbo**

A fim de determinar as concentrações de Pb, 0,5 e 1,0 g de matéria seca de raízes e da parte aérea, respectivamente, obtidos no processo de secagem para análise de alocação da biomassa, que foram posteriormente trituradas em moinho do tipo Wiley. Estas alíquotas foram digeridas em 10 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e aquecidos em forno de microondas, durante 10 minutos, à pressão de 0,76 MPa. Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado para 20 mL com água destilada. A digestão das amostras foi feita segundo o protocolo do método 3051 A da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 1998).

A determinação da concentração de Pb nas amostras foi obtida por meio de espectrofotômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite utilizando o equipamento AAnalyst 800 da Perkin Elmer.

Cada bateria de análise continha uma amostra em branco com a finalidade de controle de qualidade do método de extração e determinação deste elemento-traço. A amostra em branco foi obtida utilizando-se o mesmo procedimento de digestão, porém contendo somente o HNO<sub>3</sub>. A leitura desta amostra determinou o branco do método, que foi utilizado no cálculo do limite de detecção do método (LDM), que por sua vez, foi utilizado para calcular o limite de quantificação do método (LQM). Como material de referência foram utilizadas amostras da solução nutritiva acrescidas do elemento-traço nas concentrações representativas de cada tratamento.

O acúmulo de Pb nos tecidos de *P. stratiotes* foi calculado com base nas concentrações encontradas e produção de biomassa. A eficiência de translocação e absorção do Pb foram calculadas utilizando-se as seguintes fórmulas:

Translocação do Pb:

$$(\text{acúmulo de Pb na parte aérea}) / (\text{acúmulo total de Pb na planta}) \times 100$$

Absorção de Pb:

$$(\text{acúmulo total de Pb na planta}) / (\text{matéria seca das raízes})$$

#### **4.6 Análise estatística**

Os valores dos dados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão para a detecção de diferenças entre as crescentes concentrações de Pb na solução. A fim de verificar a diferença entre os tratamentos para os parâmetros número de rosetas filhas e número de inflorescências da roseta mãe, foram utilizadas barras correspondentes ao erro-padrão da média e realizada a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Crescimento clonal, número de estruturas reprodutivas, diagnose visual e biomassa

O aparecimento de novas rosetas foi detectado a partir do quinto dia em todos os tratamentos, indicando ausência de atraso na taxa de multiplicação evidenciando que o Pb não afetou a propagação vegetativa de *P. stratiotes* nas concentrações testadas. Porém o número de inflorescências na roseta mãe apresentou aumento significativo de acordo com o aumento do metal na solução. Este processo pode ter sido estimulado pelo início da sinalização de estresse, na tentativa de evitação desta condição a fim de perpetuar a espécie (Figura 1).

Em condições de estresse a espécie *P. stratiotes* tende a investir em sua reprodução assexuada em detrimento da via preferencial vegetativa (Coelho et al., 2005), porém o estímulo a redução de investimento para a propagação vegetativa provavelmente ocorrerá em resposta a toxicidade do agente estressor, o que não foi percebido neste caso.

Embora a redução da biomassa tenha sido pequena, ocorreu de forma inversamente proporcional a concentração de Pb na solução. Do tratamento sem Pb para a primeira concentração de Pb na solução houve queda de apenas 4,36 e 0,5% na alocação de biomassa das raízes e parte aérea, respectivamente (Figura 2).

Não foram detectados sintomas de deficiências nas plantas em nenhuma das concentrações testadas (Figura 3).

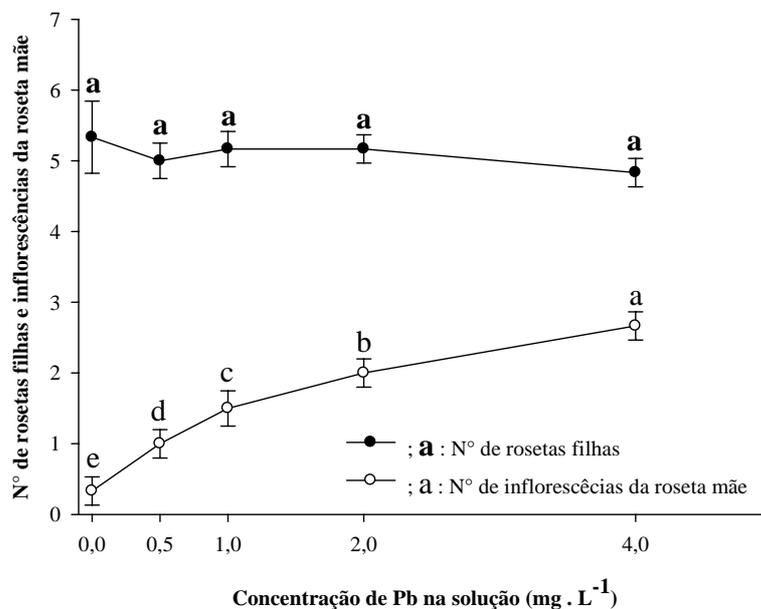


FIGURA 1 Crescimento clonal e número de estruturas reprodutivas de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de Pb na solução (mg.L<sup>-1</sup>). As barras representam o erro padrão da média. Letras distintas na mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Pb testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

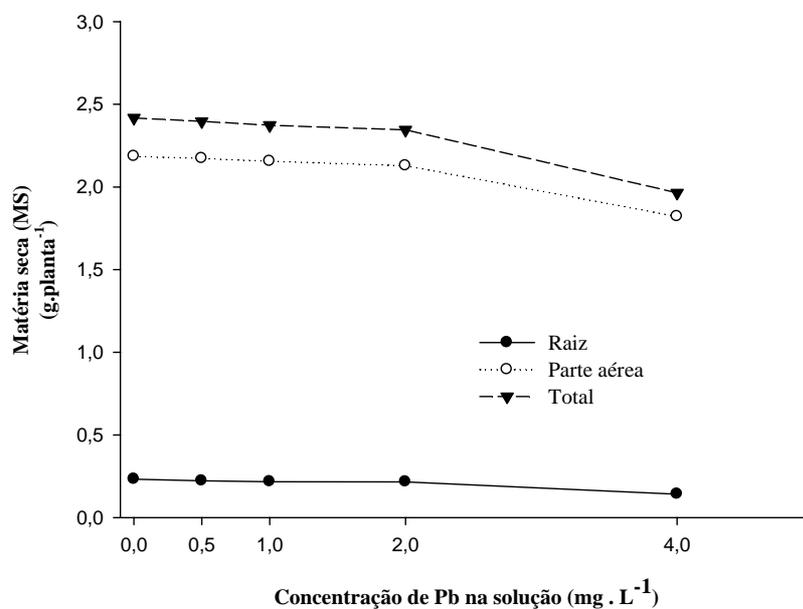


FIGURA 2 Biomassa da raiz (g.planta<sup>-1</sup>), parte aérea e total de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de Pb na solução (mg.L<sup>-1</sup>). Biomassa raiz ( $R^2 = 0,8838$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 0,2386 - 0,0217x$ ), parte aérea ( $R^2 = 0,8831$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 2,2290 - 0,0911x$ ) e total ( $R^2 = 0,8852$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 2,4081 - 0,1127x$ ).



FIGURA 3 Plantas de *Pistia stratiotes* submetidas a doses crescentes de Chumbo. (A – 0, mg.L<sup>-1</sup> de Pb; B – 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; C – 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; D – 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; E – 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb). Barra = 30 cm.

## 5.2 Bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de chumbo

Em todas as concentrações testadas para o elemento Pb em solução, foram encontradas concentrações superiores ao limite de quantificação do método (LQM), exceto para o tratamento controle. Portanto, na presença Pb

houve a possibilidade de quantificação de suas concentrações na raiz e na parte aérea de *P. stratiotes*. O LQM calculado para o Cd foi de 0,743 mg.L<sup>-1</sup>.

A espécie *P. stratiotes* demonstrou alto potencial para a extração e acúmulo de Pb da solução nutritiva, concentrando e acumulando quantidades consideráveis deste elemento em seus tecidos, principalmente em seu sistema radicular (Figura 4 e 5), sem causar nenhum sintoma visual. Por este ser o órgão responsável pela absorção do poluente, podendo retê-lo em grande parte em seus tecidos por meio de barreiras apoplásticas, no intuito de se evitar que o mesmo seja translocado para a parte aérea afetando o processo fotossintético e assim comprometendo o desenvolvimento da planta. Em todos os tratamentos com a presença de Pb, o sistema radicular foi responsável por aproximadamente 96% da concentração total do poluente (Figura 4B), o que demonstra uma correlação linear positiva entre as concentrações de Pb concentradas nas raízes e as concentrações iniciais de Pb em solução.

Vários trabalhos realizados com diversas plantas aquáticas relataram que a translocação de Pb para a parte aérea é baixa, contribuindo para o maior acúmulo do elemento no sistema radicular (Maine et al., 2001). Estes dados corroboram com os resultados encontrados neste estudo, em que a eficiência de translocação não apresentou correlação com o aumento das doses, além de apresentar uma baixa porcentagem quando comparadas a outros elementos fitoextraídos (Figuras 6).

Com relação à eficiência na absorção, foi observado que esta aumentou linearmente de acordo com o aumento da concentração de Pb na solução (Figura 7), indicando que nas concentrações testadas a planta não exibiu restrições à absorção e acúmulo deste elemento.

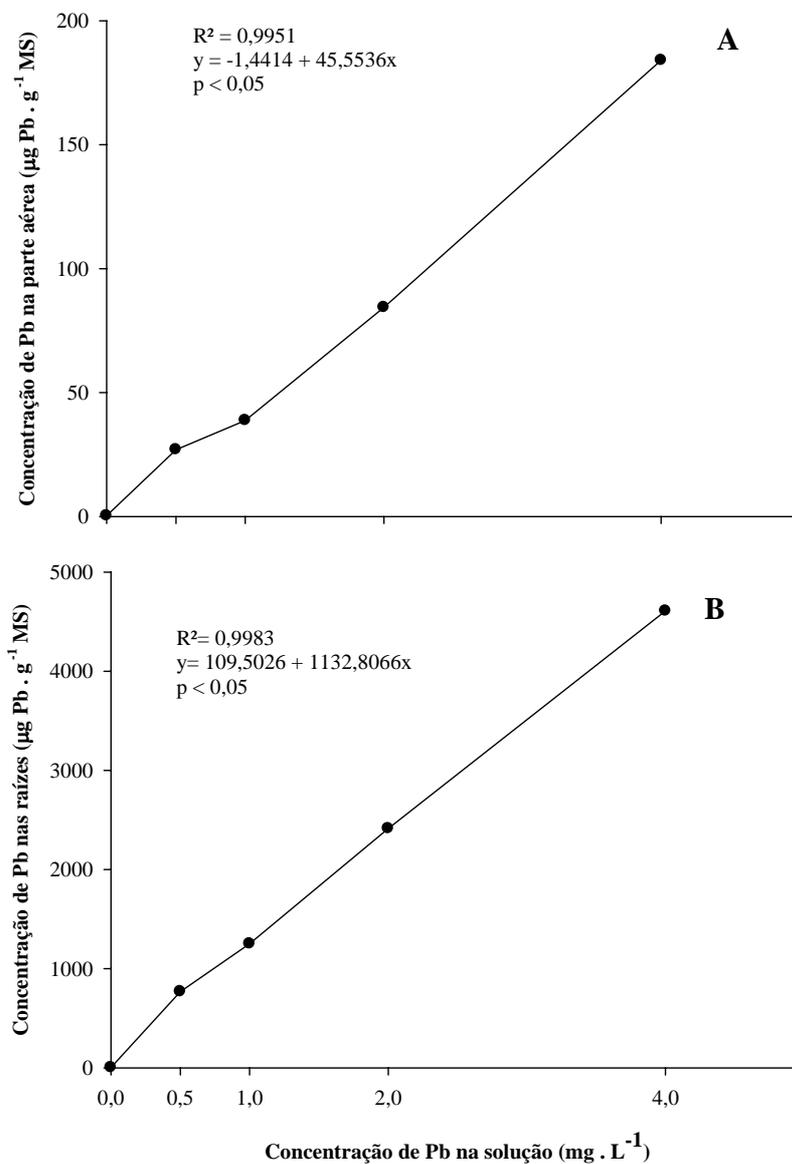


FIGURA 4 Concentrações acumuladas de Pb em *Pistia stratiotes* ( $\mu\text{g}$  de  $\text{Pb} \cdot \text{g}^{-1}$  MS). A: Concentração acumulada na parte aérea; B: Concentração acumulada no sistema radicular.

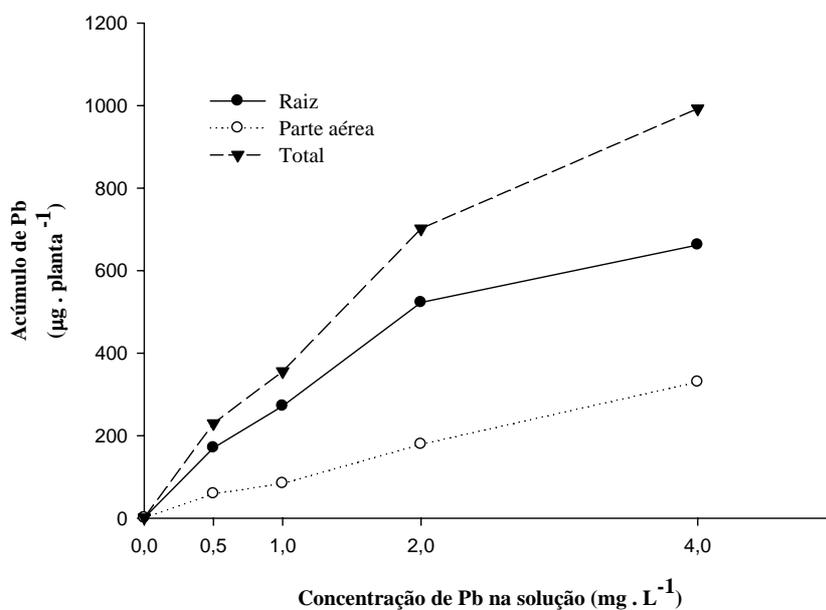


FIGURA 5 Bioacúmulo de Pb em *Pistia stratiotes* ( $\mu\text{g} \cdot \text{planta}^{-1}$ ). Acúmulo raiz ( $R^2 = 0,9199$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 0,0118 + 84,2858x$ ), parte aérea ( $R^2 = 0,9959$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 8,678 + 81,2627x$ ) e total ( $R^2 = 0,9524$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 92,96 + 242,22x$ ).

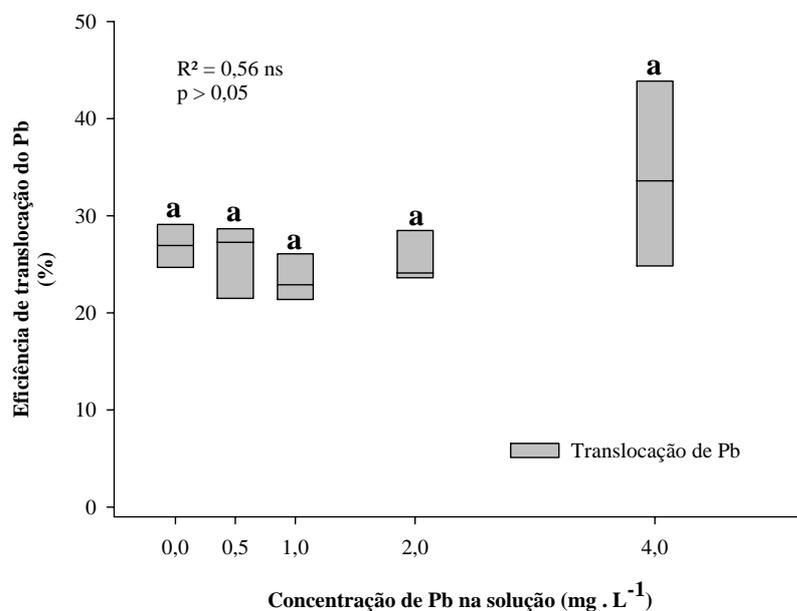


FIGURA 6 Eficiência na translocação de Pb em *Pistia stratiotes*. Letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre as médias nas concentrações de Pb testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

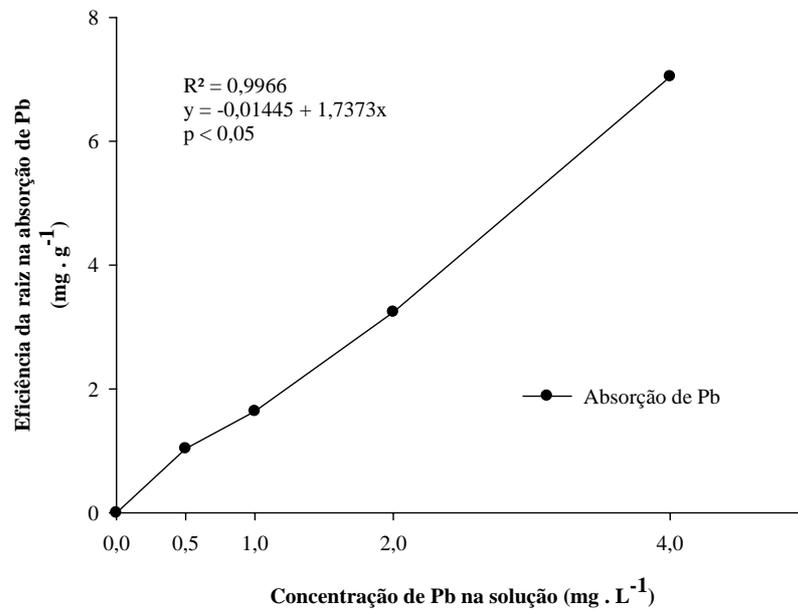


FIGURA 7 Eficiência das raízes de *Pistia stratiotes* na absorção de Pb (mg.g<sup>-1</sup>) nas diferentes concentrações de Pb em solução (mg.L<sup>-1</sup>).

## 6 CONCLUSÕES

Devido à capacidade de *P. stratiotes* concentrar e acumular altos teores de Pb em suas raízes, sem no entanto provocar danos morfológicos e diminuição no crescimento clonal, é uma espécie que satisfaz a um grande número de requisitos de uma planta fitorremediadora, apresentando portanto, grande potencial de indicação para programas de fitorremediação de ecossistemas aquáticos poluídos por Pb.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New Delhi: Blackie Academic & Professional, 1993. 339 p.

BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2005.

COELHO, F. F.; DEBONI, L.; LOPES, F. S. Density-dependent reproductive and vegetative allocation in the aquatic plant *Pistia stratiotes* (Araceae). **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 53, n. 3/4, p. 369-376, Sept./Dec. 2005.

EICK, M. J.; PEAK, J. D.; BRADY, P. V.; PESEK, J. D. Kinetics of lead adsorption/desorption on goethite: residence time effect. **Soil Science**, Baltimore, v. 164, n. 1, p. 28-39, Jan. 1999.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular 347).

MAINE, M. A.; DUARTE, M. V.; SUÑÉ, N. L. Cadmium uptake by floating macrophytes. **Water Research**, New York, v. 35, n. 11, p. 2629-2634, Aug. 2001.

MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; CIRELLI, A. F. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). **Chemosphere**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 997-1005, Nov. 2004

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plant. **Brazilian Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 35-52, jan./mar. 2005.

SUÑÉ, N.; SÁNCHEZ, G.; CAFFARATTI, S.; MAINE, M.A. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 2, p. 467-473, Jan. 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3051 A: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: \_\_\_\_\_. **SW – 864**: test methods for evaluating solid waste, physical and chemical methods. Washington, 1998. 20p.

**CAPÍTULO 5**  
**EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO SOBRE A**  
**ESTRUTURA RADICULAR E SISTEMA ANTIOXIDANTE DE *Pistia***  
***stratiotes* L.**

## 1 RESUMO

O chumbo (Pb) é um elemento-traço não essencial às plantas, capaz de prejudicar o metabolismo das mesmas, podendo causar diminuição do crescimento, mudanças estruturais e danos às membranas pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Porém as plantas podem desenvolver mecanismos de tolerância a este poluente, por meio de modificações anatômicas que impeçam a translocação desse elemento, evitando a inibição do processo fotossintético e por meio da ativação de enzimas do sistema antioxidante, combatendo as EROs. Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar a atividade das enzimas antioxidantes peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e a anatomia radicular de plantas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Pb, visando a detecção de mecanismos de tolerância da espécie ao metal, que contribuam para o seu potencial fitorremediador. Indivíduos de *P. stratiotes* foram cultivados em solução nutritiva e submetidos a diferentes concentrações de Pb: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> por um período experimental de 15 dias. Ao fim desse período, foram realizadas avaliações da anatomia radicular e o ensaio da atividade das enzimas antioxidantes APX, CAT e SOD. A atividade da CAT, APX e SOD aumentou em ambas as partes da planta com a presença de Pb até a concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup>, por indução enzimática como resposta à ação tóxica deste elemento. Nas maiores concentrações, o Pb promoveu redução na atividade das enzimas, indicando, possivelmente, que o estresse oxidativo ultrapassou a capacidade de controle de EROs por meio destas enzimas, resultando em inibição enzimática das mesmas, ou por efeito inibitório na via de síntese destas proteínas. Alterações estruturais como espessamento de exoderme e endoderme, foram detectadas nas raízes de *P. stratiotes* na presença de Pb em solução. Essas modificações estruturais podem funcionar como um mecanismo de plasticidade morfológica desses indivíduos à contaminação por esse elemento-traço, contribuindo para a tolerância da espécie frente à contaminação por Pb.

**Palavras-chave:** anatomia radicular, enzimas antioxidantes, planta aquática, elemento-traço.

## 2 ABSTRACT

Lead (Pb) is a trace element not essential to plants and can affect their metabolism, may cause reduced growth, structural changes and damage to membranes by the formation of reactive oxygen species (ROS). However, plants can develop tolerance mechanisms to this pollutant, by means of anatomical changes that prevent the translocation of this element, preventing the inhibition of the photosynthetic process and through the activation of the antioxidant enzyme system by combating the ROS. In light of this, this study aimed to evaluate the antioxidant enzyme activity of ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and the root anatomy of the *Pistia stratiotes* plants under increasing Pb concentrations, aimed at detecting species tolerance mechanisms to the metal, which contribute to their potential as a phytoremediators. Individuals of *P. stratiotes* were grown in nutrient solution and subjected to different concentrations of Pb: 0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup> for a trial period of 15 days. At the end of this period, assessments were made of the root anatomy and the activity of the antioxidant enzymes APX, CAT and SOD. The CAT, APX and SOD activity increased in roots and leaves with the presence of Pb concentrations of up to 1mg.L<sup>-1</sup> by enzyme induction as a response to the toxic action of this element. At higher concentrations, Pb promoted the reduction in enzyme activity, possibly indicating that oxidative stress has exceeded the control of ROS by these enzymes, resulting in their inhibition, or inhibitory effect in synthesis of these proteins. Structural changes such as thickening of exodermis and endodermis, were detected in the roots of *P. stratiotes* in the presence of Pb in solution. These structural changes can serve as a mechanism for phenotypic plasticity of individuals due to contamination by the trace element, contributing to the species tolerance to Pb contamination.

**Key-words:** root anatomy, antioxidant enzymes, aquatic plant, trace element.

### 3 INTRODUÇÃO

O elemento-traço chumbo (Pb) tem sido considerado como um dos metais mais perigosos ao ambiente, devido à sua ação tóxica à animais, plantas e seres humanos, sendo ainda um elemento bioacumulativo. A contaminação de Pb em humanos e animais se dá principalmente por alimentos e água contaminados com este metal, provocando efeitos adversos nestes organismos (Bi et al., 2010; Sharma & Dubey, 2005).

As principais fontes de poluição por Pb são em decorrência de suas aplicações, como resíduos de indústrias mineradoras, siderúrgicas, aeronáuticas, têxteis, de fundição, refinarias de petróleo, de material fotográfico, vidros, cerâmicas e explosivos, pelo uso do metal em revestimento e acabamento, uso de compostos que o contêm como fertilizantes e pesticidas e como aditivos em tintas e gasolina, além de baterias (Sharma & Dubey, 2005; Lalhruaitluanga et al., 2010). Desta forma, o metal traço pode ser lixiviado para a superfície e por meio de fluxos de água, contaminar o solo e ecossistemas aquáticos (Sharma & Dubey, 2005).

O Pb é um elemento não-essencial ao seres humanos, plantas e animais, podendo ser prontamente introduzido na cadeia trófica (Kabata-Pendias, 2004; Bi et al., 2010).

Nos vegetais, a contaminação por elementos-traço como o Pb, em geral provoca uma série de alterações no metabolismo fotossintético e na absorção de nutrientes, afetando seu crescimento e desenvolvimento, sendo portanto, considerado um elemento não essencial às plantas (Misrha & Tripathi, 2008).

A exposição de plantas à contaminação por elementos-traço pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, os quais podem causar a peroxidação lipídica, aumento na produção de proteínas carboniladas e aldeídos

reativos que podem causar a distorção das camadas lipídicas de membranas (Tewari et al., 2008), modificando sua atividade enzimática e de transporte.

Em resposta à contaminação por elementos-traço, os vegetais podem apresentar alterações na estrutura interna de raízes, que estão diretamente ligadas às exigências ecológicas e fisiológicas, como capacidade de absorção de água e nutrientes, podendo afetar e adquirir tolerância a ambientes aquáticos contaminados (Pilon-Smith, 2005; Mufarrege et al., 2009).

Com isso, o presente trabalho objetivou avaliar a estrutura interna radicular e a atividade das enzimas do sistema antioxidante peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), em plantas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Pb, com intuito de detectar estratégias de tolerância da espécie a este poluente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do material vegetal

A obtenção das rosetas de *P. stratiotes* foi feita em uma lagoa artificial, livre de suspeita de contaminação por Pb no Município de Lavras – MG (44° 55' W; 21° 05' S). Após a coleta, as plantas foram lavadas em água corrente para eliminação de impurezas e selecionadas pelo tamanho e por boas condições fitopatológicas. Posteriormente, foram transferidas para casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde inicialmente passaram por um período de aclimatização, sendo cultivadas em bandejas plásticas com capacidade para 20 L, contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total, até a quinta geração clonal de plantas, para a eliminação de resíduos do elemento-traço que porventura pudessem estar presentes nas plantas matrizes coletadas do ambiente. O período de desenvolvimento de cada geração clonal foi de 15 dias.

### 4.2 Imposição dos tratamentos

Após o período de aclimatização, as plantas da quinta geração clonal foram selecionadas quanto à uniformidade do tamanho e transferidas para recipientes individuais, contendo 4 L da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) como descrita para a aclimatização, contendo concentrações crescentes de Pb na forma de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ : 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Pb. Os valores das concentrações de Pb utilizadas para os diferentes tratamentos foram obtidos com base no valor máximo permitido (VMP) de Pb total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce (Brasil, 2005). Neste caso, o VMP segundo esta resolução é de 0,5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Pb.

Foram montados experimentos distintos para as análises anatômicas e para o ensaio das atividades enzimáticas.

As plantas foram submetidas aos tratamentos por um período de 15 dias, após o qual, foram realizadas as coletas para posteriores análises. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos com cinco repetições, com a parcela experimental composta por uma roseta.

#### **4.3 Atividade das enzimas do sistema antioxidante**

Ao término do período experimental foram coletados, no período da manhã, cerca de 1,5 g de matéria fresca de raízes e de folhas separadamente, os quais foram em seguida envolvidos por papel alumínio e acondicionados em caixa de isopor, até a chegada ao laboratório onde o material foi mantido a  $-86^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização no processo de extração enzimática.

Para a extração das enzimas SOD (EC 1.15.1.1), CAT (EC 1.11.1.6) e APX (EC 1.11.1.11), foram utilizados 0,5 g de raízes e folhas, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido e 2 mL de tampão de extração contendo: 1,924 mL de tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e pH 7;  $40 \mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$   $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $20 \mu\text{L}$  de EDTA  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $8 \mu\text{L}$  de DTT  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $16 \mu\text{L}$  de PMSF  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e 40 mg de PVPP. Após o processo de maceração, o material foi centrifugado a 14000 RPM, por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante no qual permaneceram as enzimas foi coletado e o pellet descartado. As amostras foram mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante todo o procedimento (Bor et al., 2003 adaptado). O mesmo extrato enzimático foi utilizado para o ensaio da atividade das três enzimas analisadas.

Para o ensaio enzimático da atividade da SOD foi utilizado o volume final de 3 mL do meio de reação contendo: 1,5 mL de tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e pH 7,8;  $30 \mu\text{L}$  de EDTA  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ;  $4,5 \mu\text{L}$  de *Nitro Blue*

*Tetrazolium* (NBT) 50 mmol.L<sup>-1</sup>; 156 µL de metionina 0,25 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7,8; 60 µL de riboflavina 100 µmol.L<sup>-1</sup> e 1,2295 mL de água acrescidos a 20 µL do extrato enzimático. A reação foi realizada em uma câmara com luz fluorescente de 15 watts na qual foram expostos tubos de vidro contendo o meio de reação por um período de 10 minutos. A atividade da SOD foi determinada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do NBT na presença de luz. Portanto, esta reação foi iniciada pela presença da luz e paralisada pela ausência da mesma. Posteriormente, em uma sala escura foi feita a leitura do produto formado por esta reação, a formazana azul, em espectrofotômetro a 560 nm (Giannopolitis & Reis, 1977 adaptado).

A atividade da CAT foi analisada com 1 mL de meio de reação contendo: 160 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7; 125 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,0125 µmol.L<sup>-1</sup>; 680 µL de água e 35 µL de extrato enzimático. A determinação da atividade enzimática da CAT foi realizada por meio do acompanhamento da queda na absorbância, a 240 nm durante 1 minuto e 30 segundos, com intervalos de 30 segundos e o fator de extinção de 0,0394 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Azevedo et al., 1998 modificado).

Para a atividade da APX, foi utilizado 1 mL de meio de reação composto por 160 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7, 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,0125 mol.L<sup>-1</sup>, 100 µL de ácido ascórbico 0,005 mol.L<sup>-1</sup> e 605 µL de água adicionados a 35 µL de extrato enzimático. A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da queda na absorbância a 290 nm, durante dois minutos, em intervalos de 30 segundos e com o fator de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Nakano & Asada, 1981 modificado).

#### **4.4 Anatomia radicular**

Foram coletadas raízes de uma planta de cada uma das cinco repetições de cada um dos tratamentos, que em seguida foram lavadas em água corrente

para a retirada de impurezas e fixadas em F.A.A. 70% - (formol 37%, ácido acético glacial p.a. e álcool etílico 70% na proporção de 0,5:0,5:9), (Johansen, 1940) por um período de 72 horas e posteriormente conservadas em etanol 70° G.L. (Jensen, 1962).

Cortes transversais foram feitos na região pilífera das raízes das rosetas filhas (crescidas sob contaminação por Pb), com o auxílio do micrótomo manual Ranvier (micrótomo de mesa), utilizando-se isopor como suporte. Em seguida, as secções foram coradas com a mistura de azul de astra – safranina (safrablau), seguindo-se os métodos descritos por Bukatsch, (1972) e Burger & Richter (1991). Foram montadas lâminas semipermanentes em glicerina a 50% e feita a lutagem com esmalte incolor.

Foram obtidas fotomicrografias com auxílio de uma câmera digital - Canon PowerShot A620 8.0 megapixels, acoplada ao microscópio KEN-A-VISION TT18, para a realização das análise anatômicas no software de medições Image Tool.

A espessura da epiderme, exoderme e endoderme foi avaliada a partir de medições realizadas em cinco pontos distintos de cada fotomicrografia. Foram obtidas cinco fotomicrografias para cada raiz analisada, perfazendo um total de 125 observações por tratamento. Para a análise da porcentagem de aerênquimas no córtex, foi determinada a área total do córtex segundo Pereira et al. (2009), e o somatório das áreas individuais dos aerênquimas. Neste caso foram analisadas cinco fotomicrografias para cada raiz de cada repetição, tendo sido realizadas no total de 25 observações referentes à porcentagem de aerênquimas para cada tratamento.

#### **4.5 Análise estatística**

Foram realizadas análises variância e de regressão para possibilitar o estudo das características analisadas. Para a detecção de possíveis diferenças

entre os tratamentos foram colocadas barras representativas do erro-padrão da média e realizada a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante

A atividade da enzima SOD não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento sem Pb, exceto na concentração de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  nas folhas e nas concentrações de  $0,5$  e  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  nas raízes (Figura1). Nestas concentrações de Pb, o sistema antioxidante pode ter sido estimulado pelo aumento na formação de espécies reativas de oxigênio ocasionadas pela contaminação com Pb, ou por este metal funcionar como um possível sinalizador da síntese de novas enzimas SOD.

Como os mecanismos de detoxificação de metais por meio do sistema antioxidante são variados, é preciso estabelecer se a exposição aos elementos-traço está tendo efeito prejudicial ou servindo de estímulo do sistema antioxidante. Portanto, essa diferenciação depende da quantidade de EROs formada, pois se estiver sendo formada em baixos níveis, funcionará como estimulante do sistema como resposta adaptativa, contudo em altas concentrações, pode iniciar o processo de morte celular ocasionando danos aos tecidos e o aparecimento de sintomas visuais (Benavides et al., 2005).

Pelo aumento seguido de decréscimo, este trabalho sugere que nas concentrações iniciais de Pb este atua como um estimulante da atividade da SOD, e após estas concentrações, sugere que o a produção de EROs esteja superior a capacidade desta enzima em combatê-los (Figura 1).

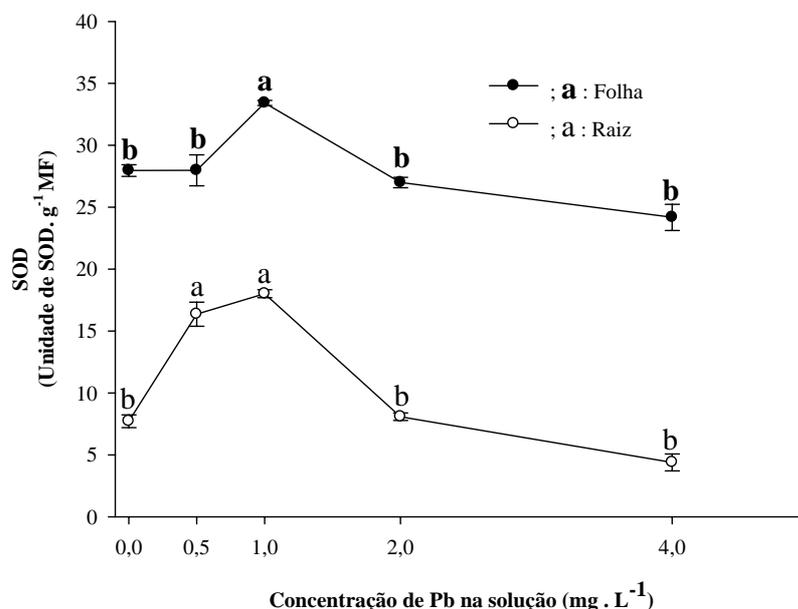


FIGURA 1 Atividade da enzima SOD (unidade de SOD g.MF<sup>-1</sup>) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Pb mg.L<sup>-1</sup>). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Pb testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

A atividade da enzima CAT não teve diferenças significativas nas folhas exceto na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Pb, na qual provavelmente deve ter ocorrido o estímulo de sua atividade pela produção de EROs em decorrência da contaminação por Pb, seguida de decréscimo em sua atividade. Nas raízes, foi observado o decréscimo na atividade da CAT nas maiores concentrações de Pb em solução (2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) (Figura 2). Em ambos os casos a diminuição na atividade da CAT deve ter ocorrido provavelmente pela produção de EROs ter sido superior à capacidade de controle da CAT em combatê-los.

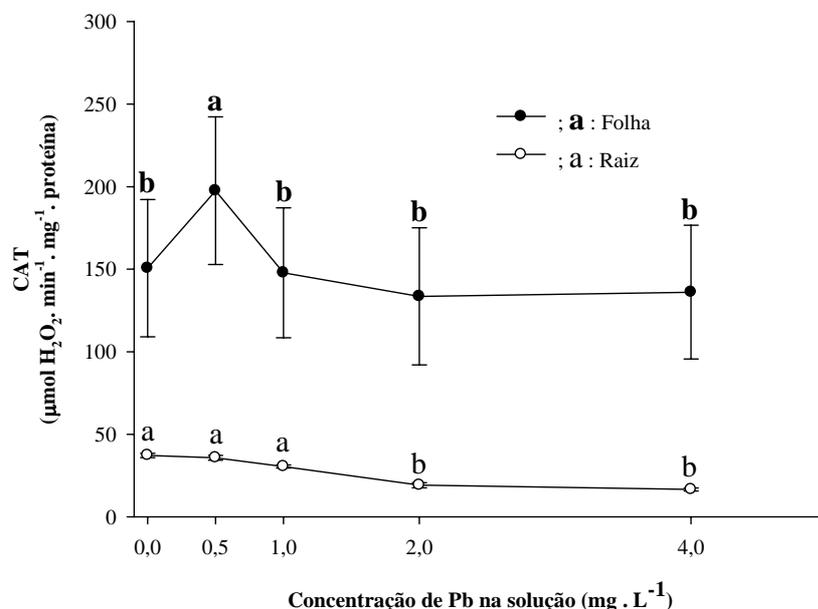


FIGURA 2 Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{proteína}$ ) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Pb ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Pb testadas na solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

A APX não apresentou diferença significativa em sua atividade nas raízes (Figura 3). Nas folhas, a atividade da APX teve um aumento significativo na primeira concentração de Pb testada ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), seguida de decréscimo em sua atividade de acordo com o aumento na concentração de Pb na solução, indicando que provavelmente acima da concentração de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de Pb ocorra inibição enzimática por formação excessiva de EROs.

Foram observados em estudos com plântulas de cevada sob concentrações de elementos-traço aumento da atividade da APX nas

concentrações iniciais, seguido por decréscimo na atividade desta enzima de acordo com o aumento da concentração do metal no meio de cultivo (Hegedus et al., 2001), corroborando com os dados encontrados nesse experimento. Segundo Toppi & Gabrielli (1999), a presença de elementos-traço pode alterar a atividade das enzimas antioxidantes tanto positivamente as estimulando, como de forma negativa as inibindo.

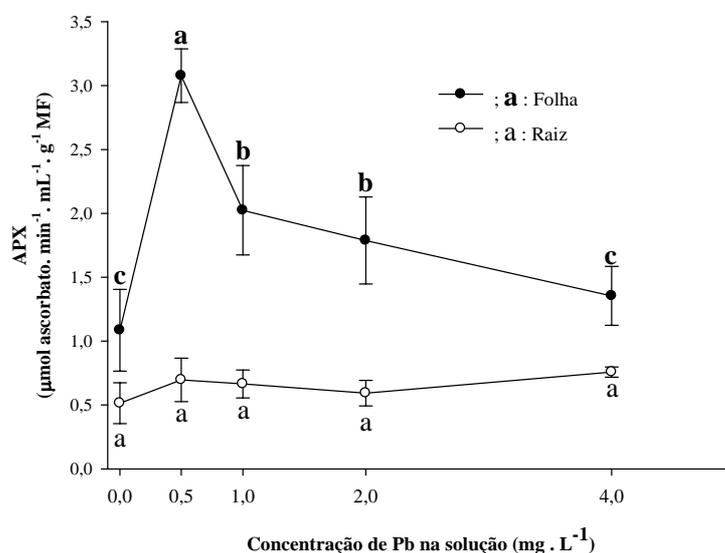


FIGURA 3 Atividade da enzima APX ( $\mu\text{mol ascorbato}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  MF) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Pb ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Pb testadas na solução ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), pelo teste de Scott-Knott ( $p<0,05$ ).

Devido ao comportamento semelhante da atividade das enzimas antioxidantes testadas, e devido a ação destas em conjunto resultar capacidade de defesa do sistema antioxidante (Chen et al., 2003), os resultados indicam que os mecanismos adaptativos desta espécie ao elemento Pb, provavelmente devam ser outros, como por exemplo mecanismos de combate a EROs não enzimáticos (Upadhyay & Panda et al., 2010) ou adaptações estruturais que permitam a plasticidade morfológica desta espécie em ambientes de estresse ocasionado pelo elemento Pb.

## **5.2 Anatomia radicular**

Embora epiderme, exoderme e endoderme tenham aumentado em espessura na presença de Pb (Figuras 4, 5 e 6), provavelmente como resposta indicativa de tolerância a este agente estressor, somente a exoderme acompanhou de forma proporcional o crescimento de sua espessura com o aumento de Pb em solução.

Segundo Ederli et al., (2004) a endoderme é um dos principais locais de acúmulo de elementos-traço nas raízes e, o espessamento deste tecido pode contribuir para a redução de sua translocação, confirmando assim, os resultados encontrados nesse estudo, como visto no capítulo anterior (Capítulo IV, Figura6).

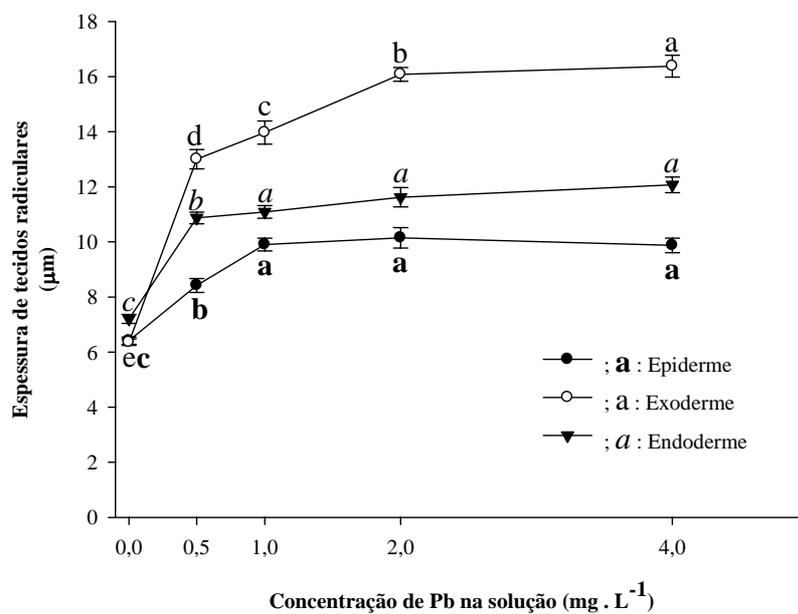


FIGURA 4 Espessura ( $\mu\text{m}$ ) de tecidos radiculares de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Pb ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de Pb testadas na solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

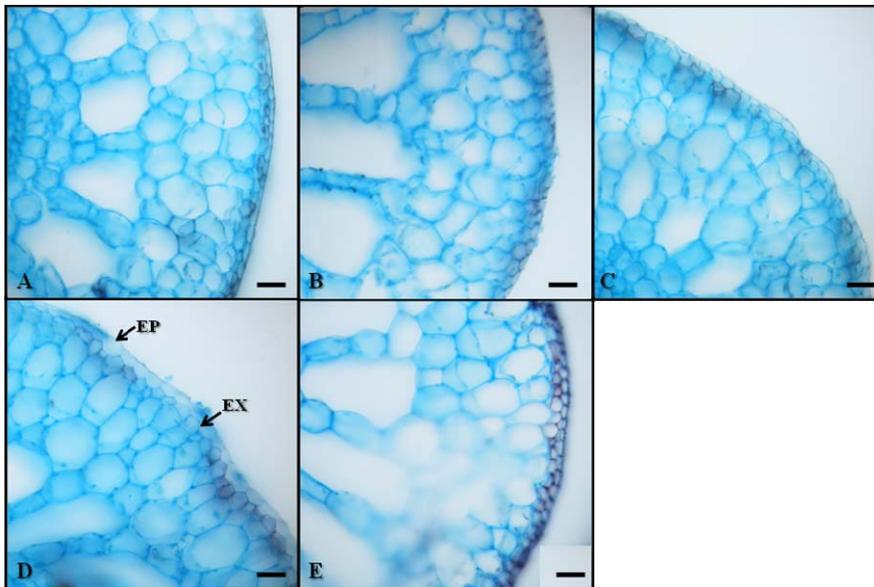


FIGURA 5 Fotomicrografia de secções transversais da zona pilífera de raízes de *Pistia stratiotes* sob a contaminação por Pb. **A** - 0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **B** - 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **C** - 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **D** - 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **E** - 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb. **EP**: Epiderme; **EX**: Exoderme. Barra = 30 µm.

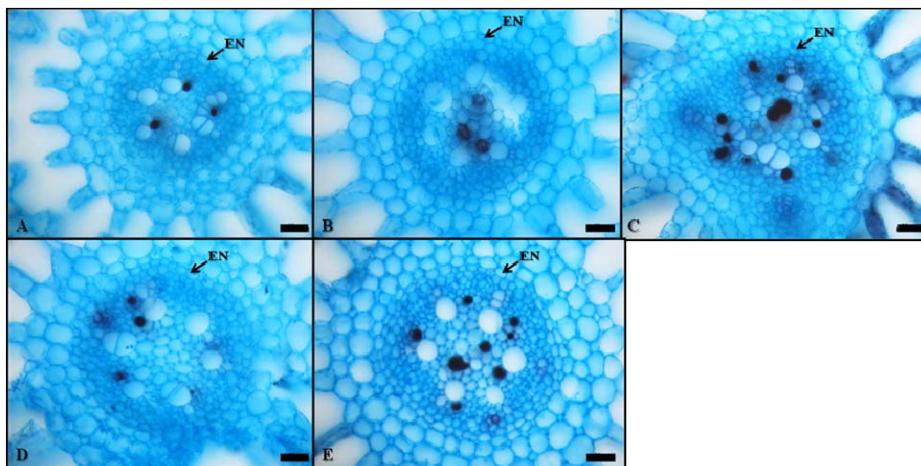


FIGURA 6 Fotomicrografia de secções transversais da zona pilífera de raízes de *Pistia stratiotes* sob a contaminação por Pb. **A** - 0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **B** - 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **C** - 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **D** - 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **E** - 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb. **EN**: Endoderme. Barra = 30 µm.

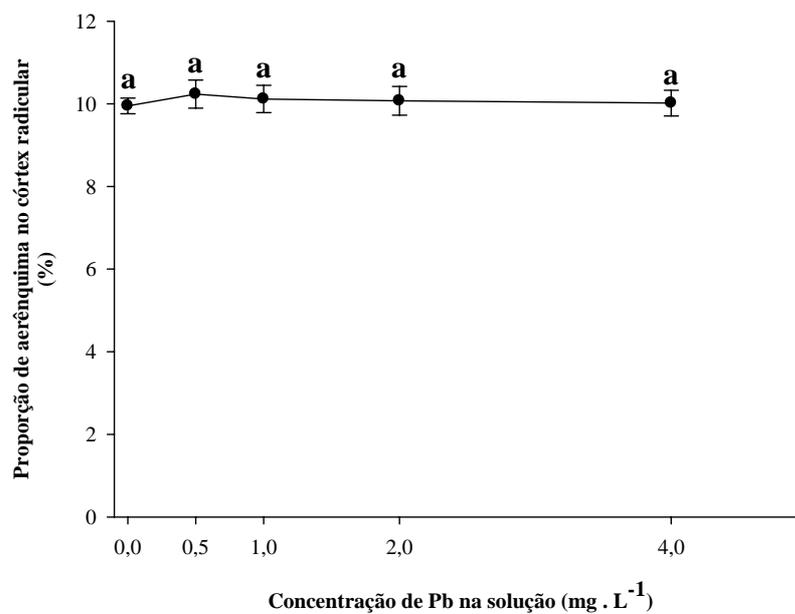


FIGURA 7 Proporção de aerênquimas no córtex radicular de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de Pb (mg.L<sup>-1</sup>). As barras representam o erro-padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa entre as médias nas concentrações de Pb testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

Não houve diferença nas porcentagens de aerênquimas em relação ao córtex (Figura 7e 8), não afetando a capacidade de flutuação das plantas em nenhuma das concentrações testadas, contribuindo para a tolerância da espécie ao metal Pb.

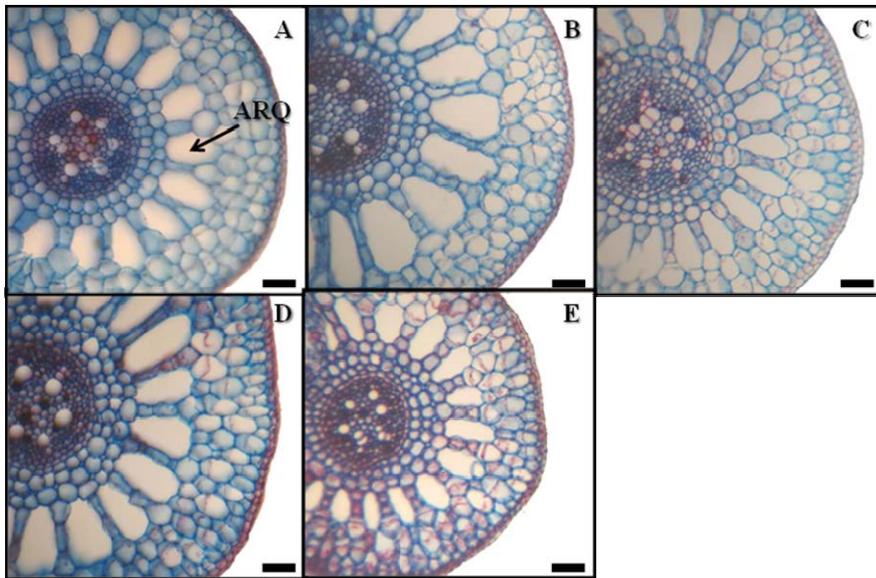


FIGURA 8 Fotomicrografia de secções transversais de raízes de *Pistia stratiotes* sob a contaminação por chumbo. **A** - 0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **B** - 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **C** - 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **D** - 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb; **E** - 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de Pb. **ARQ**: Aerênquima. Barra = 50µm.

## 6 CONCLUSÕES

Devido à inibição enzimática observada nas maiores concentrações de Pb para todas as enzimas testadas, e portanto, perda da capacidade dos antioxidantes enzimáticos em combater EROs produzidas nestas concentrações do metal, os resultados indicam que os mecanismos adaptativos da espécie *P. stratiotes* ao elemento Pb, provavelmente possam ser mecanismos não enzimáticos de combate a EROs.

Porém, as alterações estruturais radiculares observadas como espessamento da epiderme, exoderme e endoderme, conferem à espécie *P. stratiotes* mecanismos de tolerância a contaminação por este metal, por impedirem o fluxo total de Pb absorvido para a parte aérea, como forma de proteção a estes tecidos. Portanto, a espécie exibe um potencial promissor na remediação de corpos d'água contaminados com Pb.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p.280-292, Feb. 1998.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 21-34, jan./mar. 2005.
- BI, X.; REN, L.; GONG, M.; HE, Y.; WANG, L.; MA, Z. Transfer of cadmium and lead from soil to mangoes in an uncontaminated area, Hainan Island, China. **Geoderma**, Amsterdam, v. 155, n. 1/2, p. 115-120, Feb. 2010.
- BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, Clare, v. 164, n. 1, p. 77-84, Jan. 2003.
- BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2005.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.
- BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 160 p.
- CHEN, Y. X.; HE, Y. F.; LUO, Y. M.; YU, Y. L.; LIN, Q.; WONG, M. H. Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 789-793, Feb. 2003.
- EDERLI, L.; REALE, L.; FERRANTI, F.; PASAQUALINI, S. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, n. 1, p. 66-74, Jan. 2004.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

HEGEDUS, A.; ERDEI, S.; HORVATH, G. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 6, p. 1085-1093, Nov. 2001.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. California: California Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular 347).

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principle and practice**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962. 408p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940, 523p.

KABATA-PENDIAS, A. Soil-plant transfer of trace elements: an environmental issue. **Geoderma**, Amsterdam, v.122, n. 2/4, p. 143-149, Oct. 2004.

LALHRUAITLUANGA, H.; JAYARAM, K.; PRASAD, M.N.V.; KUMAR, K.K. Lead(II) adsorption from aqueous solutions by raw and activated charcoals of *Melocanna baccifera* Roxburgh (bamboo): a comparative study. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 175, n. 1/3, p. 311-318, Mar. 2010.

MISHRA, V. K.; TRIPATHI, B. D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 15, p. 7091-7097, Oct. 2008.

MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R.; MAINE, M. A. Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 58, n. 1, p. 53-61, Jan. 2009.

NAKANO, Y.; ASSADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2008.

PILON- SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, United States, v. 56, p. 15-39, June 2005

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plant. **Brazilian Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 35-52, jan./mar. 2005.

TEWARI, A.; SINGH, R.; SINGH, N. K.; RAI, U. N. Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 18, p. 8715–8721, Dec. 2008.

TOPPI, L. S. di; GABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 105–130, Apr. 1999.

UPADHYAY, R.; PANDA, S. K. Zinc reduces copper toxicity induced oxidative stress by promoting antioxidant defense in freshly grown aquatic duckweed *Spirodela polyrhiza* L. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 175, n. 1/3, p. 1081-1084, Mar. 2010.

**CAPÍTULO 6**  
**POTENCIAL FITORREMEDIADOR DE *Pistia stratiotes* L. NA**  
**PRESENÇA DE ARSÊNIO**

## 1 RESUMO

O arsênio (As) é um metaloide tóxico e não essencial às plantas e animais, podendo colocar em risco à vida dos seres humanos. Sua incorporação na cadeia alimentar se dá principalmente por meio da contaminação da água, que pode ser por origem natural ou por ação humana. No entanto, a atividade antrópica tem sido a principal via de contaminação de ambientes aquáticos por este elemento. O comportamento de muitas plantas aquáticas tem sido amplamente estudado visando à identificação de possíveis extratoras deste elemento- traço, mas pelo motivo de cada espécie possivelmente responder a esta contaminação de maneira diferenciada, tornam-se necessários os estudos entre as diferentes espécies. Neste intuito, o presente trabalho objetivou estudar as respostas populacionais, sintomas visuais, e a concentração, acúmulo, absorção e translocação de As em *Pistia stratiotes* visando à detecção do potencial biorremediador desta espécie. Indivíduos de *P. stratiotes* foram cultivados em solução nutritiva e colocados sob diferentes concentrações de As: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> por um período experimental de 15 dias. Ao fim do período a que foram submetidos ao tratamento, foram realizadas contagens de rosetas filhas e inflorescências da roseta mãe, diagnose visual, determinação da biomassa do sistema radicular e parte aérea e determinação do teor de As concentrado na parte aérea e sistema radicular por meio de espectrofotometria de absorção atômica. As rosetas de *P. stratiotes* concentraram e acumularam valores crescentes de As, principalmente em suas raízes, de acordo com o aumento da concentração do elemento na solução. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos em relação ao número de rosetas filhas, inflorescências da roseta mãe e alocação de biomassa na presença do metaloide em solução. Portanto, a espécie *P. stratiotes* demonstra potencial para indicação em programas de fitorremediação de efluentes contaminados pela a ação deste elemento-traço, por esta ser uma espécie que concentra teores relevantes de As em seus tecidos, sem que a alocação de biomassa, capacidade reprodutiva e morfologia fossem alteradas, indicando tolerância e este metaloide.

**Palavras-chave:** biorremediação, metaloide, alface d'água, poluição.

## 2 ABSTRACT

Arsenic (As) is a toxic metalloid, non-essential to plants and animals, which can endanger human lives. Its incorporation into the food chain occurs mainly through water contaminated by natural or human action. However, human activity has been the main route of contamination of aquatic environments by this element. The behavior of many aquatic plants has been extensively studied to identify possible trace elements extractors. However, due to the fact that each species possibly responds to this contamination differently, interspecies studies become necessary. To this end, this study investigated the population responses, visual symptoms, and the As concentration accumulated in *Pistia stratiotes* aiming to detect the bioremediation potential of this species. Individuals of *P. stratiotes* were grown in nutrient solution and put under different As concentrations: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup> for an experimental period of 15 days. At the end of the treatment period daughter rosettes and mother rosette flowers were counted, visual diagnosis, determination of root and shoot biomass and determination of the concentration in the shoot and root system by means of atomic absorption spectrophotometry was conducted. *P. stratiotes* rosettes accumulated increasing As levels, mainly in their roots, according to the concentration of the solution. There was no significant difference between treatments in the number of daughter rosettes, inflorescences from rosette mother and biomass allocation in the presence of the metalloid. Therefore, *P. stratiotes* species shows potential for indication in phytoremediation programs of effluents contaminated with As, for this is a species that concentrates significant levels of As in its tissues, without alteration in the biomass allocation, reproductive capacity and morphology, indicating tolerance for this metalloid.

**Key-words:** bioremediation, metalloid, water lettuce, pollution.

### 3 INTRODUÇÃO

A fitorremediação é processo o qual utiliza plantas para a remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos do ambiente, processo que tem sido indicado como eficiente e de baixo custo, podendo ser aplicado a grandes áreas (Suñe et al., 2007). Outra vantagem que é atribuída à fitorremediação, é esta ser considerada uma tecnologia 'limpa', por utilizar vegetais para a retirada de contaminantes, não prejudicando outros organismos presentes nesses sistemas (Pilon-Smith, 2005), sendo, portanto, um método ecologicamente viável.

Diversas plantas aquáticas têm demonstrado grande potencial para a utilização em programas de fitorremediação da poluição em ecossistemas aquáticos, devido a atributos, como grande produção de biomassa, fácil propagação e tolerância a poluentes, porém esta tolerância é variável entre espécies e para os diferentes tipos de poluente (Oliveira et al., 2001), sendo necessários estudos do comportamento das espécies, para a determinação de seu potencial fitorremediador, bem como à detecção de possíveis mecanismos de tolerância destas plantas aos poluentes.

O arsênio (As) é um elemento não essencial e tóxico às plantas e animais, podendo colocar em risco à vida dos seres humanos. Sua incorporação na cadeia alimentar se dá principalmente por meio da absorção pelas plantas e contaminação da água (Zhao et al., 2009).

A macrófita aquática *Pistia stratiotes* tem sido utilizada para a remoção de mercúrio de efluentes de mineração, por esta acumular o metal em suas raízes (Skinner et al., 2007; Espinoza-Quiñones et al., 2009), indicada para remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e sólidos suspensos na água, melhorando a qualidade dos sistemas aquáticos (Lu et al., 2010), demonstrando seu potencial

uso na fitorremediação, como medida de redução da contaminação de efluentes, por sua capacidade de absorção e acúmulo de poluentes (Skinner et al., 2007).

Com isso, o objetivo deste estudo foi verificar o potencial fitorremediador da espécie aquática *P. stratiotes* à contaminação por As, por meio da análise de dados populacionais (biomassa, número de rosetas filhas e número de inflorescências da roseta mãe), sintomas visuais, concentração, acúmulo, translocação e absorção de As, visando sua indicação para programas de fitorremediação de efluentes contaminados por este metaloide.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do material vegetal

Para a análise visual, populacional, absorção e acúmulo do elemento As, rosetas de *P. stratiotes* foram coletadas em uma lagoa artificial, livre de suspeita de contaminação por As no município de Lavras – MG (44° 55' W; 21° 05' S). Após a coleta, foi feita a limpeza das plantas em água corrente a fim de eliminar partículas aderidas. Foram selecionadas plantas livres de patógenos e uniformes quanto ao tamanho, as quais foram posteriormente cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde inicialmente passaram por um período de aclimatização, sendo cultivadas em bandejas plásticas com capacidade para 20 L, contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total, até a quinta geração clonal de plantas, para a eliminação de resíduos do elemento-traço que porventura pudessem estar presentes nas plantas matrizes coletadas do ambiente. O período de desenvolvimento de cada geração clonal foi de 15 dias.

### 4.2 Instalação do Experimento

Após o período de aclimatização, as plantas da quinta geração clonal foram selecionadas quanto à uniformidade do tamanho e transferidas para recipientes individuais, contendo 4 L da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) como descrita para a aclimatização, contendo concentrações crescentes de As na forma de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Os valores das concentrações de As utilizadas para os diferentes tratamentos foram obtidos com base no valor máximo permitido (VMP) de As total para

lançamento de efluentes em corpos d'água doce (Brasil, 2005). Neste caso, o VMP segundo esta resolução é de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de As.

TABELA 1 Concentração de As na solução para cada tratamento.

Tratamento	Concentrações de As ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Percentual do VMP (%)
<b>T1 (Controle)</b>	0,00	0
<b>T2</b>	0,25	50
<b>T3</b>	0,50	100
<b>T4</b>	1,00	200
<b>T5</b>	2,00	400
<b>T6</b>	4,00	800

Foram eliminadas todas as estruturas reprodutivas das plantas antes da imposição dos tratamentos. As plantas foram submetidas aos tratamentos por um período de 15 dias, após o qual, foram realizadas as análises. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos com cinco repetições, com a parcela experimental composta por três rosetas.

#### 4.3 Crescimento clonal, número de inflorescências e biomassa

Ao final do período experimental foi determinado o crescimento clonal por meio da contagem do número de rosetas filhas e a determinação da biomassa, por meio de secagem em estufa durante 72 horas, a  $60^\circ\text{C}$ , sendo posteriormente pesadas em balança analítica. O número de estruturas reprodutivas (inflorescências) também foi contado ao final do experimento.

#### 4.4 Sintomas visuais

As alterações morfológicas externas foram observadas diariamente e registradas ao final do período experimental, com auxílio de uma câmera digital.

#### **4.5 Análise da bioconcentração e determinação do bioacúmulo, translocação e absorção de arsênio**

Para a determinação das concentrações de As, foram utilizados 0,5 e 1,0 g de matéria seca de raízes e da parte aérea, respectivamente, obtidos no processo de secagem para análise de alocação da biomassa, que foram posteriormente trituradas em moinho do tipo Wiley. Estas alíquotas foram digeridas em 10 mL de HNO<sub>3</sub> p.a. e aquecidos em forno de microondas, durante 10 minutos, à pressão de 0,76 MPa. Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado para 20 mL com água destilada. A digestão das amostras foi feita segundo o protocolo do método 3051 A da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 1998).

A concentração de As nas amostras foi obtida por meio de espectrofotômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite utilizando o equipamento AAnalyst 800 da Perkin Elmer.

Cada bateria de análise constou de uma amostra em branco com a finalidade de controle de qualidade do método de extração e determinação deste elemento-traço. A amostra em branco foi obtida utilizando-se o mesmo procedimento de digestão, porém contendo somente o HNO<sub>3</sub>. A partir da leitura desta amostra, determinou-se o branco do método, que foi utilizado no cálculo do limite de detecção do método (LDM), que por sua vez, foi utilizado para calcular o limite de quantificação do método (LQM). Foram utilizados como materiais de referência amostras da solução nutritiva acrescidas do elemento-traço nas concentrações representativas de cada tratamento.

O acúmulo de As nos tecidos de *P. stratiotes* foi calculado com base nas concentrações encontradas e produção de biomassa. A translocação e absorção do As foram determinadas com a utilização das seguintes fórmulas:

Translocação do As:

$(\text{acúmulo de As na parte aérea}) / (\text{acúmulo total de As na planta}) \times 100$

Absorção de As:

$(\text{acúmulo total de As na planta}) / (\text{matéria seca das raízes})$

#### **4.6 Análise estatística**

As variáveis obtidas foram submetidas à análise de variância e regressão para o fator concentrações de As na solução. A fim de verificar a diferença entre os tratamentos para os parâmetros número de rosetas filhas e número de inflorescências da roseta mãe, foram utilizadas barras correspondentes ao erro-padrão da média e realizada a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Crescimento clonal, número de inflorescências, biomassa e sintomas visuais

Não foram detectadas diferenças significativas no crescimento clonal em nenhum dos tratamentos, em que o aparecimento de novas rosetas foi detectado a partir do quinto dia em todas as concentrações de As em solução estudadas (Figura 1). O número de estruturas reprodutivas ao final do experimento também não diferiu significativamente na presença de As em solução, porém foi maior do que no tratamento controle, o qual é representativo da ausência do elemento (Figura 1).

O maior número de estruturas reprodutivas encontrado na presença de As é uma resposta à presença deste elemento, provavelmente na tentativa de se evitar o estresse ocasionado pela presença do elemento, visando à perpetuação da espécie. Porém, este parâmetro não foi afetado pelas concentrações crescentes de As.

A capacidade reprodutiva pela via assexuada também não foi afetada, demonstrando tolerância das plantas às concentrações de arsênio as quais foram submetidas.

A via de reprodução preferencial desta espécie é a vegetativa (Cardoso et al., 2005), em que somente sob condições de estresse, como condições de elevada densidade populacional, tende a investir mais em reprodução sexuada (Coelho et al., 2005). Portanto, o que pode sugerir a adaptabilidade desta espécie à contaminação por As, por esta não ter investido em formas de escape de acordo com a maior concentração do elemento na solução.

Além disso, a reprodução clonal inalterada sob concentrações de As pode ser considerada como um fator positivo na alta produção de biomassa, pré-requisito básico para a indicação desta espécie como fitorremediadora.

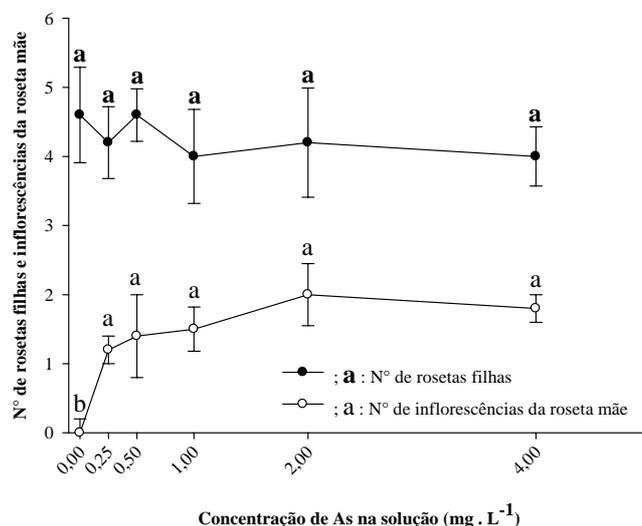


FIGURA 1 Crescimento clonal e número de estruturas reprodutivas de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de Pb na solução (mg.L<sup>-1</sup>). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas em uma mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de As testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

A alocação de biomassa não foi afetada significativamente pelas diferentes concentrações de As em solução (Figura 2), apesar do menor valor de biomassa da parte aérea (2,3992 g) e, portanto, da biomassa total (2,5777 g) ter sido encontrados no tratamento de maior concentração do metalóide (4,0 mg.L<sup>-1</sup>).

Não foram detectados sintomas visuais de toxicidade do metalóide em nenhuma das concentrações de As estudadas (Figura 3), o que indica adaptabilidade da espécie à presença deste elemento.

Alta produção de biomassa e ausência de sintomas de toxicidez são dois pré-requisitos básicos para a classificação de uma espécie como fitorremediadora (Pilon-Smith, 2005), confirmando que os dados encontrados neste experimento, contribuem de maneira significativa para o potencial fitorremediador de *P. stratiotes*.

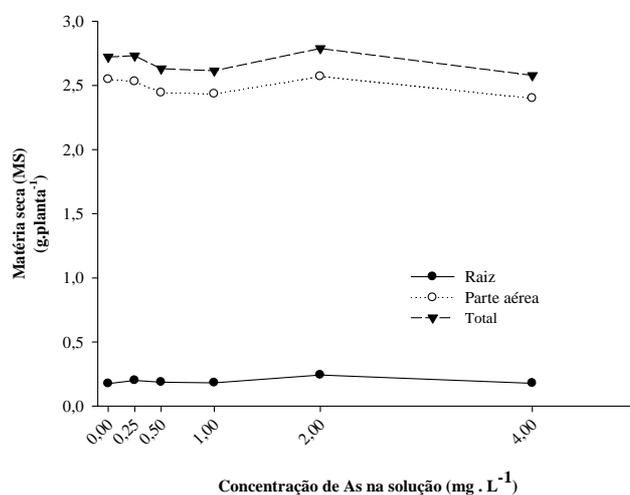


FIGURA 2 Biomassa da raiz (g.planta<sup>-1</sup>), parte aérea e total de *Pistia stratiotes*, em função da concentração de As na solução (mg.L<sup>-1</sup>). Biomassa da raiz ( $R^2 = 0,5416$ ;  $p > 0,05$ ); parte aérea ( $R^2 = 0,3131$ ;  $p > 0,05$ ) e total ( $R^2 = 0,3499$ ;  $p > 0,05$ ).



FIGURA 3 Plantas de *Pistia stratiotes* submetidas a doses crescentes de Pb. (A – 0 mg.L<sup>-1</sup> de As; B – 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de As; C – 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de As; D – 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de As; E – 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de As; F – 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de As). Barra = 30 cm.

## 5.2 Bioconcentração, bioacúmulo, translocação e absorção de arsênio

As concentrações de As em todos os tratamentos foram superiores ao limite de quantificação do método (LQM), exceto para o tratamento controle, o que possibilitou a quantificação em todas as concentrações com a presença do elemento em solução. O LQM encontrado para o As foi de 7,711 mg.L<sup>-1</sup>.

As raízes e parte aérea de *P. stratiotes* concentraram valores relevantes de As, indicando seu alto potencial em extrair este elemento da solução (Figura 4). O sistema radicular foi responsável por mais de 90% da concentração total de As nas plantas (Figura 4B), como esperado, pelo fato de as raízes terem a função de absorver íons, e por esta absorção ser um processo mais rápido do que a translocação dos elementos para a parte aérea. A concentração de As em *P. stratiotes* aumentou de forma não-linear de acordo com o aumento do metalóide em solução, entretanto, não foi possível a determinação do valor máximo de As

concentrado nos tratamentos testados, necessitando o teste de concentrações superiores a estas para que este valor seja obtido.

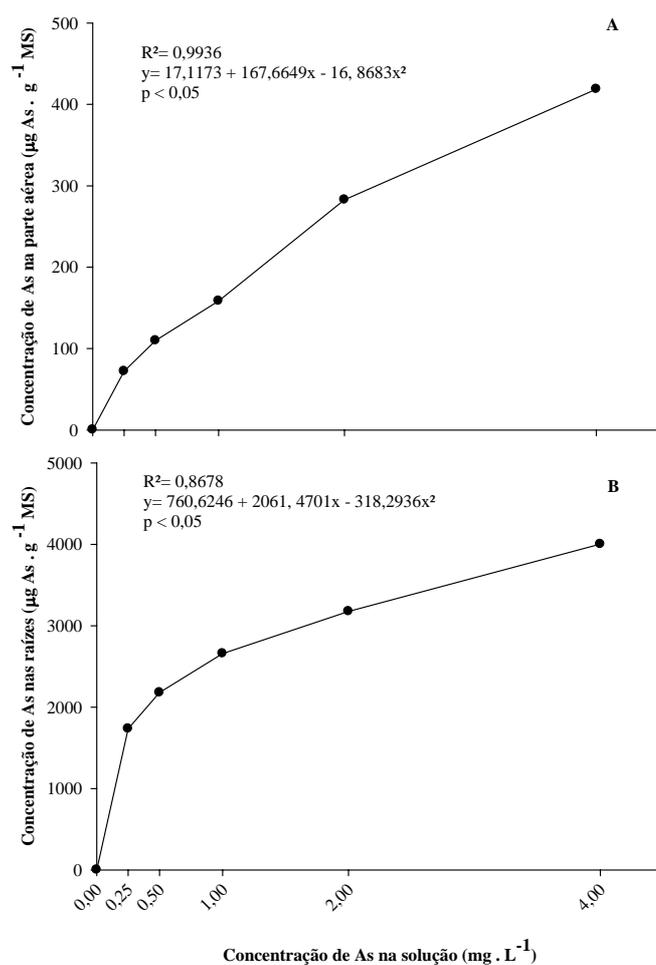


FIGURA 4 Concentrações acumuladas de As em *Pistia stratiotes* (µg de As · g<sup>-1</sup> MS) nas diferentes concentrações de As em solução (mg · L<sup>-1</sup>). A - Concentração acumulada na parte aérea; B - Concentração acumulada no sistema radicular.

O bioacúmulo de As também aumentou de acordo com o incremento de As na solução, tanto nas raízes quanto na parte aérea, de forma não-linear (Figura 5), em que somente para as raízes foi possível a determinação do valor máximo acumulado na concentração inicial de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de As na solução ( $758,6016 \mu\text{g.planta}^{-1}$ ). Na concentração mais alta de As em solução ( $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) o acúmulo foi maior na parte aérea do que no sistema radicular, fato que pode ter sido ocasionado pela maior concentração de As na solução aliada a eficiência na translocação do elemento ter sido estatisticamente semelhante à dos tratamentos com menor concentração do metaloide em solução (Figura 5).

Baldwin & Butcher (2007) ao estudarem o feito de As em *Pteris vittata*, constataram maior acúmulo de As na parte aérea do que na raiz, como encontrado na última concentração testada neste experimento, indicando que esta seja uma boa adaptação da planta ao poluente, por se tratar de uma vantagem o fato das folhas poderem ser removidas, permitindo a produção adicional de tecido fotossintetizante, que por sua vez irá posteriormente também acumular As.

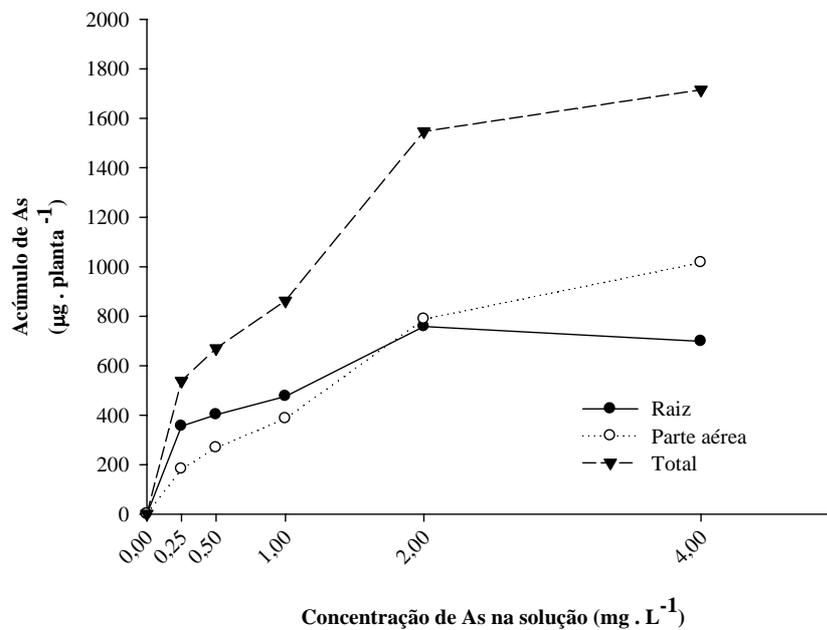


FIGURA 5 Bioacúmulo de As em *Pistia stratiotes* ( $\mu\text{g} \cdot \text{planta}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de As em solução ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Acúmulo raiz ( $R^2 = 0,9087$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 114,2233 + 509,7540x - 91,2267x^2$ ), parte aérea ( $R^2 = 0,9900$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 22,8482 + 486,1199x - 59,1438x^2$ ) e total ( $R^2 = 0,9688$ ;  $p < 0,05$ ;  $y = 137,1186 + 995,8182x - 150,3593x^2$ ).

Apesar da eficiência na translocação de As não ter sido afetada significativamente pelo incremento do metaloide na solução, este parâmetro aumentou de acordo com as concentrações de As na solução nutritiva (Figura6).

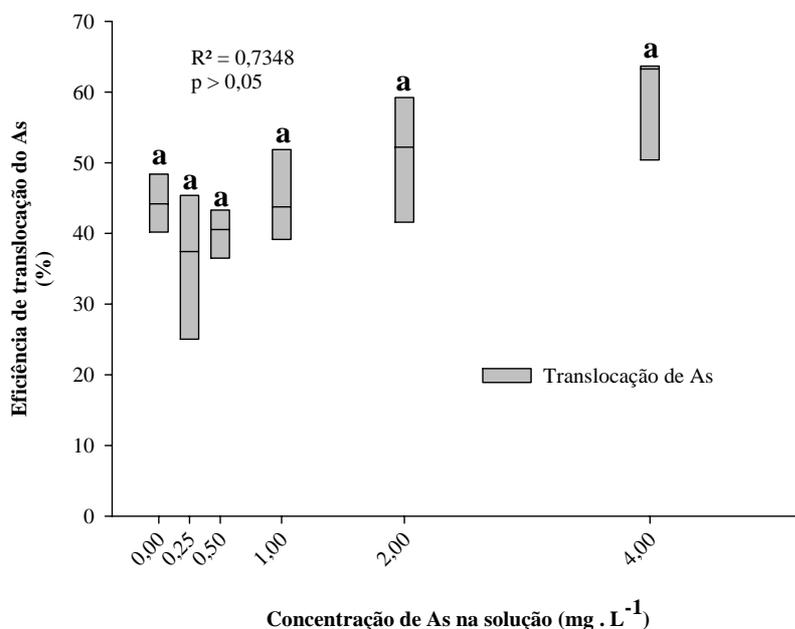


FIGURA 6 Eficiência na translocação de As (%) em *Pistia stratiotes* nas diferentes concentrações de As em solução (mg.L<sup>-1</sup>). Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre as médias nas concentrações de As testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Com relação à eficiência de absorção das raízes de *P. stratiotes*, foi observado um aumento não-linear de acordo com o aumento da concentração de As em solução (Figura 7), demonstrando uma correlação positiva entre a absorção e exposição a maiores concentrações deste poluente. Este fato indica uma boa capacidade absorptiva das raízes de *P. stratiotes* para o elemento As.

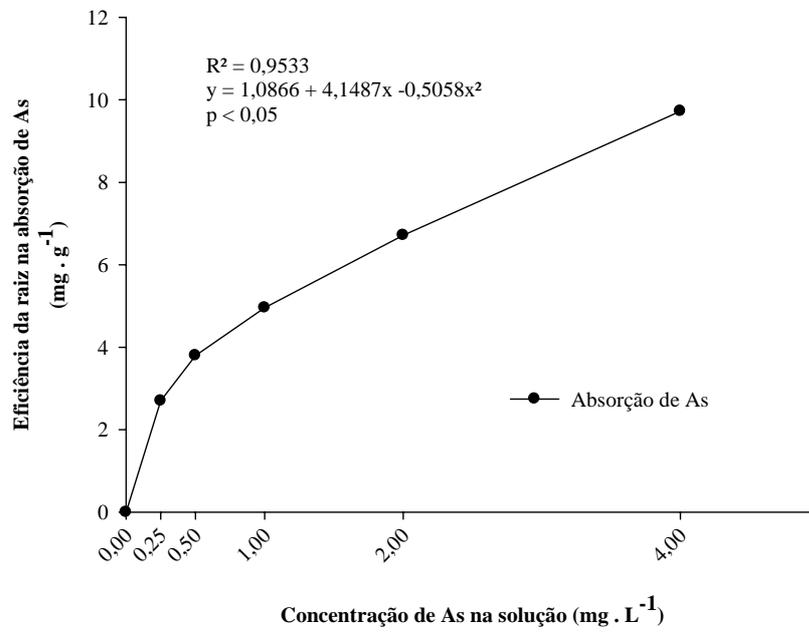


FIGURA 7 Eficiência das raízes de *Pistia stratiotes* na absorção de As ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de As em solução ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

## 6 CONCLUSÃO

Devido às altas concentrações de As absorvidas e concentradas por *P. stratiotes*, sem que esta apresente diferenças significativas em seu crescimento clonal e alocação de biomassa, esta espécie é indicada como fitorremediadora de As, podendo ser utilizada na remediação de ecossistemas aquáticos poluídos por este elemento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDWIN, P. R.; BUTCHER, D. J. Phytoremediation of arsenic by two hyperaccumulators in a hydroponic environment. **Microchemical Journal**, New York, v. 85, n. 2, p. 297–300, Apr. 2007.

BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2005.

CARDOSO, L. R.; MARTINS, D.; MORI, E. S.; TERRA, M. A. Variabilidade genética entre populações de *Pistia stratiotes*. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 23, n. 2, p. 181-185, abr. 2005.

COELHO, F. F.; DEBONI, L.; LOPES, F. S. Density-dependent reproductive and vegetative allocation in the aquatic plant *Pistia stratiotes* (Araceae). **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 53, n. 3/4, p. 369-376, Sept./Dec. 2005.

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; MARTIN, N.; STUTZ, G.; TIRAO, G.; PALÁCIO, S. M.; RIZZUTTO, M. A.; MÓDENES, A. N.; SILVA JR, F. G.; SZYMANSKI, N.; KROUMOV, A. D. Root uptake and reduction of hexavalent chromium by aquatic macrophytes as assessed by high-resolution X-ray emission. **Water Research**, New York, v. 43, n. 17, p. 4159-4166, Sept. 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular 347).

LU, Q.; HE, Z. L.; GRAETZ, D. A.; STOFFELLA, P. J.; YANG, X. Phytoremediation to remove nutrients and improve eutrophic stormwaters using water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). **Environmental Science Pollution Research**, v. 17, n. 1, p. 84-96, Jan. 2010.

OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O; JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de *Salvinia* e aguapé. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.

PILON- SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, United States, v. 56, p. 15-39, June 2005

SKINNER, K.; WRIGHT, N.; PORTER-GOFF, E. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 1, p. 234-237, Jan. 2007.

SUÑÈ, N.; SÁNCHEZ, G.; CAFFARATTI, S.; MAINE, M.A. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 2, p. 467-473, Jan. 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3051 A: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: \_\_\_\_\_. **SW – 864**: test methods for evaluating solid waste, physical and chemical methods. Washington, 1998. 20 p.

ZHAO, F. J.; MA, J. F.; MEHARG, A. A.; McGRATH, S. P. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 181, n. 4, p. 777–794, Mar. 2009.

**CAPÍTULO 7**  
**ANATOMIA RADICULAR E ATIVIDADE DE ENZIMAS**  
**ANTIOXIDANTES DE *Pistia stratiotes* L. SOB CONCENTRAÇÕES DE**  
**ARSÊNIO**

## 1 RESUMO

O arsênio (As) é um metalóide análogo ao nutriente fósforo (P), portanto interferindo em sua absorção pelas plantas, ou se ligando competitivamente em reações de fosforilação, provocando alterações no fluxo energético celular e estrutura anatômica de raízes. Além disso, como outros elementos-traço, também pode desencadear a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando estresse oxidativo. No entanto, estudos sobre os efeitos da toxicidade de As em plantas aquáticas permitem a determinação de sua tolerância a este elemento, fornecendo subsídios à potencial utilização destas plantas como depuradoras de ambientes aquáticos contaminados com este poluente. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar a estrutura interna radicular e avaliar a atividade das enzimas antioxidantes peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), em plantas de *Pistia stratiotes* sob diferentes concentrações de As, visando à detecção de mecanismos de tolerância da espécie a este elemento, que viabilize a sua utilização em programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por este metalóide. Rosetas de *P. stratiotes* foram cultivadas em solução nutritiva e submetidas aos tratamentos com As nas seguintes concentrações: 0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> por um período de 15 dias, após o qual foram realizados os ensaios da atividade enzimática da APX, CAT e SOD e avaliações da anatomia radicular. A atividade das enzimas antioxidantes foi alterada na presença de As em ambas as partes da planta. Os resultados indicaram o aumento das atividades enzimáticas na presença do elemento, por síntese induzida das enzimas, como resposta à toxicidade do poluente. Foram observados decréscimos nas atividades enzimáticas da SOD e da APX nas maiores concentração de As, pela redução na capacidade de controle de EROs ou por inibição da síntese enzimática. Porém a ação combinada destas enzimas contribuiu para o ajuste do sistema antioxidante. Com relação à anatomia radicular, a porcentagem de aerênquimas decresceu de acordo com o aumento das concentrações de As, sem, no entanto, afetar a capacidade de flutuação das plantas. Também foram detectadas alterações estruturais como espessamento de epiderme, exoderme e endoderme de acordo com o aumento de As na solução, formando barreiras apoplásticas que contribuem para tolerância a este metal, por evitar sua translocação. Pelo desenvolvimento de mecanismos capazes de combater danos causados pelo As e evitar sua translocação *P. stratiotes* apresenta potencial promissor para ser indicada para programas de fitorremediação de ecossistemas aquáticos poluídos por este elemento-traço.

**Palavras-chave:** potencial fitorremediador, sistema antioxidante, metal pesado, anatomia vegetal.

## 2 ABSTRACT

Arsenic (As) is a metalloid similar to the nutrient phosphorus (P), thus interfering with the P absorption by the crops, or by competitively binding in phosphorylation reactions, causing changes in cellular energy flow and root anatomical structure. Moreover, like other trace elements, it can also trigger the formation of reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress. However, studies on the effects of toxicity to the aquatic plants allow the determination of their tolerance to this element, providing support for the potential use of plants for purification of aquatic environments contaminated with this pollutant. Thus, the objective was to examine the root internal structure and assess the activity of the antioxidant enzymes ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in *Pistia stratiotes* plants under different concentrations of As, seeking the detection of the species tolerance mechanisms to this element, which facilitates their use in phytoremediation programs in aquatic environments contaminated by this metalloid. *P. stratiotes* rosettes were reared in nutrient solution and submitted to treatments with the following concentrations: 0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup> for a period of 15 days after which enzymatic activity tests for APX, CAT and SOD were carried out and evaluations of the root anatomy were made. The activity of the antioxidant enzymes was altered in the presence of As in both parts of the plant. The results indicated an enzyme activity increase in the presence of the element, for synthesis of enzymes induced in response to the toxicity of the pollutant. Decreases were observed in SOD and CAT activity at the high As concentration, by the reduction in the ability to control ROS or by inhibition of enzymatic synthesis. But the combined action of these enzymes contributed to the adjustment of the antioxidant system. In respect to the root anatomy, the percentage of aerenchyma decreased according to the As concentrations, but did not affect the plant float capacity. Structural changes were also detected such as thickening of epidermis, exodermis and endodermis according to the increase of As in solution, forming apoplastic barriers that contribute to tolerance to this metal by preventing its translocation. For the development of mechanisms to combat damage caused by As and prevent its translocation *P. stratiotes* has promising potential to be suitable for phytoremediation programs in ecosystems polluted by this trace element.

**Key-words:** phytoremediator potential, antioxidant system, heavy metal, plant anatomy.

### 3 INTRODUÇÃO

A degradação ambiental, promovida principalmente pela ação antrópica, tem gerado fortes impactos aos ecossistemas, principalmente ao aquático (Paiva et al., 2002), por meio da contaminação de corpos d'água por efluentes industriais, urbanos ou agrícolas. Entre as diversas formas de contaminação destes ambientes, está a contaminação por elementos-traço, a qual tem sido motivo de grande preocupação de órgãos governamentais e ambientais por afetar a vida de toda cadeia trófica (Oliveira et al., 2001).

O arsênio (As) é um metalóide análogo ao nutriente fósforo (P), que, portanto, interfere na absorção deste elemento pelas plantas, se ligando competitivamente em reações de fosforilação ou provocando alterações no fluxo energético celular e estrutura anatômica de raízes.

As plantas, quando submetidas à ambientes contaminados por elementos-traço, apresentam uma série de distúrbios fisiológicos (Kabata-Pendias, 2004), e estruturais (Mufarrege et al., 2009).

Neste caso, a anatomia radicular deve ser analisada com prioridade devido ao fato das plantas absorverem diretamente, por meio das raízes, os elementos-traço. Estes elementos podem ser retidos nos tecidos radiculares por meio de barreiras apoplásticas, como a endoderme que pode dificultar a translocação desse elemento para a parte aérea. Portanto, alterações como o espessamento deste tecido, geram subsídios para uma maior tolerância das plantas aos poluentes, por proporcionarem assim, maior proteção para os tecidos fotossintéticos e dessa forma auxiliar na sobrevivência destas espécies.

Além disso, no intuito de se estudar diferentes mecanismos adaptativos que resultem em tolerância das espécies a elementos-traço, devem ser analisadas as atividades das enzimas do sistema antioxidante.

Várias plantas aquáticas têm sido estudadas e sugeridas como alternativas na remoção de elementos-traço de ecossistemas aquáticos, entre elas a planta aquática *Pistia stratiotes*, a qual tem sido utilizada para a remoção de mercúrio e cromo de efluentes de mineração, por esta acumular estes metais em suas raízes (Skinner et al., 2007; Espinoza-Quiñones et al., 2009).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar a estrutura interna radicular e avaliar a atividade das enzimas antioxidantes peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), em plantas de *Pistia stratiotes* sob diferentes concentrações de As, visando à detecção de mecanismos de tolerância da espécie a este elemento, que viabilize a sua utilização em programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por este metalóide.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do material vegetal

Para a realização do experimento de diagnose visual, análise populacional, absorção e acúmulo do elemento Cd, rosetas de *P. stratiotes* foram coletadas em uma lagoa artificial, livre de suspeita de contaminação por Cd no município de Lavras – MG (44° 55' W; 21° 05' S). Após a coleta, as plantas foram lavadas em água corrente a fim de eliminar partículas aderidas. Foram selecionadas plantas livres de patógenos e uniformes quanto ao tamanho, as quais foram posteriormente cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde inicialmente passaram por um período de aclimatização, sendo cultivadas em bandejas plásticas com capacidade para 20 L, contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total, até a quinta geração clonal de plantas, para a eliminação de resíduos do elemento-traço que porventura pudessem estar presentes nas plantas matrizes coletadas do ambiente. O período de desenvolvimento de cada geração clonal foi de 15 dias.

### 4.2 Imposição dos tratamentos

Após o período de aclimatização, as plantas da quinta geração clonal foram selecionadas quanto à uniformidade do tamanho e transferidas para recipientes individuais, contendo 4 L da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) como descrita para a aclimatização, contendo concentrações crescentes de As na forma de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0  $\text{mg L}^{-1}$  de As. Os valores das concentrações de As utilizadas para os diferentes tratamentos foram obtidos com base no valor máximo permitido (VMP) de As total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce (Brasil, 2005). Neste caso, o VMP segundo esta resolução é de 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de As.

Para as análises anatômicas e enzimáticas foram realizados experimentos distintos.

O período experimental foi de 15 dias, após o qual, foram realizadas as coletas para posteriores análises. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos com cinco repetições, com a parcela experimental composta por uma roseta.

### **4.3 Atividade das enzimas do sistema antioxidante**

Ao final do experimento procedeu-se a coleta para a realização dos ensaios enzimáticos da atividade das enzimas antioxidantes. Para esta análise foram coletados no período da manhã, aproximadamente 1,5 g de matéria fresca de raízes e de folhas separadamente, que em seguida foram envoltos em papel alumínio e acondicionados em caixa de isopor, até a chegada ao laboratório onde posteriormente foram mantidos em freezer  $-86^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização no processo de extração enzimática.

Para a extração das enzimas SOD (EC 1.15.1.1), CAT (EC 1.11.1.6) e APX (EC 1.11.1.11) foram utilizados 0,5 g de raízes e folhas, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido e 2 mL de tampão de extração contendo: 1,924 mL de tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e pH 7; 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ; 20  $\mu\text{L}$  de EDTA  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ; 8  $\mu\text{L}$  de DTT  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ; 16  $\mu\text{L}$  de PMSF  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e 40 mg de PVPP. Após o processo de maceração, o material foi centrifugado a 14000 RPM, por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante no qual permaneceram as enzimas foi coletado e o pellet descartado. As amostras foram mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante todo o procedimento (Bor et al., 2003 adaptado). O mesmo extrato enzimático foi utilizado para o ensaio da atividade das três enzimas analisadas.

Para o ensaio enzimático da atividade da SOD foi utilizado o volume final de 3 mL do meio de reação contendo: 1,5 mL de tampão fosfato de potássio

0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7,8; 30 µL de EDTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>; 4,5 µL de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) 50 mmol.L<sup>-1</sup>; 156 µL de metionina 0,25 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7,8; 60 µL de riboflavina 100 µmol.L<sup>-1</sup> e 1,2295 mL de água acrescidos a 20 µL do extrato enzimático. A reação foi realizada em uma câmara com luz fluorescente de 15 watts na qual foram expostos tubos de vidro contendo o meio de reação por um período de 10 minutos. A atividade da SOD foi determinada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT na presença de luz. Portanto, esta reação foi iniciada pela presença da luz e paralisada pela ausência da mesma. Posteriormente, em uma sala escura foi feita a leitura do produto formado por esta reação, a formazana azul, em espectrofotômetro a 560 nm (Giannopolitis & Reis, 1977, adaptado).

A atividade da CAT foi analisada com 1 mL de meio de reação contendo: 160 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7; 125 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,0125 µmol.L<sup>-1</sup>; 680 µL de água e 35 µL de extrato enzimático. A determinação da atividade enzimática da CAT foi realizada por meio do acompanhamento da queda na absorbância, a 240 nm durante 1 minuto e 30 segundos, com intervalos de 30 segundos e o fator de extinção de 0,0394 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Azevedo et al., 1998, modificado).

Para a atividade da APX, foi utilizado 1 mL de meio de reação composto por 160 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 7, 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,0125 mol.L<sup>-1</sup>, 100 µL de ácido ascórbico 0,005 mol.L<sup>-1</sup> e 605 µL de água adicionados a 35 µL de extrato enzimático. A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da queda na absorbância a 290 nm, durante dois minutos, em intervalos de 30 segundos e com o fator de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Nakano & Asada, 1981, modificado).

#### **4.4 Anatomia radicular**

Para a análise na estrutura interna radicular foram coletadas raízes de uma planta de cada uma das cinco repetições de cada um dos tratamentos. Após a coleta foi feita a remoção de impurezas em água corrente e a fixação do material vegetal em F.A.A. 70% - (formol 37%, ácido acético glacial p.a. e álcool etílico 70% na proporção de 0,5:0,5:9), (Johansen, 1940) por um período de 72 horas e posteriormente conservadas em etanol 70° G.L. (Jensen, 1962).

Foram obtidos cortes transversais na zona pilífera das raízes das rosetas filhas (crescidas sob contaminação por As), com o auxílio do micrótomo manual Ranvier (micrótomo de mesa), utilizando-se isopor como suporte. Em seguida, as secções foram coradas com a mistura de azul de astra – safranina (safrablau), seguindo-se os métodos descritos por Bukatsch, (1972) e Burger & Richter (1991). Foram montadas lâminas semipermanentes em glicerina a 50% e feita a lutagem com esmalte incolor.

Para o estudo da anatomia radicular foram feitas fotomicrografias com auxílio de uma câmera digital - Canon PowerShot A620 8.0 megapixels, acoplada ao microscópio KEN-A-VISION TT18, que foram posteriormente analisadas no software de medições Image Tool da UTHSCSA.

A espessura da epiderme, exoderme e endoderme foi avaliada a partir de medições realizadas em cinco pontos distintos de cada fotomicrografia. Foram obtidas cinco fotomicrografias para cada raiz analisada, perfazendo um total de 125 observações por tratamento. Para a análise da porcentagem de aerênquimas no córtex, foi determinada a área total do córtex segundo Pereira et al. (2009), e o somatório das áreas individuais dos aerênquimas. Neste caso foram analisadas cinco fotomicrografias para cada raiz de cada repetição, tendo sido realizadas no total de 25 observações referentes à porcentagem de aerênquimas para cada tratamento.

#### **4.5 Análise estatística**

Foram realizadas análises de variância e de regressão para o fator concentrações de As em solução, para avaliação do comportamento das atividades enzimáticas testadas e para análise das características da estrutura interna radicular. Para a detecção de diferenças entre os tratamentos foram colocadas barras representativas do erro-padrão da média e realizada a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante

A atividade da enzima SOD teve aumento significativo nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de As em solução nas folhas e na concentração de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de As em relação as concentrações inferiores a estas, porém na concentração mais alta (4,0 mg.L<sup>-1</sup>) foi observado um decréscimo na atividade desta enzima, em que não houve diferença significativa quando comparada as concentrações iniciais de As, tanto para as folhas quando para o sistema radicular (Figura 1).

O aumento da atividade da SOD ocorrido nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> pode ser atribuído a uma maior produção de EROs nessas concentrações portanto, estimulando sua atividade enzimática. No entanto na concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, apesar de também ter causado estresse oxidativo pela maior concentração de As, provavelmente tenha ocorrido o desbalanço entre a produção de EROs e a capacidade de defesa antioxidante da SOD, fazendo com que sua atividade decrescesse nesta concentração de As.

Em diversos estudos foi observado o aumento da atividade da SOD em plantas na presença de metais-traço (Vitória et al., 2001; Nascimento, 2007), porém decréscimos em sua atividade também foram encontrados em vários estudos realizados com plantas sob a contaminação por elementos-traço (León et al., 2002; Polle et al., 2002). Portanto, a presença de elementos-traço altera a atividade das enzimas antioxidantes podendo inibi-las ou estimulá-las (Toppi & Gabrielli, 1999). A inibição pode ser tanto pela quantidade limitada de enzima disponível para a quantidade de EROs a ser combatida, quanto por inibição em sua síntese.

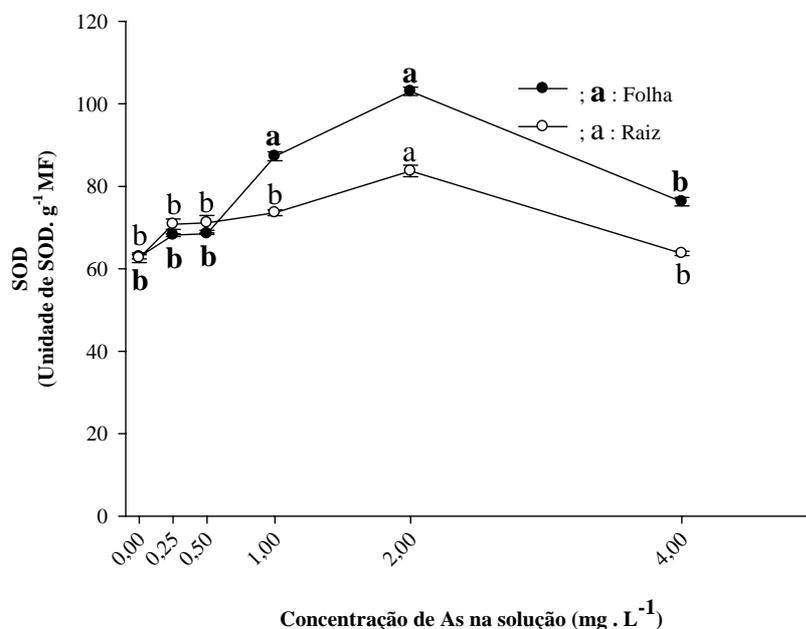


FIGURA 1 Atividade da enzima SOD (unidade de SOD g.MF<sup>-1</sup>) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de As (mg.L<sup>-1</sup>). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de As testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

A enzima CAT no sistema radicular apresentou maior atividade na maior concentração de As (4,0 mg.L<sup>-1</sup>). Nas folhas não foi observada diferença significativa para a atividade da CAT nas diferentes concentrações de As em solução, embora tenha sido observado aumento da atividade nas concentrações mais baixas de As (0,25 e 0,50 mg.L<sup>-1</sup>) seguidas de decréscimo em sua atividade nas concentrações mais elevadas de As em solução (Figura 2). O aumento da atividade da CAT na maior concentração observado nas raízes, pode ser explicado pelo estímulo de sua atividade pela maior formação de EROs. O

comportamento diferenciado da CAT nesta mesma concentração nas folhas e nas raízes, provavelmente foi ocasionado por uma maior formação de EROs nas raízes, devido ao fato deste órgão concentrar e acumular maior quantidade de As, provocando a maior formação dessas EROs em raízes do que nas folhas.

Estudos relatam maior concentração de elementos-traço nas raízes, devido a existência de barreiras apoplásticas como a endoderme, que contribuem para a menor translocação destes elementos para a parte aérea (Lux et al., 2004).

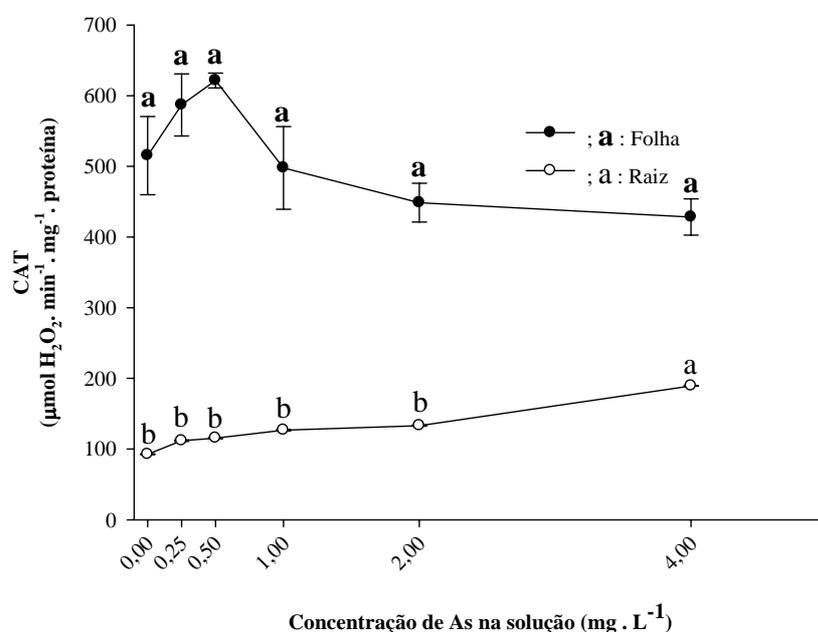


FIGURA 2 Atividade da enzima CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína}$ ) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de As ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de As testadas na solução ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

A atividade da APX aumentou significativamente nos tratamentos com presença de As em relação ao tratamento controle, em que sua maior atividade foi encontrada na concentração de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> nas folhas e nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> nas raízes. Após estas concentrações, ocorreu decréscimo na atividade por inibição enzimática ou na síntese destas enzimas (Figura 3).

Pelo fato da atividade da APX nas raízes observadas nas maiores concentrações do metalóide ter apresentado decréscimo, provavelmente a atividade da CAT tenha sido aumentada em detrimento à APX como mecanismo compensatório (Vandenabeele et al., 2004), visto a necessidade do equilíbrio das enzimas CAT e APX, essencial ao controle de EROs (Bowler et al., 1991), portanto conferindo sucesso ao ajuste do sistema antioxidante à contaminação por As, conferindo tolerância a espécie *P. stratiotes* a este poluente.

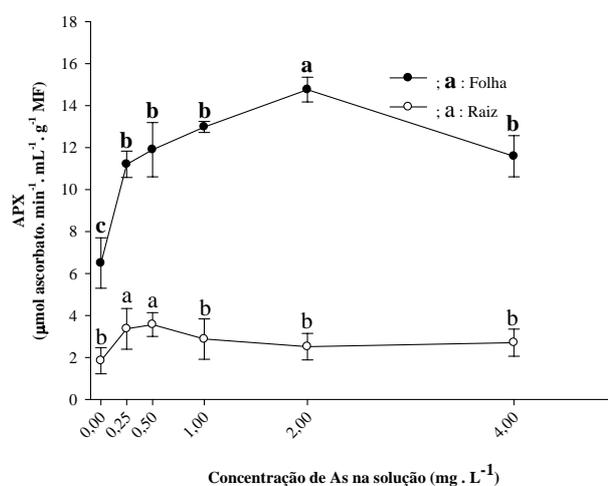


FIGURA 3 Atividade da enzima APX ( $\mu\text{mol ascorbato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MF) do sistema radicular e de folhas de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de As ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de As testadas na solução ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

O estímulo às enzimas do sistema oxidantes em *P. stratiotes* na presença de As, indica a possibilidade de controle do estresse oxidativo ocasionado pela contaminação por este metalóide, indicando estratégias adaptativas de tolerância desta espécie a este elemento.

## **5.2 Anatomia radicular**

A epiderme, exoderme e endoderme foram espessadas de acordo com o aumento de As na solução (Figuras 4, 5 e 6).

Segundo Enstone et al. (2003) e Ramos et al. (2009) , aumentos na espessura da epiderme, exoderme e endoderme em resposta à contaminação por elementos-traço no meio de cultivo, funcionam como filtros no processo de absorção destes poluentes, em que a endoderme e a exoderme constituem barreiras apoplásticas que exercem a função de proteção contra estresses ocasionados por estes elementos. Portanto, a proporção da raiz ocupada por estas barreiras apoplásticas é importante para a proteção de seus tecidos internos contra o efeito tóxico dos elementos-traço, proporcionando às plantas mecanismos de tolerância a estes poluentes.

Ao estudar o efeito de concentrações crescentes de Zn em plantas de *Eucalyptus urophylla* Ramos et al. (2009) observou aumento da espessura das células epidérmicas da raiz de acordo com o aumento das concentrações de Zn fornecidas, como um mecanismo de proteção contra a ação tóxica deste metal, confirmando que este é um mecanismo adaptativo de plantas submetidas ao estresse por elementos-traço, assim como os resultados encontrados nesse experimento.

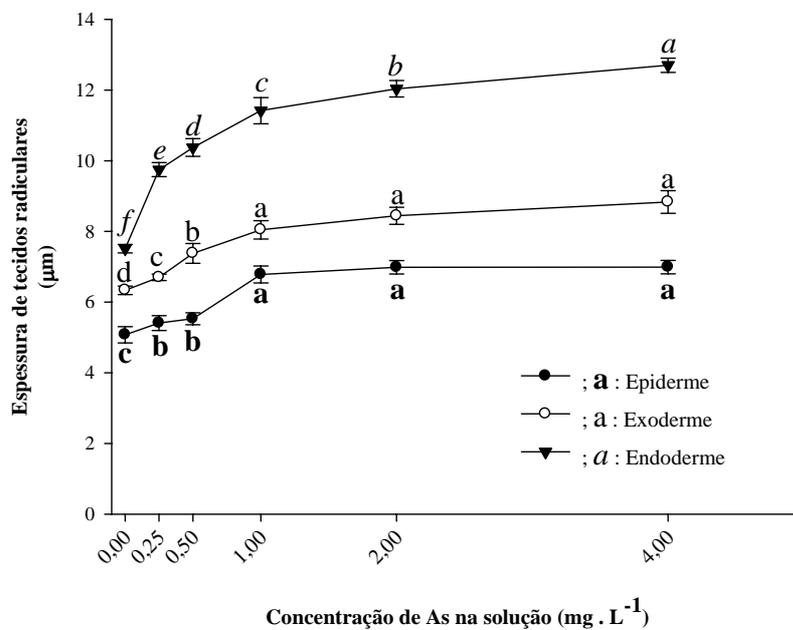


FIGURA 4 Espessura ( $\mu\text{m}$ ) de tecidos radiculares de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de As ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas referentes à mesma linha de tendência indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de As testadas na solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

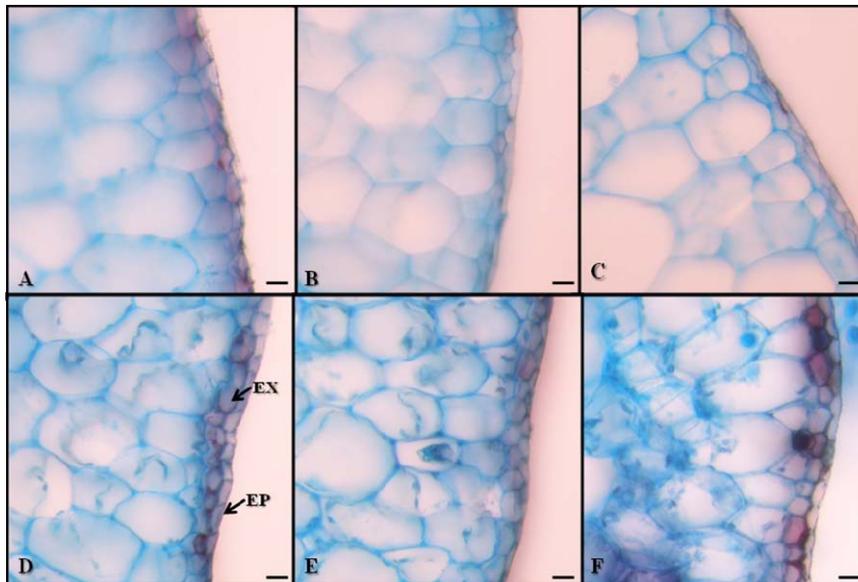


FIGURA 5 Fotomicrografia de secções transversais de raízes de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de arsênio. **A** - 0 mg.L<sup>-1</sup> de As; **B** - 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de As; **C** - 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de As; **D** - 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de As; **E** - 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de As; **F** - 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de As. **EP**: Epiderme; **EX**: Exoderme. Barra = 15 μm.

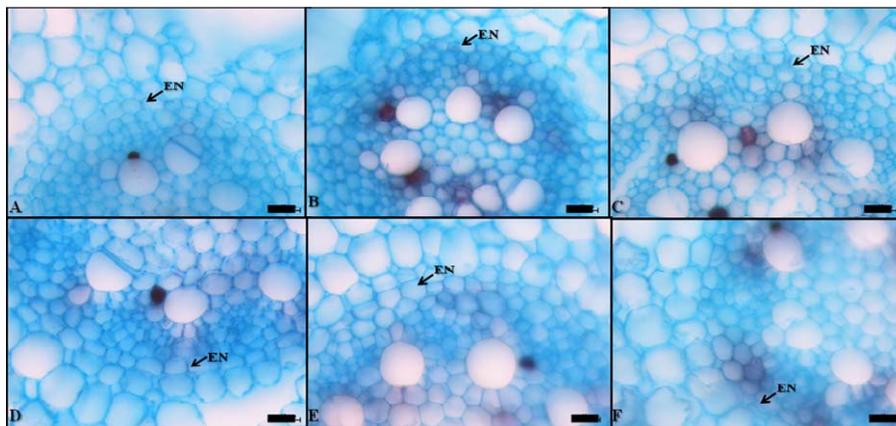


FIGURA 6 Fotomicrografia de secções transversais de raízes de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de arsênio. **A** - 0 mg.L<sup>-1</sup> de As; **B** - 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de As; **C** - 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de As; **D** - 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de As; **E** - 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de As; **F** - 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de As. **EN**: Endoderme. Barra = 15 μm.

A porcentagem de aerênquima no córtex diminuiu de acordo com o aumento da concentração de As (Figuras 7 e 8), provavelmente em resposta a toxicidade provocada por este elemento. Foi observada redução de aproximadamente 36% da porcentagem de área do córtex ocupada por aerênquima no tratamento sem As, para o tratamento de maior concentração de As ( $4,0\text{mg.L}^{-1}$ ) (Figura 7). No entanto, esta redução não foi suficiente para afetar a flutuação das plantas, não comprometendo sua utilização na remediação de ambientes contaminados por As.

Estudos com plantas aquáticas sob concentrações crescentes de elementos-traço revelam alterações nos aerênquimas de acordo com o aumento da exposição a estes poluentes (Souza et al., 2009; Santos, 2009), porém tem sido relatada a desintegração de células seguida por aumento no tamanho dos aerênquimas e portanto na área por eles ocupada no córtex, em resposta a produção de etileno pelo estímulo anaeróbico (Chen & Kao, 1995; Souza et al., 2009), ou por desbalanço com a auxina, provocando também a produção de etileno, que por sua vez acelera a atividade de enzimas celulases levando a formação de aerênquimas (Santos, 2009), contrariando os dados encontrados neste trabalho. Alguns estudos sugerem ainda que EROs produzidas durante o estresse oxidativo causado pelos elementos-traço podem ativar a morte celular programada (Gratão et al., 2005), o que contribuiria na formação de aerênquimas lisígenos, como é o caso dos encontrados em *P.stratiotes*.

Portanto, a redução da área cortical com presença de aerênquima neste caso, provavelmente deve estar relacionada à inibição enzimática, das enzimas responsáveis pela formação do aerênquima, ocasionada possivelmente pela toxicidade do elemento-traço arsênio, visto que a presença de elementos-traço altera a atividade de diversas enzimas como as do sistema antioxidante, redutase do nitrato e celulases, as inibindo ou estimulando (Toppi & Gabbrielli, 1999),

seja por inibição enzimática das mesmas, ou por efeito inibitório na via de síntese destas enzimas.

Porém, pesquisas devem ser conduzidas, posteriormente, para investigar o efeito do As na formação de aerênquimas em *P. stratiotes*, avaliando-se as enzimas envolvidas neste processo, visando a maior compreensão desse efeito ocasionado por este metalóide .

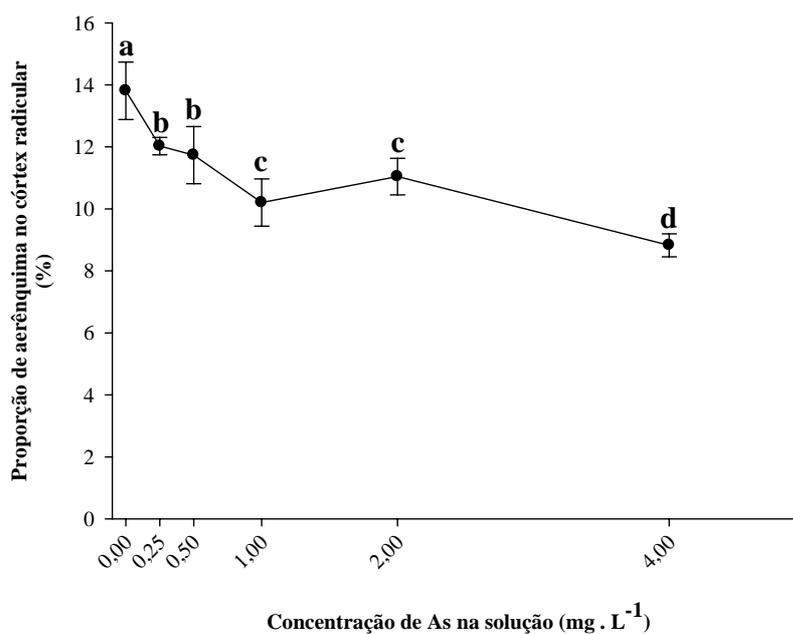


FIGURA 7 Proporção de aerênquimas no córtex radicular de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de As (mg.L<sup>-1</sup>). As barras representam o erro-padrão da média. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias nas concentrações de As testadas na solução (mg.L<sup>-1</sup>), pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

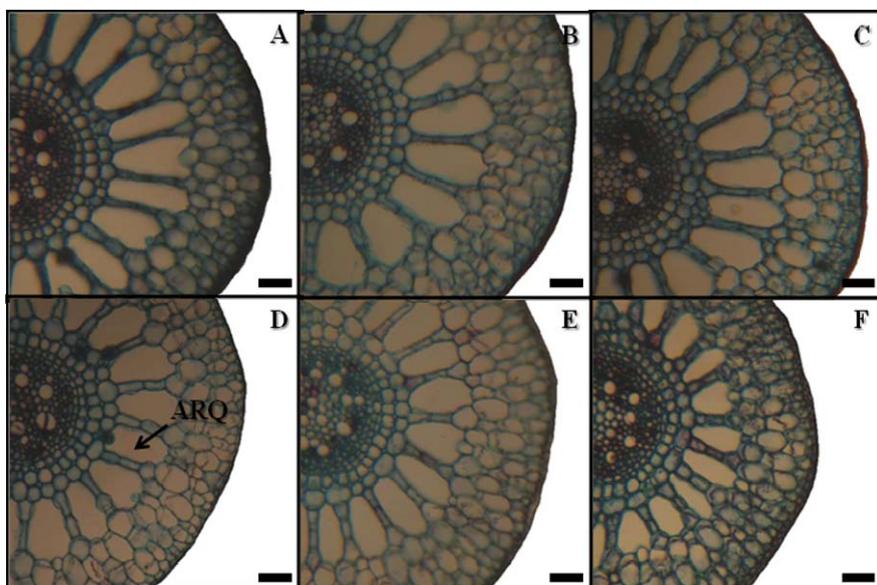


FIGURA 8 Fotomicrografia de secções transversais de raízes de *Pistia stratiotes* sob concentrações crescentes de arsênio. **A** - 0 mg.L<sup>-1</sup> de As; **B** - 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de As; **C** - 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de As; **D** - 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de As; **E** - 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de As; **F** - 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de As. **ARQ**: Aerênquima. Barra = 50 µm.

## 6 CONCLUSÕES

A ação combinada das enzimas do sistema antioxidante aliada a sua capacidade de resposta aos estímulos fornecidos pela presença de As no meio de cultivo, indicam a capacidade de controle do estresse oxidativo ocasionado pela contaminação por este metalóide, como uma estratégia adaptativa da espécie *P. stratiotes*, conferindo-lhe mecanismos de tolerância a este elemento.

Embora a espécie *P. stratiotes* tenha reduzido a proporção de aerênquima de acordo com o incremento da concentração de As em solução, este fato não prejudicou a capacidade de flutuação das plantas, não afetando sua adaptabilidade a ambientes contaminados por este metalóide. O espessamento da epiderme, exoderme e endoderme funcionando como barreiras apoplásticas são consideradas mecanismos adaptativos que proporcionam tolerância desta espécie ao As.

Os mecanismos encontrados neste estudo contribuem para o potencial fitorremediador de *P. stratiotes* na depuração de ambientes aquáticos contaminados por As.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p. 280-292, Feb. 1998.
- BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, Clare, v. 164, n. 1, p. 77-84, Jan. 2003.
- BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRANDEN, S.; DERYCKE, R.; BOTTERMAN, J.; SYBESMA, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Manganese superoxide-dismutase can reduce cellular-damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 10, n. 7, p. 1723-1732, July 1991.
- BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2005.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.
- BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 160 p.
- CHEN, S. L.; KAO, C. H. Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves. **Plant Science**, Clare, v. 104, n. 1, p. 135-138, Jan. 1995.
- COAN, A. I.; SCATENA, V. L.; GIULIETTI, A. M. Anatomia de algumas espécies aquáticas de Eriocaulaceae brasileiras. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 16, n. 4, p. 371-384, mar. 2002.
- ENSTONE, D. E.; PETRESON, C. A.; MA, F. S. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 21, n. 4, p. 335-351, June 2003.

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; MÓDENES, A. N.; COSTA JUNIOR., I. L.; PALÁCIO, S. M.; SZYMANSKI, N.; TRIGUEIROS, D. E. G.; KROUMOV, A. D.; SILVA, E. A. Kinetics of lead bioaccumulation from a hydroponic medium by aquatic macrophytes *Pistia stratiotes*. **Water, Air and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 203, n. 1/4, p. 29-37, Oct. 2009a.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GRATÃO, P.L.; PRASSAD, M.N.V.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Phytoremediation: Green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 1, p. 53-64, jan./mar. 2005.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular 347).

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principle and practice**. San Francisco: W.H. Freeman, 1962. 408 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KABATA-PENDIAS, A. Soil-plant transfer of trace elements: an environmental issue. **Geoderma**, Amsterdam, v. 122, n. 2/4, p. 143-149, Oct. 2004.

LÉON, A. M.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R. M.; DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 10, p. 813-820, Oct. 2002.

LUX, A.; SOTTNÍKOVA, A.; OPATMÁ, J.; GREGER, M. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, n. 4, p. 537-545, Aug. 2004.

MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R.; MAINE, M. A. Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 58, n. 1, p. 53-61, Jan. 2009.

NAKANO, Y.; ASSADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

NASCIMENTO, K. J. T. **Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio**. 2007. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O; JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de *Salvinia* e aguapé. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O. Índice de translocação de nutrientes em mudas de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 4, p. 467-473, jul./ago. 2002.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2008.

POLLE, A.; SCHÜTZENDÜBEL, A. Heavy metal signaling in plants: linking cellular and organismic responses. **Topics in Current Genetics**, Berlin, v. 4, p. 187-215, Sept. 2003.

RAMOS, S. J.; CASTRO, E. M.; PINTO, S. I. C.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, C.; PEREIRA, G. C. Uso de silício na redução da toxidez de zinco em mudas de eucalipto. **Interciência**, Caracas, v. 34, n. 3, p. 139-194, Mar. 2009.

SANTOS, C. L. **Acúmulo e toxidez de manganês em macrófitas aquáticas flutuantes livres**. 2006. 48 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SKINNER, K.; WRIGHT, N.; PORTER-GOFF. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 1, p. 234-237, Jan. 2007.

SOUZA, V. L.; SILVA, D. C.; SANTANA, K. B.; MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A. A. F.; MANGABEIRA, P. A. O.; ROCHA, E. A. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 2, p. 343-354, set. 2009.

TOPPI, L. S. di; GABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 105-130, Apr. 1999.

VANDENABEELE, S.; VANDERAUWERA, S.; VUYLSTEKE, M.; ROMBATUS, S.; LANGEBARTELS, C.; SEIDLITZ, H. K.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 45-58, July 2004.

VITÓRIA, A. P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 701-710, July 2001.