



FABRICIO JOSÉ PEREIRA

**CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E
FISIOLÓGICAS DE AGUAPÉ E ÍNDICE DE
FITORREMEDIAÇÃO DE ALFACE D'ÁGUA
CULTIVADOS NA PRESENÇA DE ARSÊNIO,
CÁDMIO E CHUMBO**

LAVRAS - MG

2010

FABRICIO JOSÉ PEREIRA

**CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE AGUAPÉ E
ÍNDICE DE FITORREMEDIAÇÃO DE ALFACE D'ÁGUA
CULTIVADOS NA PRESENÇA DE ARSÊNIO, CÁDMIO E CHUMBO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador
Dr. Evaristo Mauro de Castro

LAVRAS – MG

2010

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

Pereira, Fabricio José.

Características anatômicas e fisiológicas de aguapé e índice de fitorremediação de alface d'água cultivados na presença de arsênio, cádmio e chumbo / Fabricio José Pereira. – Lavras : UFLA, 2010.
116 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. Anatomia ecológica. 2. Elementos tóxicos. 3. Trocas gasosas.
4. Sistema antioxidante. 5. Macrófitas aquáticas. 6. Metais pesados.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.32

FABRICIO JOSÉ PEREIRA

**CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE AGUAPÉ E
ÍNDICE DE FITORREMEDIAÇÃO DE ALFACE D'ÁGUA
CULTIVADOS NA PRESENÇA DE ARSÊNIO, CÁDMIO E CHUMBO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de agosto de 2010.

Dr. Marcelo Polo	Unifal-MG
Dr. José Donizeti Alves	UFLA
Dr. Valdemar Faquin	UFLA
PhD. Renato Paiva	UFLA

Dr. Evaristo Mauro de Castro
Orientador

**LAVRAS - MG
2010**

AGRADECIMENTOS

Primeiro, a Deus, por possibilitar tudo o que vivemos e por guiar nossas ações e nos dar força para prosseguir.

A minha esposa, Andréa e ao meu filho, Thales, principais motivadores de minha vida e da minha luta.

Aos meus pais, José Nicodemos e Catarina, pelo incentivo e ajuda em momentos difíceis, e ao meu irmão, Fabio e minhas irmãs, pelo apoio e auxílio.

Ao professor Dr. Evaristo Mauro de Castro, pela orientação, oportunidades e amizade, imprescindíveis para a realização deste trabalho e cuja amizade e profissionalismo contribuíram para meu desenvolvimento profissional.

Ao Dr. Marcelo Polo, pela amizade, orientação e minha iniciação no ambiente acadêmico e de pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da UFLA e professores, Dr. Luis Edson, Dr. Amauri, PhD. Chalfun, PhD. Renato, Dr. Donizeti, Dra. Ângela e todos os outros e aos técnicos e funcionários, que não se limitam às disciplinas, mas cuja boa vontade os coloca sempre à disposição para nos ajudar. Ao CNPq, pela bolsa de Doutorado e FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

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

RESUMO

A contaminação do ambiente por elementos tóxicos é um problema crescente no mundo inteiro, sendo a fitorremediação uma tecnologia limpa e de baixo custo para remover os poluentes do solo e da água. Esse trabalho teve como objetivo verificar o potencial de *Eichhornia crassipes* para tolerar cinco níveis diferentes de contaminação por As, Cd e Pb, e quais mecanismos estão envolvidos com essa tolerância ao estresse, além de explorar um modelo matemático para explicar a fitorremediação. As plantas de *E. crassipes* foram cultivadas em solução de Hoagland em casa de vegetação sob cinco concentrações de As, Cd e Pb. Foram avaliadas as trocas gasosas a atividade de enzimas do sistema antioxidante e as modificações anatômicas das raízes e folhas. As plantas demonstraram aumento na fotossíntese, na condutância estomática, na transpiração e na relação Ci/Ca, um aumento na atividade de enzimas do sistema antioxidante principalmente nas folhas em relação às raízes nos tratamentos contendo As, Cd e Pb. As características anatômicas nas folhas exibiram aumento na densidade estomática, no índice estomático, e no parênquima esponjoso. A anatomia das raízes não demonstrou evidências de toxidez por As, Cd e Pb e demonstraram melhorias nas características do xilema e floema. O As, Cd e Pb nas concentrações testadas não promoveram efeitos tóxicos em *E. crassipes*, e os mecanismos de tolerância demonstram alto potencial dessa espécie para a fitorremediação. O modelo matemático foi testado em plantas de *Pistia stratiotes*, cultivadas nas mesmas condições descritas para o aguapé. O índice de fitorremediação foi capaz de detectar as diferenças entre os tratamentos e de prever o tempo necessário para a fitorremediação.

Palavras-chave: Anatomia ecológica. Sistema antioxidante. Trocas gasosas. Elementos tóxicos. Fitorremediação.

ABSTRACT

Environment contamination by toxic elements is a growing problem worldwide, and the phytoremediation is a clear and low cost technology to remove soil and water pollutants. This work aimed to verify the potential of *Eichhornia crassipes* to cope with five levels of As, Cd and Pb and what mechanisms are involved to the stress tolerance, and to explore a mathematical model that explain the phytoremediation. Plants of *E. crassipes* were grown in Hoagland nutrient solution in greenhouse under five As, Cd and Pb concentrations. Gas exchanges, antioxidant system, and modifications on the leaf and root anatomy were evaluated. Plants exhibited increase in photosynthesis, stomatal conductance, transpiration rate, Ci/Ca rate and in all antioxidant system enzymes with higher activities on leaves compared to roots in all As, Cd and Pb treatments. Anatomical traits in leaves showed increase in stomatal density, stomatal index and spongy parenchyma. Root anatomy showed no toxic effects of As, Cd, and Pb and improvement of xylem and phloem characteristics. Arsenic, cadmium and lead in the tested levels don't promoted toxic effects on *E. crassipes*, and the tolerance mechanisms showed large potential of this specie to phytoremediation. The mathematic model was tested *Pistia stratiotes* plants grown under the same conditions described to water hyacinth. Phytoremediation index was able to detect differences between treatments and to predict the time need to phytoremediation.

Keywords: Ecological anatomy. Antioxidant system. Gas exchanges. Toxic elements. Phytoremediation.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Os elementos tóxicos.....	11
2.2	O arsênio (As).....	12
2.3	O cádmio (Cd).....	14
2.5	O chumbo (Pb).....	15
2.6	A fitorremediação.....	16
2.7	O aguapé (<i>Eichhornia crassipes</i> Mart.).....	17
2.8	O sistema antioxidante.....	18
2.8.1	A catalase (CAT).....	18
2.8.2	A peroxidase do ascorbato (APX).....	19
2.8.3	A dismutase do íon superóxido (SOD).....	20
2.9	A anatomia vegetal.....	21
2.10	As características ecofisiológicas.....	22
3	CONCLUSÃO	22
	REFERÊNCIAS	22
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	22
	ARTIGO 1: MECANISMOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE PLANTAS DE AGUAPÉ PARA A TOLERÂNCIA À CONTAMINAÇÃO POR ARSÊNIO E POTENCIAL USO EM FITORREMEDIAÇÃO	28
1	INTRODUÇÃO	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
3	RESULTADOS	35
4	DISCUSSÃO	45
5	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
	ARTIGO 2: TOLERÂNCIA AO CÁDMIO POR PLANTAS DE AGUAPÉ DEFINIDA POR CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS	54
1	INTRODUÇÃO	56
2	MATERIAL E MÉTODOS	58
3	RESULTADOS	61
4	DISCUSSÃO	70
5	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	74
	ARTIGO 3: CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE AGUAPÉ COMO MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO CHUMBO	79

1	INTRODUÇÃO	81
2	MATERIAL E MÉTODOS	82
3	RESULTADOS	86
4	DISCUSSÃO	94
5	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	99
	ARTIGO 4: UM NOVO ÍNDICE DE FITORREMEDIÇÃO PARA O MANEJO DE SISTEMAS AQUÁTICOS CONTAMINADOS POR ELEMENTOS TÓXICOS	103
1	INTRODUÇÃO	105
2	MATERIAL E MÉTODOS	107
2.1	O modelo	107
2.2	Teste do modelo	109
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
4	CONCLUSÃO	114
	REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

Os elementos tóxicos ocorrem naturalmente em formações rochosas sendo lentamente liberados no solo durante a sua formação e lixiviados para ecossistemas aquáticos durante as chuvas. Contudo, as recentes atividades humanas como a indústria, mineração e agricultura vem promovendo a sua acumulação em alguns ambientes bem como nos efluentes dessas atividades (GRATÃO et al., 2005).

A crescente intensidade com a qual esses elementos vem sendo acumulados no ambiente, promoveu uma intensa preocupação e um aumento na quantidade de pesquisas relacionadas à descontaminação do solo e ambientes aquáticos (AZEVEDO; LEA, 2005). Contudo, a diversidade de elementos, bem como a complexidade das interações desses com o ambiente dificulta o processo de extração e descontaminação (GRATÃO et al., 2005). Na atualidade, existem métodos físicos e químicos de extração dos metais, entretanto, são onerosos e envolvem procedimentos que necessitam de um manejo do solo ou água, que podem gerar novos resíduos.

As plantas são capazes de crescer em diferentes ambientes sujeitos aos mais variados tipos de estresse e de pressões ambientais (PUGNAIRE; VALLADARES, 2007). A Fitorremediação é o processo que utiliza as plantas para a remoção de elementos tóxicos de solos e ecossistemas aquáticos contaminados.

A fitorremediação utilizando macrófitas aquáticas é uma opção que advém da adaptabilidade dessas plantas aos diferentes ambientes, da grande capacidade de absorção de elementos e intenso crescimento populacional com enorme produção de biomassa. Tais características produziram indícios da capacidade dessas espécies, em especial o aguapé (*Eichhornia crassipes* Mart.)

como uma alternativa para o tratamento de ambientes aquáticos contaminados (THOMAZ; BINI, 2003; RUBIO et al., 2004).

A capacidade de tolerância do aguapé a esses ambientes contaminados é atribuída por modificações na fisiologia e na anatomia dessas plantas, pois as modificações morfofisiológicas são essenciais na adaptação das plantas às adversidades do ambiente (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Apesar de diversos trabalhos relatarem a alta capacidade do aguapé na fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por diferentes elementos tóxicos, não se conhece os mecanismos anatômicos e fisiológicos que atribuem a tolerância dessa espécie aos diferentes elementos tóxicos, alvos da fitorremediação.

Dessa forma, o presente trabalho traz análises de caráter anatômico e fisiológico, especificamente na atividade do sistema antioxidante e das características fotossintéticas, e nas modificações na anatomia foliar e radicular dessa espécie. A partir dos dados, apresenta-se um perfil dos mecanismos de tolerância dessa espécie a três elementos tóxicos, comumente relatados na literatura científica, integrando as diferentes respostas no intuito de elucidar as estratégias de tolerância dessa espécie a tais elementos. Apresenta-se ainda um modelo matemático, na forma de um índice fisiológico para facilitar o manejo das espécies utilizadas em técnicas de fitorremediação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Os elementos tóxicos

Elementos classificados tradicionalmente como metais pesados vem se tornando alvo de preocupação no mundo inteiro devido ao excessivo acúmulo no solo e na água, decorrente de atividades antrópicas (GRATÃO et al., 2005). Contudo, a definição metais pesados, apesar de clássica, não é totalmente admitida por todos os pesquisadores, sendo propostas outras definições como metais tóxicos (AZEVEDO; LEA, 2005) e mesmo elemento traço. Contudo esses termos, apesar de utilizados, trazem equívocos conceituais, que não permitem a sua total aceitação. No presente trabalho, tais elementos são referidos como elementos tóxicos, no intuito de minimizar tais equívocos.

Metais são definidos como elementos sólidos à temperatura ambiente (exceto o mercúrio), com aspecto brilhante, alta capacidade de condução de calor e energia elétrica e possuindo ductibilidade (CHANG, 2002), são ainda considerados como elementos pesados e que formam óxidos e hidróxidos básicos (AZEVEDO; LEA, 2005). Elemento traço é um termo que se refere a elementos que estão presentes em quantidades muito baixas em um sistema, na faixa de poucas partes por milhão ou menores (MANAHAN, 2001). O termo metal pesado é associado aos elementos da tabela periódica classificados como metais, com número atômico maior que 20 ou gravidade específica maior que 5 g cm^{-3} (AZEVEDO; LEA, 2005), incluem metais de transição e elementos representativos da tabela periódica, podem incluir elementos essenciais como o ferro (Fe) ou tóxicos como o cádmio (Cd) (MANAHAN, 2001). Toxidez é a capacidade de um elemento ou substância de causar efeito danoso a um organismo vivo, tóxico é um sinônimo para veneno e é um conceito quantitativo, pois a maioria dos compostos tóxicos produzem efeitos em altas concentrações,

mas em concentrações muito baixas podem não exibir efeitos (HOGSON, 2004). Segundo Chang (2002), um elemento é uma substância que não se pode separar em substâncias mais simples por meios químicos.

Em vista dos conceitos apresentados, o conjunto de elementos que promovem algum nível de toxidez nos organismos animal e vegetal podem ser melhor referidos como elementos tóxicos. Essa definição é utilizada no presente trabalho, pois pode ser aplicada tanto a metalóides (ou semimetais) (As) como metais (Cd e Pb), que promovem alguma toxidez aos organismos.

2.2 O arsênio (As)

O arsênio (As) é um elemento classificado como metalóide ou semimetal, possui número atômico 33 e massa atômica 74,92 estando localizado na coluna 5A da tabela periódica (CHANG, 2002). O arsênio é o semimetal mais significativo na poluição da água, sendo responsável por muitos casos de mortalidade (MANAHAN, 2001). O envenenamento agudo em humanos ocorre com uma concentração única de 100 mg aproximadamente e, casos crônicos são relatados com pequenas concentrações constantes de As (MANAHAN, 2001). O As ocorre na crosta terrestre em uma concentração média de 2-5 mg Kg⁻¹, contudo, acumula-se no ambiente devido ao uso de pesticidas, alguns extremamente tóxicos como o arsenato de chumbo [Pb₃(AsO₄)₂]. A refinaria de minérios de ouro, chumbo e cobre gera o arsênio como um efluente e, a mobilidade do arsênio no solo é facilitada pela conversão do ácido arsênio em várias formas metiladas como o ácido metil arsênico por bactérias (MANAHAN, 2001).

Apesar da baixa ocorrência do As na crosta terrestre, em algumas regiões como no Taiwan e na América do Sul, a água pode conter altos teores desse elemento (HOGSON, 2004) além de países como Canadá, México, Chile,

Argentina, EUA, Tailândia, Hungria e Japão (GOSH et al., 2006). O As pode ocorrer em três formas: o íon As^{+5} em compostos orgânicos, íon trivalente As^{+3} em compostos inorgânicos e gás arsina (AsH_3) sendo essa última a forma mais tóxica produzindo efeitos na concentração de $0,05 \text{ mg Kg}^{-1}$. Algumas dessas formas podem ser absorvidas por peixes, após a metilação promovida por bactérias e serem extremamente prejudiciais aos humanos (HOGSON, 2004).

A ingestão aguda de arsênio pode causar em humanos no período de 30 minutos a 2 horas: vômito, diarreia, dor abdominal, irritação no esôfago, vasodilatação, depressão no miocárdio e edema cerebral. Exposições crônicas incluem a hiperpigmentação da pele, anemia e diversos tipos de câncer (HOGSON, 2004).

Nas plantas, o As pode ser relacionado a restrições no crescimento (CHATUVERDI, 2006). O arsênio, em comunidades de microrganismos fotossintéticos, não provocou efeitos significativos na fotossíntese em concentrações baixas, mas, em concentrações mais altas, a fotossíntese foi reduzida (GIDDINGS; EDDLEMON, 1978). Em plantas de feijão, Miteva e Merakchyiska (2002), observaram redução na taxa fotossintética das plantas sob a presença de As no solo. Altas concentrações de arsênio também foram capazes de reduzir a fotossíntese em plantas de aveia (STOEVA; BINEVA, 2003), associadas com um aumento na atividade da peroxidase, na peroxidação lipídica decorrentes da produção de espécies reativas de oxigênio, levando a um estresse oxidativo.

2.3 O cádmio (Cd)

O cádmio (Cd) é um metal, fazendo parte da coluna 2B da tabela periódica, possui número atômico 48 e massa atômica 112,4 (CHANG, 2002), na crosta terrestre ocorre na ordem de 0,15 a 0,20 mg Kg⁻¹ (ALLOWAY, 1990). A deposição de cádmio no ambiente é decorrente de atividades industriais, mineração (associado com zinco e chumbo), o Cd é muito semelhante ao zinco e os processos geoquímicos são associados entre esses dois elementos, quando na água assume a forma iônica Cd⁺² (MANAHAN, 2001).

A ingestão aguda de cádmio pode causar dores abdominais, vômito e, se inalado, pode levar a edema pulmonar e pneumonia, concentrações baixas podem gerar efeitos crônicos, pois demora até 30 anos para eliminar o cádmio do organismo humano e os primeiros órgãos afetados são os rins (HOGSON, 2004).

Nas plantas, o Cd pode promover redução no crescimento e estímulo do sistema antioxidante, como na atividade da dismutase do superóxido (SOD), reduções na catalase (CAT) e peroxidase (POD) em plantas de *Pinus sylvestris* (SCHÜZENDÜBEL et al., 2001). Podem reduções no conteúdo de clorofila, na fotossíntese e na atividade da rubisco em plantas de *Phragmites australis* (PIETRINI et al., 2003). Nas plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*), o sistema antioxidante foi estimulado, aumentando a atividade da CAT, SOD e POD na presença de Cd (ODJEGBA; FASIDI, 2007).

2.5 O chumbo (Pb)

O chumbo é um metal, possui número atômico 82, massa atômica de 207,2 estando localizado na coluna 4A da tabela periódica (CHANG, 2002). Na crosta terrestre a concentração de chumbo pode variar entre 5 a 20 mg Kg⁻¹, dependendo do tipo de rocha, sendo as rochas sedimentares as que possuem os mais elevados teores para o chumbo (PEDRAZZOLI, 2004).

A deposição do chumbo no ambiente ocorre por processos como a utilização de gasolina em automóveis, indústria de tintas e indústria de baterias, existe na forma iônica Pb⁺² nos efluentes (MANAHAN, 2001). É um dos mais antigos metais utilizados pelo homem, contribuindo para a sua deposição no ambiente.

A intoxicação aguda pode causar distúrbios nos rins, fígado, no cérebro e demais partes do sistema nervoso. O sistema nervoso é o primeiro órgão a sofrer com a toxidez do chumbo, podendo levar, principalmente crianças a problemas mentais, sequelas ou mesmo à morte (MANAHAN, 2001; HOGSON, 2004).

O Pb em cianobactérias, promoveu reduções no conteúdo de clorofila e na fotossíntese, relacionados diretamente com restrições no funcionamento do fotossistema II (PINCHASOV; BERNER; DUBINSKY, 2006). Em plantas de arroz, o chumbo provocou a peroxidação lipídica, um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, sendo que as POD foram mais ativas que a SOD (VERMA; DUBEY, 2003). Muitos trabalhos relatam ainda restrições no crescimento das plantas.

2.6 A fitorremediação

A grande variedade de tipos e classes de poluentes que são depositadas no ambiente dificulta os processos de descontaminação de solos e ecossistemas aquáticos. A fitorremediação consiste na utilização de plantas para a remoção desses contaminantes e é uma técnica recente que vem sendo empregada com resultados positivos (GRATÃO et al., 2005). Para o uso em elementos tóxicos, essa tecnologia depende da identificação de plantas hiperacumuladoras (GRATÃO et al., 2005).

Processos físicos e químicos envolvidos com a descontaminação de solos e água contaminada, são onerosos, exigem grande mão de obra e envolvem problemas legais, sendo difíceis de aplicar. Na fitoextração e na fitorremediação as plantas são utilizadas para remover o elemento do solo que depois pode ser recuperado da biomassa para a reutilização (GRATÃO et al., 2005). A fitorremediação depende da identificação de plantas hiperacumuladoras, que são pouco conhecidas quanto à fisiologia e características de produção, devendo ser alvo de mais estudos (GRATÃO et al., 2005).

A utilização de plantas transgênicas é uma alternativa recente que está começando a ser explorada para a fitorremediação. Plantas transgênicas são desenvolvidas a partir de genes relacionados à tolerância aos metais pesados como os relacionados às enzimas do sistema antioxidante, às fitoquelatinas e ao metabolismo do selênio (GRATÃO et al., 2005).

Em ambiente aquático, a fitorremediação é atribuída principalmente ao uso de macrófitas aquáticas como o aguapé (*Eichhornia crassipes*), o alface d'água (*Pistia stratiotes*), a salvinia (*Salvinia auriculata*), que podem ser potenciais para a remoção de elementos tóxicos e efluentes de esgoto, sendo de extremo interesse de pesquisas na área de fitorremediação (RUBIO et al., 2004; WOLFF et al., 2008). Apesar das intensas pesquisas em fitorremediação de

ambientes aquáticos, são ainda pouco explorados os aspectos fisiológicos de tolerância dessas plantas.

2.7 O aguapé (*Eichhornia crassipes* Mart.)

O aguapé *Eichhornia crassipes* (Mart.) é uma espécie nativa do Brasil, pertence à família Pontederiaceae, ao gênero *Eichhornia* Kunth, sendo que esse gênero é composto por ervas perenes, aquáticas e acaules. Possuem folhas pecioladas, flores sésseis em inflorescências tipo espiga e com perigônio variável.

O tamanho do rizoma em *E. crassipes* possui relação linear com a biomassa da planta e com o comprimento do pecíolo. As plantas dessa espécie parecem se adaptar melhor em águas mais profundas, pois a estrutura das plantas depende das folhas como flutuadores (pseudobulbos ricos em aerênquima) quando isoladas e, da conectividade entre os indivíduos da população quando os indivíduos são adensados (PETRELL; BAGNALL; SMERAGE, 1991; MILNE; MURPHY; THOMAZ, 2006).

Essa espécie foi considerada, durante muito tempo, como uma planta daninha em lagoas e represas. Contudo, percebeu-se o grande potencial dessa espécie em remover poluentes e melhorar a qualidade da água, voltando-se atenções a essa espécie no sentido de sua utilização (MALAVOLTA et al., 1989). A espécie demonstra grande potencial como adubo verde por conter, em condições naturais, altos teores de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio e dos demais micro e macronutrientes (MALAVOLTA et al., 1989).

A espécie possui enorme potencial para a fitorremediação, sendo que *E. crassipes*, demonstrou capacidade para a hiperacumulação de cromo (FAISAL; HASNAIN, 2003), acumulando ainda Cd proporcionalmente ao tempo de exposição e à concentração desse elemento na solução (OLIVEIRA et al., 2001).

A espécie ainda demonstrou potencial para a fitorremediação de efluentes de biofertilizantes contendo zinco e cobre (MONDARDO; GONÇALVES JÚNIOR; SACON, 2006) e para a hiperacumulação de arsênio (DHANKHER et al., 2002; SNYDER, 2006). A capacidade para a hiperacumulação e fitorremediação do chumbo de *E. crassipes* foi descrita por Gonçalves Júnior et al. (2008), a hiperacumulação do Pb nessa espécie parece ser dependente da relação entre a massa fresca da planta e o volume da solução, sendo que fatores como pH e temperatura podem não influenciar no processo (SCHOENHALS; OLIVEIRA; FOLLADOR, 2009).

2.8 O sistema antioxidante

O sistema antioxidante é composto por um conjunto de enzimas e pigmentos com função de reduzir a produção ou permitir a remoção das chamadas espécies reativas de oxigênio, sendo os principais: o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) sendo produzidos por diferentes tipos de estímulos como: elementos tóxicos, alagamento e excesso de luz e calor (MOLLER, 2001).

2.8.1 A catalase (CAT)

A enzima catalase (EC 1.11.1.6.), é uma $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ oxirredutase, foi isolada ainda no início do século XX. É uma proteína tetramétrica com um anel porfirínico ligada a átomos de ferro, catalisa a reação que converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e em oxigênio molecular (O_2) (FRUGOLI et al., 1996).

A CAT pode se apresentar na forma de várias isoenzimas e estas são codificadas por diferentes genes e cuja expressão pode ocorrer em todos os órgãos da planta. Nas planas de *Arabidopsis thaliana* ocorrem seis formas da enzima e as mais expressivas podem ser a Catalase 1, 2 e 3 codificadas pelos genes Cat1, Cat2 e Cat3, respectivamente. A Cat1 é a mais importante para as plantas e está presente nos peroxissomos e responsável por 80% da atividade desta enzima nas plantas; a Cat2 está localizada nos tecidos vasculares e a Cat3 no citosol (FRUGOLI et al., 1996; SCANDALIOS, 1990).

O mecanismo de ação da catalase envolve duas etapas. Na primeira, o H_2O_2 reage com o Fe do grupo heme da catalase, formando peróxido de ferro e a reação pode, então, tomar dois rumos: se existe alta concentração de H_2O_2 no substrato, o peróxido de ferro reage novamente com outra molécula de H_2O_2 , formando H_2O e O_2 . Se existir baixa concentração de H_2O_2 no substrato, o peróxido de ferro pode ser reduzido por doadores de H^+ , como o etanol e o ácido ascórbico. A atividade da CAT pode ser modificada por fatores ambientais, como: temperatura, radiação UV e contaminação do solo por metais pesados como o níquel (POMPEU, 2005).

2.8.2 A peroxidase do ascorbato (APX)

O substrato mais importante para a remoção do H_2O_2 da planta é o ácido ascórbico (ascorbato) (MADHUSUDHAN et al., 2003). A enzima peroxidase do ascorbato (EC 1.11.1.11) é responsável pela oxidação de duas moléculas de ascorbato para a redução de uma molécula de H_2O_2 em H_2O ; o ascorbato posteriormente é regenerado no ciclo da glutatona-ascorbato (NOCTOR; FOYER, 1998).

A APX é muito importante para o sistema antioxidante das plantas e algas, sendo encontrada em diferentes compartimentos celulares, como no

estroma e membrana tilacóide dos cloroplastos e no citosol. A atividade da enzima pode ser modificada por diferentes estresses ambientais, como a presença de O₃, luminosidade, estresse hídrico, patógenos e metais pesados (NOCTOR; FOYER, 1998).

2.8.3 A dismutase do íon superóxido (SOD)

A SOD (EC 1.15.1.1) foi isolada na década de 1930 pela primeira vez em sangue bovino, e, devido à presença de cobre e zinco em sua estrutura, acreditava-se que ela era envolvida com o armazenamento desse metal, posteriormente, constatou-se a função de remoção do íon superóxido em diferentes tipos de organismos (SCANDALIOS, 1993). Todas as SOD são metaloproteínas multiméricas, podem ocorrer na forma de CuSOD, ZnSOD, MnSOD e FeSOD sendo todas extremamente eficientes na remoção do íon superóxido, sendo que a Cu/ZnSOD são mais comuns em eucariotos e a Mn/FeSOD são mais frequentemente encontradas em procariotos, nas mitocôndrias e em cloroplastos, a enzima (do tipo Cu/ZnSOD) pode ser inibida por cianeto de forma reversível ou de forma irreversível por H₂O₂ (do tipo Mn/FeSOD) (SCANDALIOS, 1993).

Diferentemente dos outros organismos, nas plantas a SOD ocorre em diferentes isoformas, dependendo da localização na célula, a atividade dessa enzima pode ser modificada por diferentes tipos de estresse ambiental, sendo que essa demonstrou alta eficiência para a proteção contra o estresse oxidativo em plantas (SCANDALIOS, 1993).

2.9 A anatomia vegetal

A anatomia vegetal clássica trata da estrutura interna dos órgãos vegetais, e, em um enfoque mais moderno, pela chamada anatomia ecológica, são estudadas as modificações que ocorrem na estrutura interna da planta em função de pressões ambientais, possibilitando a adaptação do organismo àquelas condições ou demonstrando sensibilidade a tais situações (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Em função desse tipo de pressão, os tecidos foliares podem exibir modificações na espessura e proporção, podendo modificar características como: a densidade estomática, o índice estomático, o tamanho dos estômatos, a espessura da epiderme, da cutícula, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso e modificações nos tecidos vasculares. Essas modificações ocorrem em função de estresses como: intensidade de radiação, estresse hídrico e plantas na presença de elementos tóxicos (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; GRISI et al., 2008; COSTA et al., 2009).

As modificações na anatomia das raízes das plantas podem envolver diferenças na espessura da epiderme, do córtex, da endoderme, da exoderme, no tamanho das células, no xilema e floema, no cilindro vascular e na proporção de aerênquima em função de estresses como o alagamento, o estresse hídrico por seca e elementos tóxicos (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; PEREIRA et al., 2008; VASELLATI et al., 2001).

Dessa forma, as respostas anatômicas das folhas e raízes das plantas podem ilustrar características que permitam a adaptação a um determinado tipo de estresse ou, efeitos deletérios promovidos pelo estresse. Permitindo utilizar essa ferramenta no monitoramento dos efeitos dos elementos tóxicos nas espécies em estudo.

2.10 As características ecofisiológicas

Os estresses ambientais podem gerar diferentes reações no metabolismo das plantas, causando disfunções que podem influenciar nas características primárias como o crescimento e desenvolvimento. E essas características, podem ser afetadas inicialmente pela fotossíntese e fatores associados como a transpiração, a condutividade estomática e a relação do carbono interno na folha (Ci) e o carbono externo (Ca) indicando a adaptabilidade ou a sensibilidade da espécie em estudo àquele estresse, que pode ser por deficiência hídrica, alagamento, metais pesados, estresse salino entre outros (LARCHER, 2000; JONES, 1992).

3 CONCLUSÃO

São conhecidas diferentes espécies com potencial para a fitorremediação, bem como diferentes respostas que podem ocorrer na fisiologia e na estrutura das plantas. Contudo, não se conhece as respostas morfofisiológicas do aguapé cultivado na presença de elementos tóxicos e como essas podem ser relacionadas com a tolerância ao estresse. Não se conhece também um modelo eficiente para prever o tempo necessário para a fitorremediação.

REFERÊNCIAS

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New York: J. Wiley, 1990. 339 p.

AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J. Toxic metals in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 1-1, Jan./Mar. 2005.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CHANG, R. **Química**. 7. ed. Bogotá: D`Vinni, 2002. 941 p.

CHATUVERDI, I. Aspects of arsenic concentrations and forms on growth and arsenic uptake and accumulation by indian mustard (*Brassica juncea* L.) genotypes. **Journal of Central Europe Agriculture**, Zagreb, v. 7, n. 1, p. 31-40, July 2006.

COSTA, F. H. S. et al. Anatomical and physiological modifications of micropropagated 'Caipira' banana plants under natural light. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 323-330, jun. 2009.

DHANKHER, O. P. et al. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, n. 11, p. 1140-1145, Nov. 2002.

FAISAL, M.; HASNAIN, S. Synergistic removal of Cr (VI) by *Eichhornia crassipes* in conjunction with bacterial strains. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 6, n. 3, p. 264-268, Feb. 2003.

FRUGOLI, J. A. et al. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 11, n. 2, p. 327-336, May 1996.

GIDDINGS, J.; EDDLEMON, G. K. Photosynthesis / respiration ratios in aquatic microcosms under arsenic stress. **Water, Air and Soil Pollution**, New York, v. 9, n. 2, p. 207-212, Feb. 1978.

GOSH, P. et al. Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. **International Journal of Cancer**, Malden, v. 118, n. 10, p. 2470-2478, Nov. 2006.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 53-64, Jan./Mar. 2005.

GRISI, F. A. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'Catuaí' e 'Siriema' submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, nov. 2008.

HOGSON, E. **A textbook of modern toxicology**. 3. ed. Haboken: J. Wiley, 2004. 582 p.

JONES, H. G. **Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University, 1992. 428 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

MADHUSUDHAN, R. et al. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, n. 4, p. 550-557. Apr. 2003

MALAVOLTA, E. et al. Sobre a composição mineral do aguapé (*Eichhornia crassipes*). **Anais da Esalq**, Piracicaba, v. 46, n. 1, p. 155-162, jan. 1989.

MANAHAN, S. E. **Fundamentals of environmental chemistry**. Boca Raton: CRC, 2001. 994 p.

MILNE, J. M.; MURPHY, K. J.; THOMAZ, S. M. Morphological variation in *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms in relation to aquatic vegetation type and the environment in the floodplain of the Rio Parana, Brazil. **Hydrobiologia**, New York, v. 570, n. 1, p. 19-25, Oct. 2006.

MITEVA, E.; MERAKCHYISKA, M. Response of chloroplasts and photosynthetic mechanism of bean plants to excess arsenic in soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Sciences**, Sofia, v. 8, n. 2, p. 151-156, Feb. 2002.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review in Plant Physiology**, Rockville, v. 52, n. 1, p. 561-591, June 2001.

MONDARDO, E.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; SACON, E. Uso da macrófita aquática (*Eichhornia crassipes*) na remoção de cobre e zinco em biofertilizante de origem suína. **Ciência Agrônoma Engenharia**, Ponta Grossa, v. 12, n. 2, p. 13-20, ago. 2006.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Rockville, v. 49, n. 1, p. 249-289, June 1998.

ODJEGBA, V. J.; FASIDI, I. O. Changes in antioxidant enzyme activities in *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae) under heavy metal stress. **International Journal of Tropical Biology**, San José, v. 55, n. 3, p. 815-823, Sept./Dec. 2007.

OLIVEIRA, J. A. et al. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 329-341, set./dez. 2001.

PEDRAZZOLI, C. D. **Remediação eletrocínética de chumbo em resíduos industriais**. 2004. 128 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e Processos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PEREIRA, F. J. et al. 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.

PETRELL, R. J.; BAGNALL, L. O.; SMERAGE, G. H. Physical description of water hyacinth mats to improve harvester design. **Journal of Aquatic Plant Management**, Vicksburg, v. 29, n. 1, p. 45-50, Jan. 1991.

PIETRINI, F. et al. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. **Plant Physiology**, Clare, v. 133, n. 2, p. 829-837, Oct. 2003.

PINCHASOV, Y.; BERNER, T.; DUBINSKY, Z. The effect of lead on photosynthesis, as determined by photoacoustics in *Synechococcus leopoliensis* (Cyanobacteria). **Water, Air, and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 175, n. 1, p. 117-125, Feb. 2006.

POMPEU, G. B. **Análise da resposta antioxidativa de células in vitro de fumo (*Nicotiana tabacum* cv – BY 2) submetidas ao metal pesado níquel**. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

PUGNAIRE, F. I.; VALLADARES, F. **Functional plant ecology**. London: CRC, 2007. 724 p.

RUBIO, J. et al. Plantas aquáticas: sorventes naturais. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 205, p. 68-71, jun. 2004.

SCANDALIOS, J. G. Oxigen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 101, n. 1, p.7-12, Jan. 1993.

SCANDALIOS, J. G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 28, n. 1, p. 1-41, Apr. 1990.

SCHOENHALS, M.; OLIVEIRA, V. A.; FOLLADOR, F. A. C. Remoção de chumbo de efluente de indústria recicladora de baterias automotivas pela macrófita aquática *Eichhornia crassipes*. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, p. 55-72, maio/ago. 2009.

SCHÜTZENDÜBEL, A. et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, Clare, v. 127, n. 3, p. 887-898, Nov. 2001.

SNYDER, K. V. W. Removal of arsenic from drinking water by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). **Journal of United States Stockholm Junior Water Prize**, Stockholm, v. 1, n. 1, p. 41-58, Jan. 2006.

STOEVA, N.; BINEVA, T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Sciences**, Sofia, v. 29, n. 1, p. 87-95, Jan. 2003.

THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**. Maringá: EDUEM, 2004. 341 p.

VASELLATI, V. et al. Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. **Annals of Botany**, London, v. 88, n. 3, p. 355-360, Sept. 2001.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alter the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Davis, v. 164, n. 4, p. 645-655, Apr. 2003.

WOLFF, G. et al. 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./mar. 2009.

ARTIGO 1: MECANISMOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE PLANTAS DE AGUAPÉ PARA A TOLERÂNCIA À CONTAMINAÇÃO POR ARSÊNIO E POTENCIAL USO EM FITORREMEDIAÇÃO

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos a avaliação das características anatômicas e fisiológicas de *Eichhornia crassipes* em resposta ao estresse por arsênio. As plantas de *E. crassipes* foram cultivadas em solução de Hoagland em casa de vegetação sob cinco concentrações de arsênio: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ por um período de 20 dias. Foram avaliadas: a taxa fotossintética, a condutância estomática, a taxa transpiratória, a relação Ci/Ca, a atividade da peroxidase do ascorbato, da catalase e da superóxido dismutase em raízes e folhas e as modificações na anatomia das folhas e raízes. As plantas demonstraram um aumento na fotossíntese, na condutância estomática, na transpiração e um aumento na relação Ci/Ca, e na atividade de todas as enzimas do sistema antioxidante, com maior atividade nas folhas em relação às raízes em todos os tratamentos contendo arsênio. As características anatômicas das folhas das plantas sob as maiores concentrações de arsênio exibiram aumento na densidade estomática, no índice estomático e na espessura do parênquima esponjoso, mostrando uma tendência para a assimilação do CO₂. A anatomia radicular não demonstrou sinais de toxidez por arsênio e melhorias nas características do xilema e floema. Dessa forma, o arsênio nas concentrações testadas nesse trabalho não demonstrou efeitos tóxicos para a fisiologia de *E. crassipes*, e os mecanismos de tolerância dessa espécie para o arsênio pode ser relacionada com melhorias nas características fisiológicas e anatômicas dessa espécie, indicando um alto potencial para o seu uso em fitorremediação.

Palavras chave: *Eichhornia crassipes*. Anatomia ecológica. Sistema antioxidante. Fotossíntese.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the anatomical and physiological traits of *Eichhornia crassipes* in response to arsenic stress. Plants of *E. crassipes* were grown in Hoagland nutrient solution in greenhouse under five arsenic levels: 0.0, 0.25, 0.50, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ during 20 days. Photosynthesis rate, stomatal conductance, transpiration rate, Ci/Ca rate, root and leaves ascorbate peroxidase activity, root and leaves catalase activity, root and leaves superoxide dismutase activity and modifications on the leaf and root anatomy were evaluated. The plants exhibited increase in the photosynthesis, stomatal conductance and transpiration rate and increase in the Ci/Ca rate; increase in all antioxidant system enzymes activities with higher activity in leaves than in the roots in all treatments with arsenic. The anatomical traits on the leaves of the plants under higher arsenic levels, exhibited increase in the stomatal density, stomatal index and in the spongy parenchyma showing a CO₂ assimilation tendency. The root anatomy showed no toxic evidences on any arsenic level and in the arsenic treatments the roots exhibited better xylem and phloem traits. So, arsenic in the levels tested in this work do not promote toxic effects on the *E. crassipes* physiology, and the tolerance mechanisms of *E. crassipes* to arsenic can be related to increase in the physiological and anatomical traits, indicating an high potential to its use in phytoremediation

Keywords: *Eichhornia crassipes*. Ecological anatomy. Antioxidant system. Photosynthesis.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente por metais pesados vem se tornando um grave problema no mundo inteiro. Essa contaminação é decorrente de atividades industriais e agrícolas, que promovem a acumulação desses elementos e podem levar a prejuízos na produção agrícola, na biomassa e fertilidade do solo além de uma acumulação nas cadeias tróficas (GRATÃO et al., 2005). O arsênio é um dos mais tóxicos elementos encontrados no ambiente e pode ocasionar diferentes doenças em humanos, por exemplo, diferentes tipos de carcinomas (GOSH et al., 2006).

A remoção do arsênio de locais contaminados não é dificultada por ser de alto custo financeiro e ambiental, sendo a descontaminação química é impraticável em escala ambiental (DHANKHER et al., 2002). A fitorremediação é um processo limpo e de baixo custo utilizando plantas para a remoção dos contaminantes e uma alternativa para a descontaminação desses ambientes (GRATÃO et al., 2005; DHANKHER et al., 2002).

O aguapé (*Eichhornia crassipes*) é uma macrófita aquática pertencente à família Pontederiaceae, nativa do Brasil e na atualidade é encontrada em todo o mundo. Essa espécie possui potencial para a fitorremediação de diferentes metais pesados como o crômio, que é acumulado em altos níveis nessa espécie (FAISAL; HASNAIN, 2003). Essa espécie se mostrou eficaz ainda para a fitorremediação de chumbo, cádmio e crômio em dejetos de suinocultura, sendo hiperacumuladora para esses elementos (GONÇALVES JÚNIOR et al., 2008). É, também, hiperacumuladora para o arsênio, podendo remover até 100% do arsênio presente na solução, sendo esse acumulado principalmente nos órgãos aéreos (SNYDER, 2006).

Os efeitos do arsênio nas características fisiológicas em plantas ainda são pouco estudados. A adição de crescentes concentrações de arsênio em

comunidades de microrganismos fotossintéticos não promoveu efeitos significativos na fotossíntese na concentração de 0,066 mg L⁻¹ mas reduziu a fotossíntese na concentração de 11,5 mg L⁻¹ ou maiores (GIDDINGS; EDDLEMON, 1978). Miteva e Merakchyiska (2002), verificaram a redução na taxa fotossintética de plantas de feijão expostos à diferentes concentrações de arsênio no solo. A redução da taxa fotossintética na presença de altas concentrações de arsênio também foi verificada em plantas de aveia (STOEVA; BINEVA, 2003). Esses autores verificaram ainda um aumento na atividade da peroxidase, e um aumento na peroxidação lipídica decorrentes do estresse por arsênio, que pode ter promovido a produção de espécies reativas de oxigênio, levando a um estresse oxidativo. Demonstrando o efeito desse elemento sobre o sistema antioxidante das plantas.

As modificações anatômicas de *E. crassipes* sob estresse são ainda pouco relatadas, contudo, Mahmood et al. (2005) verificaram diferenças no tamanho das células dos tecidos dessa espécie crescendo sob efluentes de indústria têxtil.

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivos verificar as possíveis modificações nas características anatômicas e fisiológicas de plantas de *E. crassipes* submetidas à diferentes concentrações de arsênio, no intuito de elucidar possíveis mecanismos que atribuam tolerância ou sensibilidade da espécie a esse elemento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes* Mart.) foram coletadas em açudes naturais na região Alfenas-MG sem aparentes fontes de contaminação por arsênio, com mata ciliar desenvolvida e nascente próxima à cerca de 60 m do local. As plantas foram levadas para casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde foram lavadas em água corrente e cultivadas em solução nutritiva de Hoagland à 40% da força iônica por cerca de 30 dias, para aclimatização e obtenção das gerações clonais isentas de qualquer fonte de arsênio endógena.

As plantas filhas foram selecionadas quanto ao tamanho, número de folhas e ausência de estolões para a uniformização das plantas utilizadas nos experimentos. Essas plantas experimentais foram cultivadas em vasos de polipropileno com capacidade para 6 L, contendo 4 L de solução nutritiva de Hoagland à 20% da força iônica acrescida de concentrações crescentes de arsênio sendo: 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹. As concentrações de arsênio aplicadas foram baseadas na concentração máxima permitida pela Res. 357 do CONAMA (WOLFF et al., 2009), correspondendo ao controle (0 mg L⁻¹) e 100, 200, 400 e 800 vezes a concentração máxima permitida, respectivamente, à partir da concentração de 0,25 mg L⁻¹. As plantas foram mantidas nessas condições por um período de 20 dias, após o qual as plantas foram coletadas para as diferentes análises.

Aos 15 dias de exposição aos tratamentos de As, foram avaliadas as características de trocas gasosas foliares das plantas com analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LI-6400. Foram avaliadas a fotossíntese (A), a condutância estomática (g_s), a transpiração (E) e a relação entre carbono interno e externo (C_i/C_a). Essas variáveis foram avaliadas em folhas completamente expandidas em cinco plantas por tratamento, a partir

10:00 horas, a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada no aparelho para $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para as análises anatômicas foram coletadas plantas filhas, completamente desenvolvidas durante o período experimental, ao final dos 20 dias, contendo, folhas e raízes completamente desenvolvidas. As plantas filhas foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e etanol 70% (F.A.A.70) por um período de 72 horas, posteriormente sendo armazenadas em etanol 70% (KRAUS; ARDUIN, 1997). Foram obtidas secções paradermicas das folhas com o uso de lâminas de aço nas faces abaxial e adaxial. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada duas vezes por 10 minutos, coradas com solução de safranina 1% e montadas em lâmina e lamínula com glicerina 50% (JOHANSEN, 1940). Fragmentos de 2 cm das folhas retirados da região contendo a nervura central e fragmentos de 2 cm removidos da região de ramificação das raízes (a 2 cm do ápice radicular) foram cortados em secção transversal com auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC. Os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio, lavados em água destilada duas vezes por 10 minutos, corados com solução safrablau (safranina 1% e azul de astra 0,1% na proporção de 7:3) e montados em lamina e lamínula em glicerina 50%. As lâminas foram fotografadas em microscópio Olympus modelo BX 60 acoplado à câmera digital Canon A630.

As fotomicrografias foram analisadas em software para análise de imagens UTHSCSA-Imagetool medindo-se: EAB= espessura da epiderme da face abaxial, EAD= espessura da epiderme da face adaxial, MF= espessura do mesofilo, CT= espessura da cutícula, PP= espessura do parênquima paliçádico, PE= espessura do parênquima esponjoso, PP/PE= proporção entre parênquima paliçádico e esponjoso, DF= distância entre os feixes vasculares no mesofilo, CB= diâmetro das células da bainha do feixe, PAE= proporção de aerênquima na folha (área/área), NE= número de estômatos por campo; NC= número de

células epidérmicas por campo; POL= diâmetro polar dos estômatos; EQU= diâmetro equatorial dos estômatos; DE= densidade estomática (estômatos por mm^2); FUN= funcionalidade estomática (relação POL/EQU); IE= índice estomático, PAR= proporção de aerênquima no córtex, CC= diâmetro das células corticais, EP= espessura da epiderme, ED= espessura da endoderme, IVC= índice de vulnerabilidade do sistema vascular (índice de vulnerabilidade de Carlquist), PM= diâmetro das células do parênquima medular, EX= espessura da exoderme, FL= espessura do floema. O IVC foi calculado segundo Carlquist, (1975), as proporções de área de aerênquima na raiz segundo Pereira et al. (2008) a DE e o IE foram calculados segundo Castro, Pereira e Paiva (2009).

As amostras de folhas e raízes destinadas às análises enzimáticas foram coletadas aos 20 dias de experimento, no período da manhã sendo congeladas em nitrogênio líquido e preservadas em freezer à -80°C até a data das análises. Para a extração protéica, foram pesados 0,5 g de raízes ou folhas sendo adicionado 2,0 mL de tampão de extração constituído de 1,924 μL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7, 20 μL de EDTA 0,1 M, 8 μL DTT 0,5 M, 16 μL de PMSF 0,1 M e 40 mg de PVPP adaptado de Bor, Özdemir e Türkan (2003). Após homogeneização em nitrogênio líquido, o extrato enzimático foi centrifugado à 14000 g, por 20 minutos, na temperatura de 4°C . Após esse período foi coletado o sobrenadante, com o qual foram realizadas as determinações das atividades das enzimas da dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT).

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi analisada com a adição de 160 μL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7 sendo adicionado 100 μL de ácido ascórbico 0,005 M, 100 μL de H_2O_2 0,005 M, 605 μL de água destilada e 35 μL do extrato enzimático adaptado de Nakano e Asada (1981). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância, a 290 nm, por 2 minutos e calculada com base no fator de

extinção de $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para a avaliação da atividade da catalase (CAT) adicionou-se em $35 \mu\text{L}$ do extrato enzimático, $160 \mu\text{L}$ de tampão fosfato de potássio $0,1 \text{ M}$ pH 7, sendo ainda adicionados $125 \mu\text{L}$ de H_2O_2 $0,01 \text{ M}$ dissolvida no tampão e $680 \mu\text{L}$ de água destilada adaptado de Madhusudhan et al. (2003). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância, a 240 nm por 1 minuto e calculada com base no fator de extinção de $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A análise da atividade da SOD foi realizada segundo o método proposto por Giannopolitis e Ries (1977).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott para $P < 0,05$, ou análise de regressão com auxílio do software estatístico Sisvar.

3 RESULTADOS

Nas condições do experimento, as diferentes concentrações de arsênio na solução nutritiva promoveram efeitos nas características de trocas gasosas das plantas de aguapé. Ocorreu um aumento na taxa fotossintética já na primeira concentração de arsênio na solução. Em comparação com o controle ocorreu um aumento de $24,8\%$ na taxa fotossintética, sendo que ocorreu ainda um aumento de $15,9\%$ da concentração de $0,25$ para a de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, estabilizando nas concentrações maiores (Figura 1A). Um comportamento semelhante foi observado para a condutância estomática, sendo que na primeira concentração de arsênio a esta dobrou seu valor, ocorrendo posteriormente um aumento de 60% entre as concentrações de $0,25$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ sendo que a g_s estabilizou após essa concentração (Figura 1B). O comportamento da transpiração foi semelhante ao da g_s que ocorreu um aumento da taxa transpiratória na primeira concentração em relação ao controle de $36,4\%$ e, posteriormente um aumento de $27,7\%$ entre

as concentrações de 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ estabilizando em seguida nas concentrações mais altas (Figura 1C). A relação Ci/Ca demonstrou um comportamento semelhante aos observados para as outras características de trocas gasosas, sendo que ocorreu um aumento de 10,7% na primeira concentração de arsênio em relação ao controle e, posteriormente um aumento de 8,3% entre as concentrações de 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ (Figura 1D).

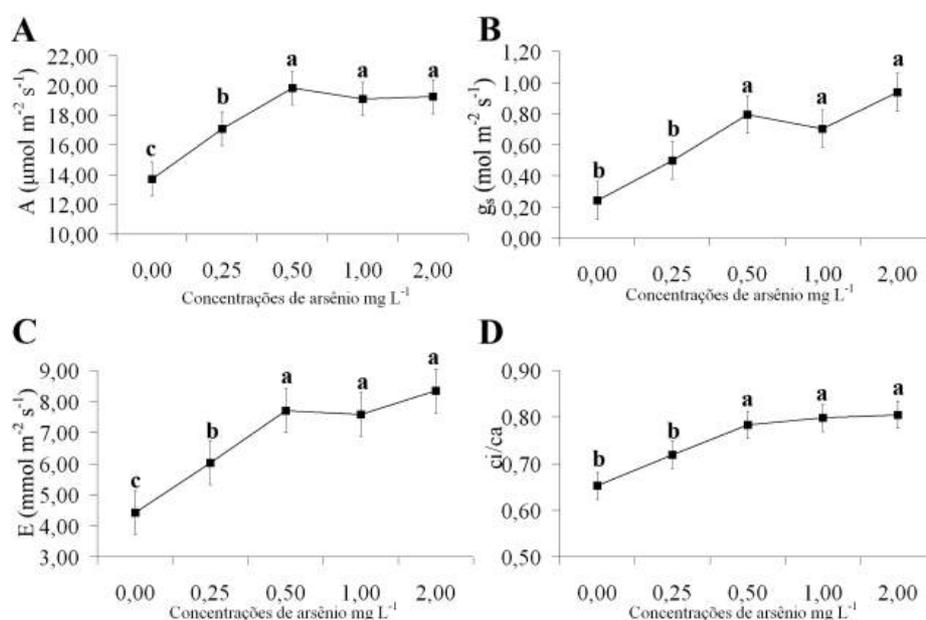


Figura 1 Características de trocas gasosas das plantas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de arsênio. A= fotossíntese, B= condutância estomática, C= transpiração, D= relação Ci/Ca. As barras representam o erro padrão. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott, 5%)

As características anatômicas das plantas de aguapé foram modificadas nas folhas e raízes na presença de arsênio. As folhas possuem epiderme

unisseriada em ambas as faces, cutícula extremamente reduzida, parênquima paliçádico formado por três a quatro camadas de células voltadas para a face adaxial o parênquima esponjoso constituído por grandes câmaras de aerênquima, preenchidas por trabéculas formadas por feixes de células parenquimáticas. Ocorre parênquima nas câmaras onde não há aerênquima, que pode exibir idioblastos e colênquima angular, os feixes vasculares são colaterais, possuem bainha desenvolvida com alguns feixes possuindo o xilema voltado para a face adaxial (para o parênquima paliçádico) e outros voltados para a face abaxial, ocorrem esclereídeos e idioblastos contendo ráfides no parênquima paliçádico e esponjoso, as folhas são anfiestomáticas (Figura 2).

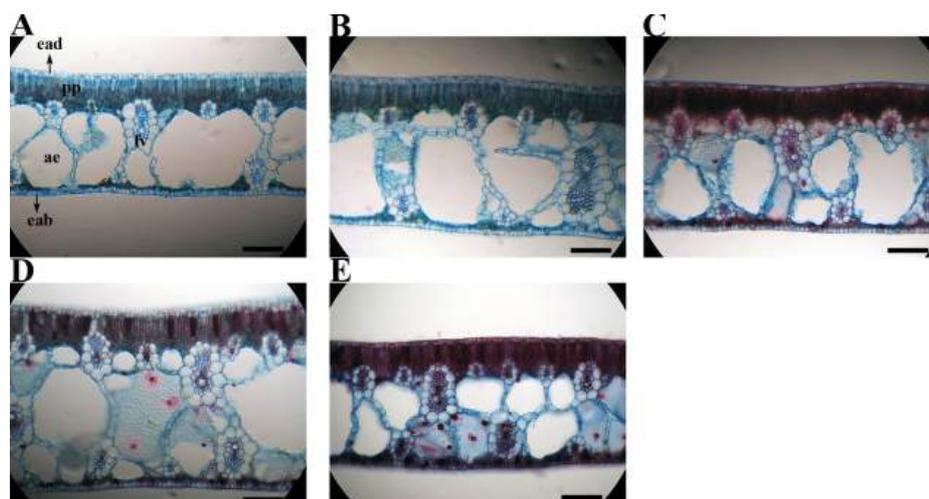


Figura 2 Secções transversais de folhas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de arsênio. ead= epiderme da face adaxial, eab= epiderme da face abaxial, pp= parênquima paliçádico, ae= aerênquima, fv= feixe vascular. A= 0,0; B= 0,25; C= 0,50; D= 1,0 e E= 2,00 mg L⁻¹. barras = 100 μ m

Nas folhas a espessura da epiderme da face abaxial foi aumentada em 23,7% nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg L⁻¹ em comparação ao controle e às concentrações mais altas, contudo, a espessura da epiderme da face adaxial não se modificou nos diferentes tratamentos (Tabela 1). A espessura do mesofilo não demonstrou diferenças significativas na concentração de 0,25 mg L⁻¹, mas, foi modificada, apresentando um aumento de 39,6% a partir da concentração de 0,50 mg L⁻¹ tornando-se mais espesso (Tabela 1 e Figura 2). A espessura do parênquima paliçádico foi modificada a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹ sendo reduzida em 12,0% a partir dessa concentração, enquanto que a espessura do parênquima esponjoso aumentou em média 57,7% nas concentrações de 0,50 e 1,0 mg L⁻¹ reduzindo-se novamente na concentração de 2,0 mg L⁻¹ (Tabela 1). A relação parênquima paliçádico/parênquima esponjoso demonstrou um comportamento uniforme em todas as concentrações de arsênio, sendo reduzida em 40,54% em todos os tratamentos em relação ao controle (Tabela 1). A distância dos feixes se modificou nos tratamentos com arsênio, sendo reduzido em 37,9% a partir nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ (Tabela 1) fato associado a um aumento no número de feixes presentes no mesofilo como pode ser observado na Figura 2. A proporção de aerênquima não se modificou ao longo dos tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 Características dos tecidos foliares em secção transversal de aguapé cultivado em diferentes concentrações de arsênio (mg L^{-1})

As	EAB (μm)	EAD (μm)	MF (μm)	PP (μm)	PE (μm)	PP/P E	DF (μm)	P AE
0,00	08,54 b	10,0 a	242,1 b	63,4 a	178,3 b	0,4 a	90,58 a	0,26 a
0,25	09,60 a	11,2 a	254,6 b	62,9 a	212,1 b	0,3 b	91,54 a	0,28 a
0,50	10,47 a	11,9 a	305,9 a	66,2 a	254,9 a	0,3 b	88,44 a	0,27 a
1,00	09,01 b	11,3 a	337,9 a	61,1 b	281,2 a	0,2 b	64,61 b	0,26 a
2,00	08,46 b	11,4 a	270,7 a	58,3 b	221,3 b	0,3 b	56,77 b	0,21 a

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). EAB= espessura da epiderme da face abaxial, EAD= espessura da epiderme da face adaxial, MF= espessura do mesofilo, PP= espessura do parênquima paliçádico, PE= espessura do parênquima esponjoso, PP/PE= proporção entre parênquima paliçádico e esponjoso, DF= distância entre os feixes vasculares no mesofilo, P AE= proporção de aerênquima na folha (área/área)

Em secção paradérmica, as folhas de aguapé exibiram diferenças significativas nas características estomáticas em ambas as faces da epiderme (Tabela 2). Na face abaxial, o número de estômatos aumentou em 38,7% na concentração de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ em relação ao grupo controle, sendo seguida de um aumento de 16,3% nas concentrações de $0,50$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ em relação à concentração anterior ocorrendo, ainda, um aumento de 12,0% na última concentração em relação à anterior (Tabela 2). O número de células epidérmicas se modificou apenas na concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ sendo que ocorreu um aumento de 33,4% em relação às concentrações menores de arsênio (Tabela 2). As dimensões dos estômatos na face não exibiram diferenças significativas, definidas pelos diâmetros polar e equatorial dos estômatos. A densidade estomática na face abaxial aumentou com as diferentes concentrações de arsênio e o comportamento dessa característica foi semelhante ao observado para o número de estômato. Não ocorreram diferenças significativas na funcionalidade estomática entre os diferentes tratamentos, entretanto, o índice estomático aumentou em 36% em todos os tratamentos contendo arsênio (Tabela 2).

Tabela 2 Características anatômicas de folhas de aguapé em secção paradérmica cultivadas em diferentes concentrações de arsênio

FACE ABAXIAL							
Arsênio (mg L ⁻¹)	NE	NC	POL (µm)	EQU (µm)	DE	FUN	IE (%)
0,00	06,2 d	56,8 b	48,2 a	27,7 a	079,6 d	1,76 a	0,11 b
0,25	08,6 c	61,6 b	42,9 a	25,5 a	110,5 c	1,69 a	0,14 a
0,50	09,8 b	63,8 b	43,9 a	24,2 a	125,9 b	1,82 a	0,15 a
1,00	10,0 b	65,4 b	48,2 a	24,6 a	128,4 b	1,96 a	0,15 a
2,00	11,2 a	75,8 a	42,6 a	22,9 a	143,9 a	1,86 a	0,15 a
FACE ADAXIAL							
Arsênio (mg L ⁻¹)	NE	NC	POL (µm)	EQU (µm)	DE	FUN	IE (%)
0,00	07,8 c	64,6 b	46,3 a	26,3 a	100,2 c	1,77 a	0,12 b
0,25	09,2 b	69,8 b	45,2 a	24,6 a	118,2 b	1,84 a	0,13 b
0,50	09,6 b	69,6 b	45,7 a	25,1 a	123,3 b	1,84 a	0,14 a
1,00	10,8 a	74,2 a	41,4 a	27,9 a	138,7 a	1,50 a	0,15 a
2,00	11,8 a	79,2 a	40,9 a	22,9 a	151,6 a	1,78 a	0,15 a

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). NE= número de estômatos por campo; NC= número de células epidérmicas por campo; POL= diâmetro polar dos estômatos; EQU= diâmetro equatorial dos estômatos; DE= densidade estomática (estômatos por mm²); FUN= funcionalidade estomática (relação POL/EQU); IE= índice estomático

Na face adaxial da folha, o número de estômatos aumentou em 23,1% nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg L⁻¹ em relação ao controle, ocorrendo um aumento de 28,3% nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ em relação às concentrações anteriores (Tabela 2). O número de células epidérmicas se modificou apenas nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ com um aumento de 22,3% em relação às concentrações anteriores (Tabela 2). A densidade estomática aumentou nas maiores concentrações de arsênio em relação às menores, em um padrão semelhante ao observado para o número de estômatos nessa face da epiderme (Tabela 2). A funcionalidade estomática não se modificou nas diferentes concentrações de arsênio em relação ao grupo controle (Tabela 2). Nessa face da epiderme, o índice estomático aumentou em 25,0%

nas concentrações de arsênio de 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ em relação às concentrações menores (Tabela 2).

As raízes de aguapé possuem epiderme unisseriada e exoderme formada por uma camada de células de paredes espessadas (Figura 3). O córtex pode ser dividido em córtex externo, com três camadas de grandes células parenquimáticas alongadas em um dos eixos e com poucos espaços intercelulares. O córtex mediano onde ocorre a presença de câmaras de aerênquima delimitadas por trabéculas de células parenquimáticas alongadas. O córtex interno, composto por seis camadas de células parenquimáticas de paredes finas e isodiamétricas contendo espaços intercelulares maiores que os presentes no córtex externo, podendo ocorrer idioblastos, o córtex termina com a endoderme com pequenas células tendendo ao formato tabular (Figura 3). O cilindro vascular é composto por grandes vasos de metaxilema alternados com floema, uma camada de periciclo, parênquima medular com células isodiamétricas localizadas no centro, alguns menores de metaxilema podem ser associados aos vasos maiores, ou formar novos pólos de metaxilema (Figura 3).

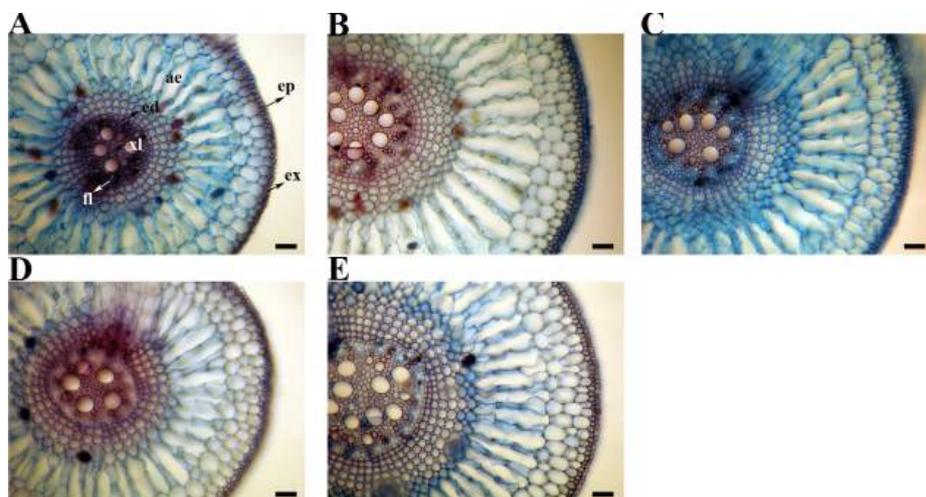


Figura 3 Secções transversais de raízes de plantas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de arsênio. ep= epiderme, ex= exoderme, ae= aerênquima, ed= endoderme, fl= floema, xl= metaxilema. A= 0,0; B= 0,25; C= 0,5; D= 1,0 e E= 2,0 mg L⁻¹. barras = 100 µm

Os tecidos radiculares das plantas de *E. crassipes* foram modificados nas diferentes concentrações de arsênio aplicadas em relação ao controle. A proporção de aerênquima na raiz não se modificou nas diferentes concentrações de arsênio em relação ao controle (Tabela 3). Na concentração de 0,25 mg L⁻¹ de arsênio, não ocorreram modificações no diâmetro das células corticais em relação ao grupo controle, contudo, na concentração de 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de arsênio essa característica aumentou em 34,29% em relação ao grupo controle (Tabela 3). A espessura da epiderme não se modificou nas concentrações de arsênio em relação ao controle (Tabela 3). A espessura da endoderme se tornou mais espessa nos tratamentos contendo arsênio, não diferindo entre as diferentes concentrações, o espessamento correspondeu a um aumento de 21,6% na espessura em relação ao controle (Tabela 3). O IVC foi reduzido em 51% nos tratamentos contendo arsênio em relação ao grupo controle sem diferenças

significativas nas diferentes concentrações (Tabela 2). Associada a essa característica, está o incremento na quantidade de vasos de metaxilema, que aumentou proporcionalmente às crescentes concentrações de arsênio, gerando muitos pólos de metaxilema no cilindro vascular e, vasos múltiplos (Figura 3). Não ocorreram diferenças na espessura da exoderme entre os tratamentos contendo arsênio e o controle (Tabela 3). A espessura do floema não sofreu modificações na concentração de 0,25 mg L⁻¹, contudo, foi aumentado em 34,9% nas concentrações de 0,5, 1,0 3 2,0 mg L⁻¹ de arsênio em relação ao controle (Tabela 3).

Tabela 3 Características anatômicas de raízes de aguapé em secção transversal cultivadas em diferentes concentrações de arsênio

As mg L ⁻¹	PAR	CC (µm)	EP (µm)	ED (µm)	IVC	EX (µm)	FL (µm)
0,00	0,22 a	083,75 b	24,39 a	16,66 b	2,45 b	43,37 a	36,72 b
0,25	0,19 a	092,02 b	24,99 a	18,98 a	1,85 a	38,70 a	36,03 b
0,50	0,17 a	105,55 a	27,40 a	18,97 a	1,66 a	41,84 a	45,00 a
1,00	0,16 a	101,41 a	22,85 a	20,26 a	1,74 a	37,94 a	41,22 a
2,00	0,19 a	112,47 a	26,96 a	19,99 a	1,10 a	40,23 a	44,53 a

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à P<0,05. PAR= proporção de aerênquima no córtex, CC= diâmetro das células corticais, EP= espessura da epiderme, ED= espessura da endoderme, IVC= índice de vulnerabilidade do sistema vascular (índice de vulnerabilidade de Carlquist), EX= espessura da exoderme, FL= espessura do floema

A análise do sistema antioxidante das plantas de *E. crassipes* permite verificar diferenças entre as diferentes concentrações de arsênio e o grupo controle, sendo que essa resposta foi diferente para a folha e raiz (Figura 4). A atividade dessas enzimas do sistema antioxidante é sempre maior nas folhas do que nas raízes dessa espécie nas condições experimentais testadas (Figura 4) independentemente da concentração de arsênio. Para a CAT, observa-se que não

ocorreram diferenças entre os tratamentos em relação à atividade da enzima nas raízes de aguapé (Figura 4A). Entretanto, nas folhas observa-se um aumento da atividade dessa enzima nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ (Figura 4A). Observa-se que, nas raízes a atividade da APX aumenta na concentração de 2,0 mg L⁻¹. Nas folhas, a atividade da APX aumenta em todos os tratamentos contendo As em relação ao controle, sem diferenças significativas para as diferentes concentrações de arsênio (Figura 4B). A atividade da SOD demonstrou comportamentos diferenciados nas raízes e nas folhas. Nas raízes a atividade permaneceu inalterada entre as concentrações de 0,0 até 0,5 mg L⁻¹, sendo que nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ ocorreu um aumento linear da atividade dessa enzima (Figura 4C). Nas folhas, a atividade da SOD aumenta já na concentração de 0,25 mg L⁻¹ permanecendo sem diferenças significativas nas concentrações maiores (Figura 4C).

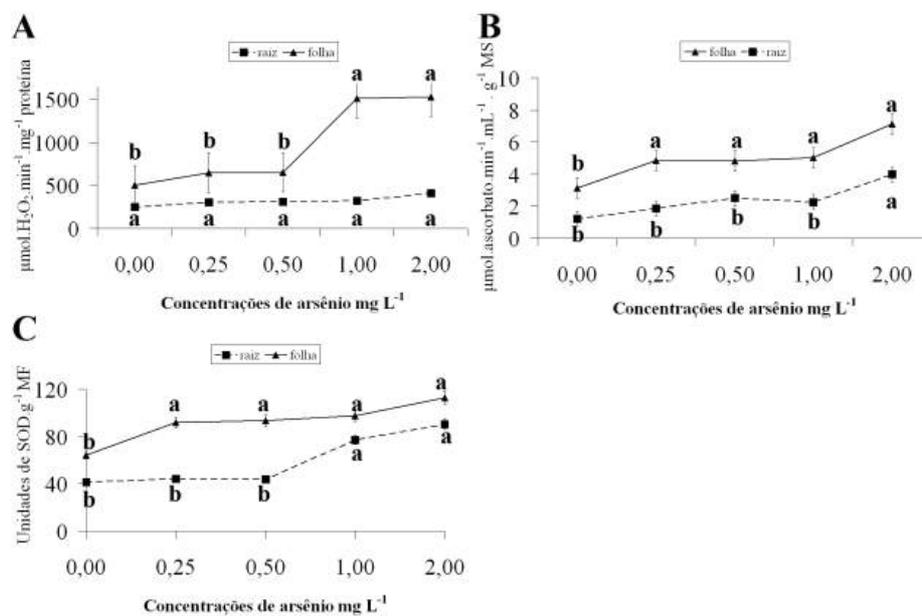


Figura 4 Atividade das enzimas do sistema antioxidante de plantas de aguapé cultivado em diferentes concentrações de arsênio. A= atividade da catalase, B= atividade da peroxidase do ascorbato, C= atividade da dismutase do íon superóxido. As barras indicam o erro padrão. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott, 5%)

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a taxa fotossintética na presença de arsênio são diferentes dos relatados na literatura para outras espécies de plantas. Giddings e Eddlemon (1978) verificaram que baixas concentrações de arsênio não afetavam a fotossíntese de várias espécies de algas microscópicas, entretanto altas concentrações promoviam a redução na taxa fotossintética desses microrganismos. Altas concentrações de arsênio também promoveram reduções

na taxa fotossintética de plantas de feijão (MITEVA; MERAKCHYISKA, 2002), e aveia (STOEVA; BINEVA, 2003).

No presente trabalho, as plantas de aguapé, contudo, não demonstraram sofrer inibições na taxa fotossintética nas concentrações testadas, mesmo sendo essas concentrações até 800 vezes superiores à máxima regulamentada pelo CONAMA, exibindo um aumento na taxa fotossintética em todas as concentrações em relação ao controle. Stoeva e Bineva (2003), verificaram que concentrações de arsênio podem levar à geração de espécies reativas de oxigênio e ao estresse oxidativo, que podem prejudicar as membranas dos cloroplastos. As plantas de *E. crassipes* podem ter resistido a esse efeito com a ativação do sistema antioxidante nas folhas, com todas as enzimas avaliadas tendo a sua atividade aumentada (Figura 4). Dessa forma, a fase fotoquímica da fotossíntese pode não ter sofrido inibições, permitindo às plantas de *E. crassipes* tolerar as condições desse experimento sem inibições na taxa fotossintética.

A fotossíntese pode ser estimulada em condições de maior disponibilidade de CO₂ e de luz (ZHOU; HAN, 2005), dessa forma, como as condições de radiação foram padronizadas, o aumento na taxa fotossintética pode estar relacionado à maior disponibilidade de CO₂ na folha. Esse resultado pode ser confirmado pelo aumento na g_s na relação C_i/C_a e na E que foi observada nessas plantas (Figura 1). Esses parâmetros permitem verificar que ocorreu um favorecimento ao fluxo de CO₂ para o interior das folhas, pois o aumento na relação C_i/C_a pode indicar uma maior quantidade de carbono na folha em razão da redução da resistência estomática (ZHOU; HAN, 2005). Esses fatos estão associados com modificações na anatomia foliar que permitiram uma maior captação de CO₂, como o aumento da densidade estomática e do índice estomático em todos os tratamentos contendo arsênio (Tabela 2). Uma maior densidade estomática pode ser observada em alguns tipos de estresse ambiental como relatam Grisi et al. (2008) para plantas de café sob estresse hídrico, e

como relatado por Costa et al. (2009). Uma maior densidade estomática pode ser associada como uma adaptação ao estresse por permitir um maior fluxo de CO₂ em um tempo menor. Esse aumento na densidade estomática e, no índice estomático, que permite verificar uma maior diferenciação das células epidérmicas em estômatos, pode ter atribuído a um maior fluxo de CO₂ para o interior da folha.

Esses fatos são apoiados pelo espessamento do mesofilo observado e com as modificações na espessura do mesofilo, no parênquima paliçádico e parênquima esponjoso, a redução observada na relação parênquima paliçádico/parênquima esponjoso (Tabela 1). Esses fatos permitem observar que houve uma maior formação de espaços na folha destinados a armazenar o CO₂, pois essa é uma das principais funções do parênquima esponjoso (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Com isso, a planta pode promover um maior fluxo desse gás para o interior da folha e, a retenção do mesmo no interior foliar. Assim, o aumento em espessura do mesofilo pode ser atribuído principalmente ao aumento do parênquima esponjoso, e, com isso no investimento em espaços para o CO₂, uma vez que a proporção de aerênquima foliar também não se alterou, o que permite às folhas uma retenção de gases proporcional ao aumento em espessura. O aumento da espessura do mesofilo, parênquima paliçádico e esponjoso é relatado na literatura em diferentes tipos de estresse (GRISI et al., 2008; COSTA et al., 2009). Dessa forma, o aumento na taxa fotossintética observado pode ser atribuído, em parte, à adaptações para o favorecimento do fluxo de CO₂ para o interior da folha em *E. crassipes* sob as concentrações de arsênio estudadas.

O aumento da transpiração pode não ser prejudicial à essa planta, por ser uma macrófita aquática, sem restrições hídricas. Dessa forma, também não ocorreram mudanças na espessura da epiderme da face adaxial, que pode ser uma barreira à transpiração (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Contudo, o

espessamento da epiderme da face abaxial nas concentrações menores de arsênio (Tabela 1) pode ter contribuído, em parte, para o espessamento do mesofilo. Os valores do diâmetro polar e equatorial dos estômatos e, conseqüentemente na funcionalidade estomática podem indicar um parâmetro interessante para a tolerância dessa espécie ao arsênio. Esse resultado indica que não ocorreram modificações no tamanho dos estômatos, bem como os mesmos mantiveram a sua funcionalidade, permitindo um fluxo adequado de CO₂ da atmosfera para a folha. Em condições de estresse, podem ocorrer mudanças nas dimensões e na funcionalidade dos estômatos, como ocorreu em plantas de café sob estresse hídrico (GRISI et al., 2008).

A proporção de aerênquima na raiz é uma característica que é essencial para as plantas que estão sob alagamento ou em ambiente aquático, podendo, até mesmo aumentar em condições de alagamento como observado em plantas de milho (PEREIRA et al., 2008; SOUZA et al., 2009). Dessa forma, o aerênquima é essencial para a sobrevivência de *E. crassipes* e, a proporção de aerênquima na raiz não ter sido alterada pelas concentrações de arsênio demonstra outra característica que contribui para a tolerância dessa espécie ao arsênio, fato também percebido no aumento do diâmetro das células corticais formando mais tecido cortical. A espessura da epiderme radicular não ter se alterado nas diferentes concentrações de arsênio pode ser uma característica relacionada com a tolerância de *E. crassipes* a esse elemento, pois a epiderme pode funcionar como uma barreira apoplástica (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009) ao fluxo da solução. Contudo, o espessamento da endoderme pode ser um fator interessante para a tolerância de *E. crassipes* pois a endoderme funciona como uma barreira contra o fluxo de elementos tóxicos da raiz para a parte aérea (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009) e pode se espessar em condições de estresse (PEREIRA et al., 2008). Dessa forma, as plantas de *E. crassipes* podem

ter manifestado tolerância ao arsênio por ter bloqueado em parte o fluxo desse elemento para a parte aérea com o espessamento da endoderme.

O IVC permite inferir sobre a vulnerabilidade do xilema à embolias, sendo que quanto menor o IVC maior a condutividade hidráulica da planta (CARLQUIST, 1975; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009) e pode ser influenciado por estresses ambientais como o alagamento (PEREIRA et al., 2008). O Floema é diretamente relacionado com o fluxo de fotoassimilados das folhas para os drenos (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009), sendo que as plantas de aguapé podem ter desenvolvido uma maior espessura do floema como uma resposta de tolerância ao estresse. Essa resposta de tolerância pode estimular a reprodução vegetativa, aumentando a densidade populacional e melhorando as chances de sobrevivência da população no ambiente contendo metais pesados. Portanto, o aumento na espessura do floema e a redução no IVC, associado a uma maior produtividade das plantas permite a formação de novas plantas filhas, em resposta ao estresse, por permitir um maior fluxo de nutrientes para a parte aérea e translocação de fotoassimilados para as raízes e plantas filhas.

Um fator importante nos mecanismos de tolerância do aguapé ao arsênio foi a ativação do sistema antioxidante na presença desse elemento, por permitir que as espécies reativas de oxigênio geradas fossem removidas pelas enzimas. Esse fato está de acordo com os resultados obtidos por Odjegba e Fasidi (2007), que verificaram o aumento na atividade da CAT, peroxidase do guaiacol e SOD proporcionais aos aumentos nas concentrações de diferentes metais pesados. A análise das respostas das enzimas avaliadas permite verificar que a atividade dessas nas folhas respondeu à concentrações menores em comparação com as raízes, e, a atividade nas folhas sempre foi maior que nas raízes. Dessa forma, pode-se perceber a importância desse sistema na manutenção da fotossíntese e dos tecidos da parte aérea da planta, sendo um fator imprescindível para a

tolerância da espécie ao arsênio, comprovando o potencial para a fitorremediação dessa espécie como estudado por Faisal e Hasnain (2003), Snyder (2006) e Gonçalves Júnior et al. (2008).

Sendo o arsênio um elemento extremamente tóxico para seres humanos (GOSH et al., 2006) e a necessidade de tecnologias novas para a remoção desse elemento do ambiente (DHANKHER et al., 2002; GRATÃO et al., 2005), pode-se verificar que a espécie *E. crassipes* possui potencial altíssimo para a fitorremediação de arsênio, exibindo mecanismos de tolerância e potencial para alta produtividade nessas condições, permitindo a sua utilização em sistemas de fitorremediação em sistemas aquáticos.

5 CONCLUSÃO

As plantas de aguapé exibiram um aumento na fotossíntese associado a uma maior captação de CO₂ na presença de arsênio em relação ao controle. As características anatômicas foliares foram modificadas com um aumento na densidade estomática e no parênquima esponjoso, permitindo uma maior captação e retenção de CO₂ foliar. A anatomia radicular de *E. crassipes* demonstrou características de tolerância ao arsênio, não modificando o aerênquima, melhorando as características do sistema vascular e aumentando a endoderme. O sistema antioxidante de *E. crassipes* foi ativado na presença de arsênio demonstrando um aumento na atividade das enzimas em relação ao controle.

REFERÊNCIAS

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.

CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. Berkeley: University of California, 1975. 259 p.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

COSTA, F. H. S. et al. Anatomical and physiological modifications of micropropagated 'Caipira' banana plants under natural light. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 323-330, Jun. 2009.

DHANKHER, O. P. et al. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, n. 11, p. 1140-1145, Nov. 2002.

FAISAL, M.; HASNAIN, S. Synergistic removal of Cr (VI) by *Eichhornia crassipes* in conjunction with bacterial strains. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 6, n. 3, p. 264-268, Feb. 2003.

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

GIDDINGS, J.; EDDLEMON, G. K. Photosynthesis / respiration ratios in aquatic microcosms under arsenic stress. **Water, Air and Soil Pollution**, New York, v. 9, n. 2, p. 207-212, Feb. 1978.

GONÇALVES JÚNIOR, A. C. et al. Remoção de metais pesados tóxicos cádmio, chumbo e cromo em biofertilizante suíno utilizando macrófita aquática (*Eichhornia crassipes*) como bioindicador. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 9-14, jan. 2008.

GOSH, P. et al. Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. **International Journal of Cancer**, Malden, v. 118, n. 10, p. 2470-2478, Nov. 2006.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 53-64, Jan./Mar. 2005.

GRISI, F. A. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café ‘Catuaí’ e ‘Siriema’ submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, nov. 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 300 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 221 p.

MADHUSUDHAN, R. et al. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, n. 4, p. 550-557. Apr. 2003

MAHMOOD, Q. et al. Anatomical studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) under the influence of textile wastewater. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 6, n. 10, p. 991-998, Oct. 2005.

MITEVA, E.; MERAKCHYISKA, M. Response of chloroplasts and photosynthetic mechanism of bean plants to excess arsenic in soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Sciences**, Sofia, v. 8, n. 2, p. 151-156, Feb. 2002.

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.

ODJEGBA, V. J.; FASIDI, I. O. Changes in antioxidant enzyme activities in *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae) under heavy metal stress. **International Journal of Tropical Biology**, San José, v. 55, n. 3, p. 815-823, Sept./Dec. 2007.

PEREIRA, F. J. et al. 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.

SNYDER, K. V. W. Removal of arsenic from drinking water by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). **Journal of United States Stockholm Junior Water Prize**, Stockholm, v. 1, n. 1, p. 41-58, Jan. 2006.

SOUZA, T. C. et al. Morpho-anatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil and Environment**, Czeck, v. 55, n. 11, p. 504-510, Nov. 2009.

STOEVA, N.; BINEVA, T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Sciences**, Sofia, v. 29, n. 1, p. 87-95, Jan. 2003.

WOLFF, G. et al. 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./mar. 2009.

ZHOU, Y. M.; HAN, S. J. Photosynthetic response and stomatal behaviour of *Pinus koraiensis* during the fourth year of exposure to elevated CO₂ concentration. **Photosynthetica**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 445-449, Sept. 2005.

ARTIGO 2: TOLERÂNCIA AO CÁDMIO POR PLANTAS DE AGUAPÉ DEFINIDA POR CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS

RESUMO

Uma crescente preocupação sobre metais pesados como poluentes nos corpos d'água se espalha por todo o mundo, e o cádmio é um dos mais tóxicos elementos eliminados no ambiente. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o mecanismo de tolerância de plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*) ao cádmio por meio de adaptações anatômicas e fisiológicas. As plantas foram cultivadas em solução de Hoagland em casa de vegetação sob cinco concentrações de cádmio: 0,00; 0,40; 0,80; 1,60 e 3,20 mg L⁻¹. Foram avaliadas a fotossíntese, a condutividade estomática, a transpiração a relação Ci/Ca, as enzimas do sistema antioxidante e as características anatômicas nas raízes e folhas das plantas. As plantas demonstraram um aumento na fotossíntese, na condutividade estomática, na transpiração e na relação Ci/Ca em todos os tratamentos contendo cádmio em relação ao controle. Todas as enzimas do sistema antioxidante tiveram sua atividade aumentada nas raízes e folhas nos tratamentos contendo cádmio. Como adaptações anatômicas, as plantas demonstraram um aumento na densidade estomática e na espessura do parênquima esponjoso relacionados com a disponibilização de CO₂ na folha, e com o aumento na taxa fotossintética. As características anatômicas das raízes não demonstraram evidência de toxidez e, uma melhoria nas características do sistema vascular. Dessa forma, *Eichhornia crassipes* demonstrou um mecanismo de tolerância ao Cd, relacionado com adaptações anatômicas e fisiológicas.

Palavras chave: *Eichhornia crassipes*. Fitorremediação. Sistema antioxidante. Anatomia ecológica. Ecofisiologia.

ABSTRACT

A growing concern about the heavy metals pollutants on water are spreading worldwide and cadmium is one of most toxic elements eliminated to environment. In that context, this work aimed to evaluate the tolerance mechanism of *Eichhornia crassipes* to cadmium, by anatomical and physiological adaptations. Plants were grown on Hoagland nutrient solution in greenhouse, under five cadmium levels: 0.0; 0.4; 0.8; 1.6 and 3.2 mg L⁻¹. Photosynthesis, stomatal conductance, transpiration, Ci/Ca rate, antioxidant system enzymes and anatomical traits were evaluated in roots and leaves of the plants. Plants exhibited an increase in the photosynthesis, stomatal conductance, transpiration and Ci/Ca rate under all cadmium treatments against the control. All enzymes of antioxidant system were increased in its activity on cadmium treatments in roots and leaves. The anatomical adaptations showed an increase in stomatal density and spongy parenchyma values related to the CO₂ disponibilization on leaf, and increased photosynthetic rate. The anatomical traits of roots exhibited no evidence of toxic effects and an increase on the vascular system traits. So, *Eichhornia crassipes* exhibited a tolerance mechanism to Cd related to anatomical and physiological adaptations.

Keywords: *Eichhornia crassipes*. Phytoremediation. Antioxidant system. Ecological anatomy. Ecophysiology.

1 INTRODUÇÃO

A recente atividade humana com a industrialização, mineração e práticas agrícolas levou a uma grande produção e acúmulo de elementos tóxicos no solo, nas cadeias tróficas e em ambientes aquáticos (GRATÃO et al., 2005). O cádmio (Cd) é um elemento tóxico que pode influenciar negativamente o crescimento e desenvolvimento de plantas sendo liberado no ambiente por atividades como utilização de estações de energia, sistemas de aquecimento, indústria metalúrgica e tráfico de veículos (BENAVIDES; GALLEGOS; TOMARO, 2005). A fitorremediação é um processo limpo que pode ser utilizado para a remoção de elementos tóxicos do solo e da água (GRATÃO et al., 2005). A fitorremediação do Cd tem sido alvo de recentes estudos por ser esse um processo mais barato e limpo, contudo, em alguns estudos o Cd demonstra alta toxicidade, dificultando a identificação de espécies hiperacumuladoras desse elemento (MANGKOEDHARDJO, 2008).

Espécies de macrófitas nativas são utilizadas para a fitorremediação de águas contaminadas. Nesse contexto, o aguapé (*Eichhornia crassipes*) é uma macrófita nativa do Brasil pertencente à família Pontederiaceae, com potencial para a utilização em sistemas de fitorremediação. Essa espécie demonstrou potencial para a fitorremediação do cromo que foi acumulado em altas concentrações (FAISAL; HASNAIN, 2003). O potencial de hiperacumulação de Cd em *E. crassipes* foi estudado por Oliveira et al. (2001). Os autores verificaram uma grande capacidade dessa espécie para acumular Cd, sendo que a acumulação foi proporcional ao tempo de exposição e à concentração do elemento sendo mais acumulados nas raízes. A espécie ainda apresentou grande potencial para a acumulação do Zn e Cu, sendo capaz de remover esses metais de solução proveniente de biofertilizantes (MONDARDO; GONÇALVES JÚNIOR; SACON, 2006).

A espécie foi capaz de hiperacumular arsênio (SNYDER, 2006; DHANKHER et al., 2002), e chumbo (GONÇALVES JÚNIOR et al., 2008). O Cd promove mudanças nas características fisiológicas das plantas crescendo sob influência desse elemento. Schüzendübel et al. (2001) verificaram que concentrações de Cd de 50 μM promoveram estímulo da superóxido dismutase, em detrimento da catalase e peroxidases, promovendo um acúmulo de H_2O_2 nas células de *Pinus sylvestris*, que sofreram necrose. Pietrini et al. (2003), verificaram inibições de 30% no conteúdo de clorofila, na fotossíntese e na atividade da rubisco, além de um estímulo na atividade do sistema antioxidante que permitiu manter a estrutura dos cloroplastos nas concentrações avaliadas, protegendo o sistema fotossintético em plantas de *Phragmites australis*. O sistema antioxidante das plantas de *E. crassipes* foi estimulado pelo aumento na atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e peroxidase do guaiacol na presença de cádmio proporcionalmente à concentração desse metal (ODJEGBA; FASIDI, 2007).

A anatomia de *E. crassipes* demonstrou plasticidade sob a presença de efluentes de indústria têxtil, promovendo a redução do tamanho das células dos tecidos foliares (MAHMOOD et al., 2005). O Cd demonstrou capacidade de influenciar na anatomia foliar de *Alternanthera philoxeroides* e *Polygonum ferrugineum* reduzindo a quantidade de aerênquima, de drusas, redução na espessura do mesofilo e aumento de tricomas glandulares, contudo, sem prejudicar a fotossíntese dessas espécies (SOUZA, Vânia et al., 2009).

Em vista dos possíveis efeitos do Cd nas características anatômicas e fisiológicas das plantas com potencial para a fitorremediação, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito desse elemento nessas características no intuito de elucidar os mecanismos de tolerância de *E. crassipes*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes* Mart.) foi realizada em um conjunto de açudes na região de Alfenas-MG, formados a partir de uma nascente localizada à cerca de 60 m do local e, aparentemente livres de fontes de contaminação por cádmio. As plantas coletadas foram lavadas em água corrente e cultivadas em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras em solução de Hoagland a 40% da força iônica durante um período de 30 dias, para obtenção de gerações clonais aclimatizadas à casa de vegetação e isentas de cádmio endógeno.

As plantas foram selecionadas quanto ao número de folhas, ausência de estolões, plantas filhas e tamanho para a obtenção de unidades experimentais uniformes. Foram utilizados vasos de polipropileno com capacidade para 6 L, contendo 4 L de solução nutritiva de Hoagland à 20% da força iônica acrescida de concentrações crescentes de cádmio sendo: 0; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg L⁻¹ para o cultivo das plantas sob os tratamentos. As concentrações de cádmio aplicadas foram baseadas na concentração máxima permitida pela Res. 357 do CONAMA (WOLFF et al., 2009), correspondendo ao controle (concentração 0 mg L⁻¹) e 100, 200, 400 e 800 vezes a concentração máxima permitida, respectivamente, à partir da concentração de 0,4 mg L⁻¹. As plantas permaneceram nessas condições por um período de 20 dias.

Após um período de 15 dias, as características de trocas gasosas das plantas foram avaliadas com analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LI-6400. Foram avaliadas a condutância estomática (g_s), a taxa transpiratória (E), a taxa fotossintética (A), e a relação entre carbono interno e externo (C_i/C_a). Para a avaliação dessas variáveis, foram selecionadas folhas completamente expandidas em cinco plantas por tratamento, a partir 10:00

horas, sendo que a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada na câmara do aparelho para $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As análises anatômicas foram realizadas nas plantas filhas cultivadas ao longo do período experimental, ao final dos 20 dias, com folhas e raízes completamente desenvolvidas. As plantas filhas foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e etanol 70% (F.A.A.70) por um período de 72 horas, posteriormente sendo armazenadas em etanol 70% até a data das análises (KRAUS; ARDUIN, 1997). As secções paradérmicas foliares foram realizadas utilizando-se de lâminas de aço nas faces abaxial e adaxial. Posteriormente os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio 50%, lavados em água destilada duas vezes por 10 minutos, coradas com solução de safranina 1% e montadas em lâmina e lamínula com glicerina 50% (JOHANSEN, 1940). Fragmentos de 2 cm das folhas retirados da região contendo a nervura central e da região de ramificação à 2 cm do ápice das raízes foram utilizadas para a realização de secções transversais com auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC. Os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio, lavados em água destilada duas vezes por 10 minutos, corados com solução safrablau (safranina 1% e azul de astra 0,1% na proporção de 7:3) e montados em lamina e lamínula em glicerina 50%. As lâminas foram fotografadas em microscópio Olympus modelo BX 60 acoplado à câmera digital Canon A630.

Para a análise das fotomicrografias, foi utilizado o software para análise de imagens UTHSCSA-Imagetool sendo medidas: EAB= espessura da epiderme da face abaxial, EAD= espessura da epiderme da face adaxial, MF= espessura do mesofilo, PP= espessura do parênquima paliçádico, PE= espessura do parênquima esponjoso, PP/PE= proporção entre parênquima paliçádico e esponjoso, DF= distância entre os feixes vasculares no mesofilo, CB= diâmetro das células da bainha do feixe, PAE= proporção de aerênquima na folha (área/área), NE= número de estômatos por campo; NC= número de células

epidérmicas por campo; POL= diâmetro polar dos estômatos; EQU= diâmetro equatorial dos estômatos; DE= densidade estomática (estômatos por mm²); FUN= funcionalidade estomática (relação POL/EQU); IE= índice estomático, PAR= proporção de aerênquima no córtex, CC= diâmetro das células corticais, EP= espessura da epiderme, ED= espessura da endoderme, IVC= índice de vulnerabilidade do sistema vascular (índice de vulnerabilidade de Carlquist), PM= diâmetro das células do parênquima medular, EX= espessura da exoderme, FL= espessura do floema. O IVC foi calculado segundo Carlquist (1975), as proporções de área de aerênquima na raiz segundo Pereira et al. (2008) a DE e o IE foram calculados segundo Castro, Pereira e Paiva (2009).

Foram coletadas amostras de folhas e raízes destinadas às análises bioquímicas aos 20 dias de experimento, no período da manhã, sendo congeladas em nitrogênio líquido e preservadas em freezer à -80 °C até a data das análises. Foi realizada extração protéica para a obtenção das enzimas, sendo pesados 0,5 g de raízes ou folhas adicionando-se 2,0 mL de tampão de extração constituído de 1,924 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7, 20 µL de EDTA 0,1 M, 8 µL de DTT 0,5 M, 16 µL de PMSF 0,1 M e 40 mg de PVPP adaptado de Bor, Özdemir e Türkan (2003). Após homogeneização, o extrato enzimático foi centrifugado a 14000 g, por 20 minutos, na temperatura de 4°C. Após esse período foi coletado o sobrenadante, com o qual foram realizadas as determinações das atividades das enzimas: peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e dismutase do superóxido (SOD).

A análise da atividade da SOD foi realizada segundo o método proposto por Giannopolitis e Ries (1977). Foi avaliada a atividade da peroxidase do ascorbato (APX) com a adição de 160 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7 sendo adicionado 100 µL de ácido ascórbico 0,005 M, 100 µL de H₂O₂ 0,005 M, 605 µL de água destilada e 35 µL do extrato enzimático adaptado de Nakano e Asada (1981). A atividade enzimática foi determinada pelo

acompanhamento da queda da absorbância, a 290 nm, por 2 minutos e calculada com base no fator de extinção de $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para a avaliação da atividade da catalase (CAT) adicionou-se em 35 μL do extrato enzimático, 160 μL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7, sendo ainda adicionados 125 μL de H_2O_2 0,01 M dissolvida no tampão e 680 μL de água destilada adaptado de Madhusudhan et al. (2003). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância, a 240 nm, por 1 minuto e calculada com base no fator de extinção de $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

O delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições, os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott para $P < 0,05$ ou análise de regressão com auxílio do software estatístico Sisvar.

3 RESULTADOS

Ao longo das diferentes concentrações de Cd aplicadas, ocorreram modificações nas características de trocas gasosas das plantas de aguapé (Figura 1). Não ocorreram diferenças significativas na fotossintética na presença de Cd em relação ao controle (Figura 1A). A g_s aumentou em 69,42% nas concentrações de 0,80 e 1,6 mg L^{-1} sendo reduzida novamente na concentração de 3,2 mg L^{-1} (Figura 1B). A taxa transpiratória aumentou em 14,86% nas concentrações de 0,8; 1,6 e 3,2 mg L^{-1} (Figura 1C). A relação C_i/C_a não demonstrou modificações significativas na presença de Cd (Figura 1D).

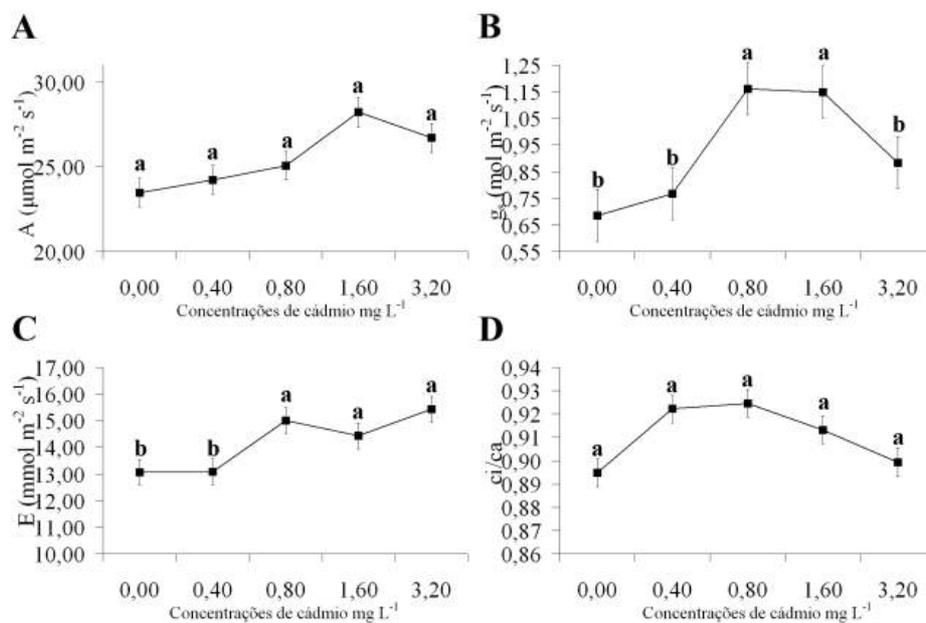


Figura 1 Características de trocas gasosas das plantas do aguapé cultivadas em diferentes concentrações de cádmio. A= taxa fotossintética, B= condutância estomática, C= taxa transpiratória, D= relação Ci/Ca. As barras representam o erro padrão. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott, 5%)

As folhas de *E. crassipes* possuem epiderme unisseriada em ambas as faces, apresentando cutícula reduzida. O parênquima paliçádico é formado por três a quatro camadas de células voltadas para a face adaxial. O parênquima esponjoso é constituído por grandes câmaras de aerênquima, preenchidas por trabéculas formadas por feixes de células parenquimáticas, ocorre parênquima em algumas das câmaras, que pode exibir idioblastos e colênquima angular. Os feixes vasculares são colaterais, possuem bainha desenvolvida com alguns feixes exibindo o xilema voltado para a face adaxial (para o parênquima paliçádico) e outros voltados para a face abaxial. Ocorrem esclereídeos e idioblastos contendo

ráfides no parênquima paliçádico e esponjoso, as folhas são anfiestomáticas (Figura 2).

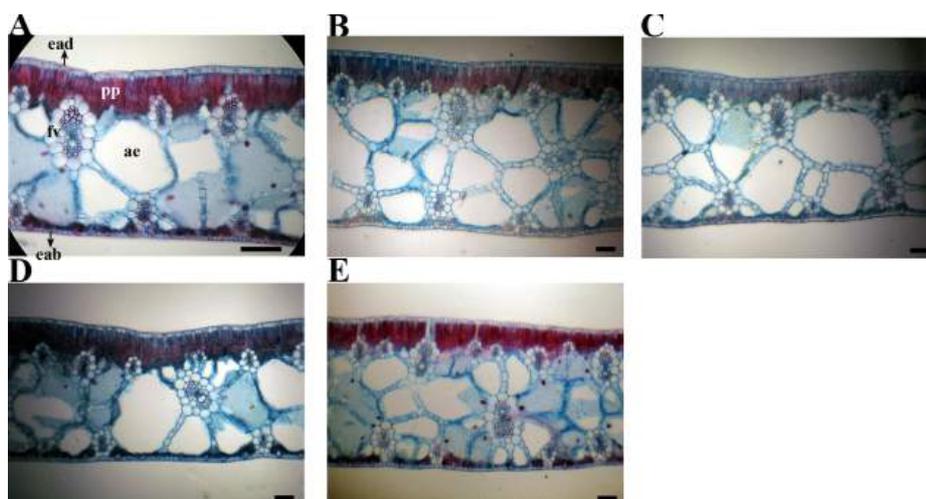


Figura 2 Secções transversais de folhas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de Cádmio. ead= epiderme da face adaxial, eab= epiderme da face abaxial, pp= parênquima paliçádico, ae= aerênquima, fv= feixe vascular. A= 0,0; B= 0,4; C= 0,8; D= 1,6 e E= 3,2 mg L⁻¹. barras = 100 μm

Ocorreram modificações nas características anatômicas das folhas de *E. crassipes* nos diferentes tratamentos, espessando todos os tecidos em relação ao controle (Figura 2). A epiderme da face abaxial foi espessada em 99,57% ainda na primeira concentração 0,40 mg L⁻¹ de Cd na solução, aumentando ainda 12,17% na concentração de 1,6 mg L⁻¹, caindo novamente na concentração de 3,2 mg L⁻¹ (Tabela 1). A espessura da epiderme da face adaxial aumentou em todos os tratamentos contendo Cd, sendo que esse aumento foi de até 124%, não se modificando significativamente entre as concentrações de Cd, mas permanecendo maiores que os valores exibidos pelo grupo controle (Tabela 1).

A espessura do mesofilo aumentou em 154,65% nos tratamentos contendo Cd em relação ao controle, não se modificando entre das diferentes concentrações desse elemento (Tabela 1 e Figura 2). A espessura do parênquima paliçádico espessou em 138,20% nas concentrações de 0,40 e 0,80 mg L⁻¹ aumentando ainda 26,59% na concentração de 1,6 mg L⁻¹ caindo novamente na concentração de 3,2 mg L⁻¹. A espessura do parênquima esponjoso aumentou em 168,98% em todos os tratamentos contendo Cd, não diferindo entre as diferentes concentrações (Tabela 1). A relação parênquima paliçádico/parênquima esponjoso não se modificou entre os diferentes tratamentos (Tabela 1). A distância entre os feixes vasculares aumentou em 53,60% nas concentrações de 0,80 e 1,6 mg L⁻¹ de Cd, caindo novamente na concentração de 3,2 mg L⁻¹. A proporção de aerênquima na folha não se modificou nos tratamentos contendo Cd em relação ao controle, ou entre as diferentes concentrações (Tabela 1).

Tabela 1 Características dos tecidos foliares em secção transversal do aguapé cultivado em diferentes concentrações de cádmio (mg L⁻¹)

Cd	EAB (μm)	EAD (μm)	MF (μm)	PP (μm)	PE (μm)	PP/ PE	DF (μm)	PAE
0,00	09,4c	13,1b	320,4b	062,9c	260,3b	0,2a	104,0b	0,3a
0,40	18,7b	24,5a	815,8a	149,8b	700,2a	0,2a	118,9b	0,3a
0,80	18,9b	25,5a	761,1a	142,9b	618,3a	0,2a	151,4a	0,3a
1,60	21,0a	27,0a	752,5a	181,0a	591,6a	0,3a	159,8a	0,2a
3,20	16,8b	29,3a	784,7a	141,6b	660,9a	0,2a	124,4b	0,2a

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). EAB= espessura da epiderme da face abaxial, EAD= espessura da epiderme da face adaxial, MF= espessura do mesofilo, PP= espessura do parênquima paliçádico, PE= espessura do parênquima esponjoso, PP/PE= proporção entre parênquima paliçádico e esponjoso, DF= distância entre os feixes vasculares no mesofilo, PAE= proporção de aerênquima na folha (área/área)

Em secção paradérmica, ocorreram modificações nas características estomáticas de *E. crassipes* apenas na face abaxial, levando a aumentos na densidade estomática. Esse aumento correspondeu a 14,29% a partir da concentração de 0,80 mg L⁻¹ não se alterando nas concentrações maiores (Tabela 1). O Cd não modificou as dimensões dos estômatos na face abaxial como pode ser observado pelos valores do diâmetro polar e equatorial (Tabela 2), não ocorreram modificações na funcionalidade estomática e nem no índice estomático nessa face da folha. Na Face adaxial, não ocorreram modificações significativas nas características estomáticas de *E. crassipes* (Tabela 2).

Tabela 2 Características anatômicas de folhas do aguapé em secção paradérmica cultivadas em diferentes concentrações de cádmio

Cádmio mg L ⁻¹	FACE ABAXIAL						
	NE	NC	POL (µm)	EQU (µm)	DE	FUN	IE (%)
0,00	8,40 b	63,2 b	43,7 a	21,2 a	107,9 b	2,06 a	0,13 a
0,40	8,40 b	61,4 b	47,9 a	23,5 a	107,9 b	2,04 a	0,14 a
0,80	9,40 a	61,2 b	48,4 a	20,7 a	120,7 a	2,36 a	0,15 a
1,60	9,00 a	63,4 b	52,9 a	23,9 a	115,6 a	2,21 a	0,14 a
3,20	9,60 a	69,2 a	46,9 a	25,9 a	123,3 a	1,87 a	0,14 a
Cádmio mg L ⁻¹	FACE ADAXIAL						
	NE	NC	POL (µm)	EQU (µm)	DE	FUN	IE (%)
0,00	08,20 a	65,0 a	46,3 a	24,8 a	105,3 a	1,87 a	0,13 a
0,40	08,60 a	61,4 a	46,3 a	27,0 a	110,5 a	1,72 a	0,14 a
0,80	09,40 a	64,4 a	46,6 a	23,7 a	120,8 a	1,97 a	0,15 a
1,60	09,80 a	66,0 a	42,3 a	23,6 a	125,9 a	1,79 a	0,15 a
3,20	10,60 a	67,4 a	46,1 a	25,4 a	136,2 a	1,82 a	0,16 a

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). NE= número de estômatos por campo; NC= número de células epidérmicas por campo; POL= diâmetro polar dos estômatos; EQU= diâmetro equatorial dos estômatos; DE= densidade estomática (estômatos por mm²); FUN= funcionalidade estomática (relação POL/EQU); IE= índice estomático

A estrutura anatômica das raízes de aguapé exibe epiderme unisseriada e exoderme formada por uma camada de células de paredes espessadas (Figura 3). O córtex pode ser dividido em córtex externo, possuindo três camadas de grandes células parenquimáticas alongadas em um dos eixos possuindo poucos espaços intercelulares. No córtex mediano ocorre a presença de câmaras de aerênquima delimitadas por trabéculas de células parenquimáticas alongadas, e córtex interno, composto por seis camadas de células parenquimáticas de paredes finas e isodiamétricas. Essas células espaços intercelulares maiores que os presentes no córtex externo, podendo ocorrer idioblastos, o córtex termina com a endoderme possuindo pequenas células com formato tabular (Figura 3). O cilindro vascular é composto por grandes vasos de metaxilema alternados com floema, periciclo formado por uma camada de células, parênquima medular com células isodiamétricas localizadas no centro, alguns vasos menores de metaxilema podem ser associados aos vasos maiores, ou formar novos pólos de metaxilema (Figura 3).

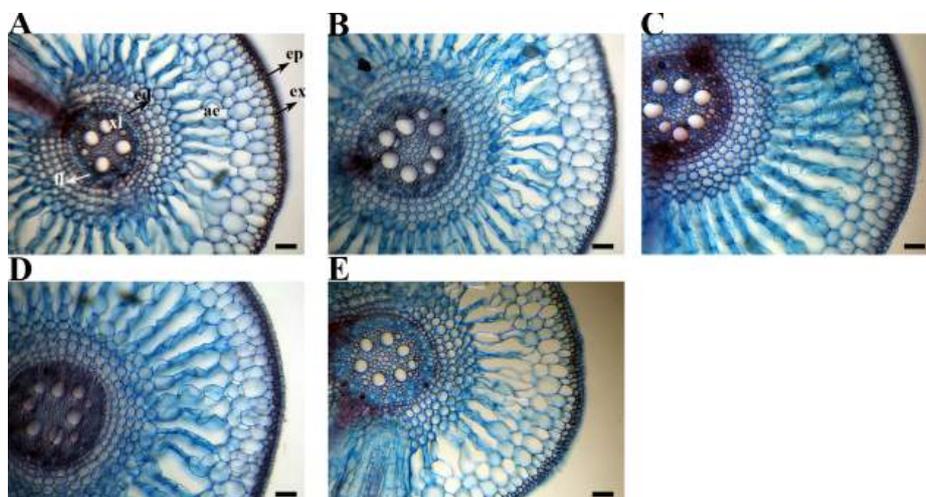


Figura 3 Secções transversais de raízes de plantas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de cádmio. ep= epiderme, ex= exoderme, ae= aerênquima, ed= endoderme, fl= floema, xl= metaxilema. A= 0,0; B= 0,4; C= 0,8; D= 1,6 e E= 3,2 mg L⁻¹. barras = 100 μm

Não ocorreram modificações na proporção de aerênquima nos tratamentos contendo Cd em relação ao controle (Tabela 3). Ocorreram modificações no diâmetro das células corticais, essas células reduziram em 18,12% a partir da concentração de 1,6 mg L⁻¹ de Cd na solução em relação às concentrações menores e permaneceu inalterada na concentração de 3,2 mg L⁻¹ (Tabela 3). Não ocorreram mudanças significativas nas espessuras da epiderme, da endoderme e da exoderme nos tratamentos de Cd em relação ao controle (Tabela 3). O IVC reduziu nos tratamentos contendo Cd a partir da concentração de 0,80 mg L⁻¹ não se alterando nas concentrações superiores, a redução foi de 54,78% sendo relacionada ao aumento do número de vasos de metaxilema observado nas concentrações contendo cádmio (Figura 3). O FL aumentou apenas na concentração de 3,2 mg L⁻¹, sendo que o aumento foi de 36,15% (Tabela 3).

Tabela 3 Características anatômicas de raízes de aguapé em secção transversal cultivadas em diferentes concentrações de cádmio

Cádmio mg L ⁻¹	PAR	CC (μm)	EP (μm)	ED (μm)	IVC	EX (μm)	FL (μm)
0,00	0,14 a	115,9 a	26,32 a	19,51 a	2,30 a	39,58 a	34,54 b
0,40	0,13 a	108,0 a	23,83 a	18,59 a	2,19 a	31,04 a	33,70 b
0,80	0,15 a	109,8 a	27,06 a	17,86 a	1,36 b	41,03 a	33,17 b
1,60	0,15 a	099,4 b	24,82 a	18,09 a	1,31 b	39,50 a	38,41 b
3,20	0,15 a	094,9 b	27,99 a	19,64 a	1,04 b	38,26 a	45,16 a

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). PAR= proporção de aerênquima no córtex, CC= diâmetro das células corticais, EP= espessura da epiderme, ED= espessura da endoderme, IVC= índice de vulnerabilidade do sistema vascular (índice de vulnerabilidade de Carlquist), PM= diâmetro das células do parênquima medular, EX= espessura da exoderme, FL= espessura do floema

O sistema antioxidante de *E. crassipes* foi modificado com as concentrações de cádmio em relação ao controle (Figura 4). A atividade da CAT nas folhas de *E. crassipes* aumentou em 141,60% na concentração de 0,40 mg L⁻¹, apresentando, em seguida uma queda proporcional à concentração em sua atividade, a redução foi de 26,73% na concentração de 0,80 mg L⁻¹, caindo novamente 44,36% na concentração de 1,60 mg L⁻¹, entretanto, com valores superiores ao grupo controle. Na concentração de 3,20 mg L⁻¹, a atividade dessa enzima cai para valores inferiores ao controle, reduzindo em 52,29% sua atividade (Figura 4B). Contudo, nas raízes as concentrações de Cd não promoveram modificações na atividade da CAT (Figura 4A). A atividade da APX nas folhas de *E. crassipes* aumentou em 118,0% na concentração de 0,40 mg.L⁻¹, estabilizando até a concentração de 3,2 mg L⁻¹ quando a atividade dessa enzima volta a aumentar em 23,37% em relação às concentrações anteriores (Figura 4B). Contudo, nas raízes ocorreu uma queda da atividade da APX nos tratamentos de Cd, sendo que essa queda foi de 29,35% na concentração de 0,40 mg L⁻¹, oscilando entre as concentrações mais altas até a concentração de 3,2 mg L⁻¹ quando foi reduzida em 13,12% (Figura 4B). A atividade da SOD aumentou

em torno de 13,65% na concentração de 0,80 mg L⁻¹ de Cd, oscilando nas concentrações superiores sem se modificar significativamente (Figura 4C). Nas raízes a atividade dessa enzima foi estimulada, aumentando-se em 28,16% na concentração de 0,40 mg L⁻¹, aumentando ainda 57,17% na concentração de 0,80 mg L⁻¹, e 57,18% na concentração de 1,60 mg L⁻¹ não se modificando na concentração de 3,2 mg L⁻¹, desse elemento.

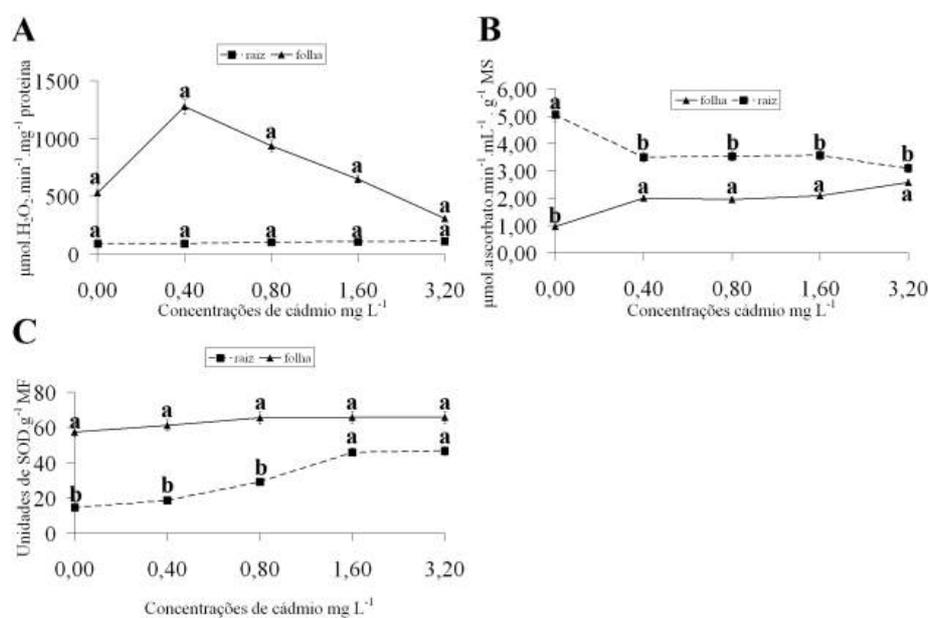


Figura 4 Atividade das enzimas do sistema antioxidante de plantas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de cádmio. A= atividade da catalase, B= atividade da peroxidase do ascorbato, C= atividade da dismutase do íon superóxido. As barras indicam o erro padrão. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott, 5%)

4 DISCUSSÃO

As respostas do sistema fotossintético de *E. crassipes* sob influência do Cd foram diferentes dos relatados na literatura para outras espécies. Segundo Pietrini et al. (2003), a presença de Cd promoveu reduções na taxa fotossintética de plantas de *Phragmites australis* sendo que essas reduções chegaram à 30%. Na presença de Cd, pode ocorrer a deposição de espécies reativas de oxigênio como o H₂O₂ que pode se acumular nas células (SCHÜZENDÜBEL et al., 2001), sendo que as espécies reativas de oxigênio podem ser prejudiciais ao sistema fotossintético pois podem prejudicar as membranas dos cloroplastos, alterando a sua estrutura e reduzindo a eficiência fotossintética (STOEVA; BINEVA, 2003). Dessa forma, em plantas sob presença de Cd a redução na taxa fotossintética pode estar associada com prejuízos nas membranas dos cloroplastos, promovido pelo estresse oxidativo.

As plantas de *E. crassipes*, contudo, não demonstraram inibição na taxa fotossintética (Figura 1). A capacidade dessa espécie em manter a fotossíntese na presença de Cd pode estar relacionada com a ativação do sistema antioxidante, sendo que a atividade da APX, CAT e SOD nas folhas dessa espécie aumentaram com o aumento da concentração de Cd na solução (Figura 4). Esse fato pode ter permitido a manutenção da estrutura dos cloroplastos nas folhas de *E. crassipes*, não promovendo inibições na taxa fotossintética. Entretanto, na concentração de 3,2 mg L⁻¹ a fotossíntese tende a reduzir (Figura 1), e, nessa concentração, a APX e CAT sofrem uma inibição, sem contudo alterar a SOD (Figura 4), esse fato pode ter levado a um acúmulo de H₂O₂ nas células do clorênquima e, dessa forma, promovido uma redução na fotossíntese. Esses dados corroboram a relação entre o sistema antioxidante dessa espécie com a manutenção da taxa fotossintética na presença de Cd.

A taxa fotossintética pode ser regulada por diferentes fatores, contudo sendo os dois principais a radiação e a disponibilidade de CO₂, que podem promover um aumento na fotossíntese quando em maior quantidade (ZHOU; HAN, 2005). A radiação foi padronizada para todos os tratamentos no momento das medições, dessa forma, a manutenção na taxa fotossintética pode estar associado também com uma maior disponibilidade de CO₂ na folha. Essa hipótese é corroborada pelas modificações na anatomia foliar associadas à captação desse gás. O aumento na densidade estomática na face abaxial pode ser um fator que contribuiu para uma maior captação de CO₂ nas condições do experimento, pois essa característica pode sofrer um aumento quando plantas estão sob algum tipo de estresse, como ocorreu em plantas de café sob estresse hídrico (GRISI et al., 2008). A ausência modificações na funcionalidade estomática das plantas em todos os tratamentos permite a manutenção das características funcionais dos estômatos de *E. crassipes* sob estresse por Cd, não havendo prejuízos para a capacidade dessas estruturas em captar CO₂ (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Outro fator anatômico que contribuiu para o aumento na captação de CO₂ foi o aumento da espessura do mesófilo e do parênquima esponjoso em todos os tratamentos contendo Cd. Esse aumento nos tecidos foliares pode permitir uma maior capacidade de retenção do CO₂ no interior da folha por ser essa uma das funções básicas do parênquima esponjoso e do aerênquima (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). A não modificação na proporção de aerênquima foliar é um resultado interessante, pois pode conservar o espaço destinado à retenção de gases, no caso o CO₂ e O₂ que pode contribuir para a fotossíntese e respiração nas folhas dessa espécie. Esse resultado demonstra uma característica de tolerância de *E. crassipes* ao Cd pois em outras macrófitas aquáticas Souza, Vânia et al. (2009), verificaram a redução na proporção de aerênquima foliar em condições de estresse por Cd. O aumento na espessura do

parênquima paliçádico pode permitir um melhor aproveitamento da radiação incidente na fotossíntese.

Outros resultados que corroboram a hipótese do aumento na fotossíntese de *E. crassipes* associado com a captação de CO₂ é o aumento observado na relação na g_s e na E nos tratamentos contendo Cd. O aumento nessa característica permite observar que o fluxo de CO₂ para o interior da folha foi favorecido, aumentando a facilidade de captação desse gás, que pode ser relacionado a um aumento na densidade estomática, que promoveu uma maior g_s e permitiu um aumento na transpiração por possuir mais estômatos. Esses resultados, associados com a manutenção da funcionalidade estomática e do tamanho dos estômatos demonstra uma resposta ao estresse, pois em condições de estresse hídrico a funcionalidade estomática tende a aumentar e as dimensões (diâmetros dos estômatos) diminuir (GRISI et al., 2009). Dessa forma, ocorreu um favorecimento à captação e à manutenção do CO₂ no interior da folha, que pode ter promovido o incremento na taxa fotossintética do aguapé na presença de Cd.

Em ambientes alagados ou aquáticos, a proporção de aerênquima na raiz é uma característica indispensável à fisiologia das raízes das plantas nesses ambientes, podendo se desenvolver quando as plantas são cultivadas nessas condições (PEREIRA et al., 2008; SOUZA, Thiago et al., 2009). Portanto, essa característica não ter se alterado nas raízes de *E. crassipes* sob a presença de Cd é um fator favorável para essa espécie e, demonstra uma característica de tolerância. A endoderme, epiderme e exoderme são consideradas barreiras apoplásticas ao fluxo de substâncias na raiz (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Essas características não terem aumentado na presença de Cd pode ter promovido o fluxo do metal na raiz e da raiz para a parte aérea, fato que, pode ser associado com a queda na fotossíntese, que pode ter sido inibida na maior concentração de Cd por esse elemento ter se deslocado para a parte aérea, pois

esse elemento pode ser muito móvel na planta (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005; MANGKOEDHARDJO, 2008).

As características do sistema vascular nas raízes de *E. crassipes* foram modificadas para aumentar a eficiência sob condições de estresse. O IVC é uma característica que, com a sua redução, pode indicar uma maior condutividade hidráulica nas raízes, reduzindo a embolia (CARLQUIST, 1975; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009), e é uma característica que pode reduzir quando as plantas estão sob estresse (PEREIRA et al., 2009). Dessa forma, a redução no IVC pode indicar uma melhoria na condutividade hidráulica de *E. crassipes*, que pode ser associado a um maior fluxo de nutrientes permitindo a sobrevivência nessas condições e, sendo a espécie aquática, o problema da transpiração não é relevante. Outro resultado que melhora o sistema vascular é o espessamento do floema observado na maior concentração. Como esse tecido está relacionado com a translocação de fotoassimilados (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009), pode permitir um melhor desenvolvimento do sistema radicular e, fluxo de fotoassimilados para as plantas filhas.

O aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante em *E. crassipes* está de acordo com os resultados observados por Schüzendübel et al. (2001), Pietrini et al. (2003) e Odjegba e Fasidi (2007) que verificaram o aumento da atividade dessas enzimas em plantas submetidas ao Cd. A maior atividade da SOD na raiz, em detrimento da APX e da CAT está de acordo com os resultados de Schüzendübel et al. (2001), que verificaram esse mesmo comportamento em plantas de *Pinus sylvestris*. Esse fato pode ter promovido um acúmulo de H₂O₂ nas células e, levado a um estresse oxidativo. Contudo, esses efeitos não são evidentes em *E. crassipes*, que não demonstrou sinais de toxidez nas concentrações estudadas.

As características avaliadas permitem verificar um grande potencial para a utilização de *E. crassipes* em sistemas de fitorremediação para o Cd. As

características anatômicas e fisiológicas observadas permitem elucidar os mecanismos pelos quais a espécie demonstra o potencial para a hiperacumulação e fitorremediação de vários elementos tóxicos, como relatado por Dhankher et al. (2002), Oliveira et al. (2001), Mondardo, Gonçalves Júnior e Sacon (2006), Snyder (2006) e Gonçalves Júnior et al. (2008). Assim, a espécie se mostra promissora para a fitorremediação de Cd, sendo que o investimento na fotossíntese pode ser relacionado à sua reprodução vegetativa, que necessita de energia e esqueleto de carbono para as plantas filhas, permitindo um alto crescimento populacional.

5 CONCLUSÃO

As plantas de *E. crassipes* exibiram adaptações fisiológicas na presença de cádmio, mantendo a taxa fotossintética e aumentando a atividade das enzimas do sistema antioxidante. As modificações nas características anatômicas de *E. crassipes* permitem verificar adaptações para uma maior captação e retenção de CO₂ nas folhas que pode ser associadas a manutenção da fotossíntese. As modificações na anatomia radicular de *E. crassipes* permitem verificar ausência de sinais de toxidez e, melhorias no sistema vascular. As enzimas do sistema antioxidante são mais ativas nas folhas que nas raízes de *E. crassipes*, e o aumento de sua atividade podem ser associados com a manutenção do sistema fotossintético.

REFERÊNCIAS

BENAVIDES, M. P.; GALLEGOS, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 21-34, Jan./Mar. 2005.

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.

CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. Berkeley: University of California, 1975. 259 p.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

DHANKHER, O. P. et al. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, n. 11, p. 1140-1145, Nov. 2002.

FAISAL, M.; HASNAIN, S. Synergistic removal of Cr (VI) by *Eichhornia crassipes* in conjunction with bacterial strains. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 6, n. 3, p. 264-268, Feb. 2003.

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

GONÇALVES JÚNIOR, A. C. et al. Remoção de metais pesados tóxicos cádmio, chumbo e cromo em biofertilizante suíno utilizando macrófita aquática (*Eichhornia crassipes*) como bioindicador. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 9-14, jan. 2008.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 53-64, Jan./Mar. 2005.

GRISI, F. A. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'Catuaí' e 'Siriema' submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, nov. 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 300 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 221 p.

MADHUSUDHAN, R. et al. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, n. 4, p. 550-557. Apr. 2003

MANGKOEDHADJO, S. *Jatropha curcas* L. for phytoremediation of lead and cadmium polluted soil. **World Applied Sciences Journal**, Cairo, v. 4, n. 4, p. 519-522, June 2008.

MONDARDO, E.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; SACON, E. Uso da macrófita aquática (*Eichhornia crassipes*) na remoção de cobre e zinco em biofertilizante de origem suína. **Ciência Agrônômica Engenharia**, Ponta Grossa, v. 12, n. 2, p. 13-20, ago. 2006.

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.

ODJEGBA, V. J.; FASIDI, I. O. Changes in antioxidant enzyme activities in *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae) under heavy metal stress. **International Journal of Tropical Biology**, San José, v. 55, n. 3, p. 815-823, Sept./Dec. 2007.

OLIVEIRA, J. A. et al. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 329-341, set./dez. 2001.

PEREIRA, F. J. et al. 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.

PIETRINI, F. et al. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. **Plant Physiology**, Clare, v. 133, n. 2, p. 829-837, Oct. 2003.

SCHÜTZENDÜBEL, A. et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, Clare, v. 127, n. 3, p. 887-898, Nov. 2001.

SNYDER, K. V. W. Removal of arsenic from drinking water by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). **Journal of United States Stockholm Junior Water Prize**, Stockholm, v. 1, n. 1, p. 41-58, Jan. 2006.

SOUZA, T. C. et al. Morpho-anatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil and Environment**, Czeck, v. 55, n. 11, p. 504-510, Nov. 2009.

SOUZA, V. L. et al. Efeito do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 343-354, abr./jun. 2009.

STOEVA, N.; BINEVA, T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Sciences**, Sofia, v. 29, n. 1, p. 87-95, Jan. 2003.

WOLFF, G. et al. 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./mar. 2009.

ZHOU, Y. M.; HAN, S. J. Photosynthetic response and stomatal behaviour of *Pinus koraiensis* during the fourth year of exposure to elevated CO₂ concentration. **Photosynthetica**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 445-449, Sept. 2005.

ARTIGO 3: CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE AGUAPÉ COMO MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO CHUMBO

RESUMO

Os elementos tóxicos como o chumbo promovem crescente preocupação nos últimos anos como poluentes de cursos d'água e solos. A fitorremediação é uma alternativa para a descontaminação de ambientes aquáticos contaminados por chumbo. Esse trabalho teve como objetivo verificar o potencial para a fitorremediação de chumbo por plantas de aguapé, estudando as suas características anatômicas e fisiológicas. Plantas de aguapé foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland com cinco concentrações de chumbo: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ por um período de 20 dias. Ao final do experimento foram avaliadas as modificações anatômicas nas raízes e folhas, a fotossíntese, a taxa transpiratória, a condutância estomática, a relação Ci/Ca e a atividade das enzimas do sistema antioxidante APX, CAT e SOD. As modificações na anatomia foliar nos tratamentos contendo chumbo foram relacionadas a uma melhor assimilação de CO₂ e não exibiram sinais de toxidez. A anatomia radicular não demonstrou sinais de toxidez na presença de chumbo, melhorias no xilema e floema e um aumento nas barreiras apoplásticas. A fotossíntese e a relação Ci/Ca aumentaram nos tratamentos contendo chumbo sem modificações significativas na transpiração e com redução na condutância estomática. Todas as enzimas do sistema antioxidante exibiram aumento na atividade nas folhas e poucas modificações nas raízes. As plantas de aguapé demonstraram tolerância ao estresse por chumbo relacionado com modificações fisiológicas e anatômicas.

Palavras-chave: *Eichhornia crassipes*. Metais pesados. Ecofisiologia. Anatomia vegetal. Macrofitas.

ABSTRACT

Heavy metals like lead have been of great concern on last years like water and soil pollutants. Phytoremediation is an alternative to scavenging of lead in water environments contaminated by this element. This work aimed to verify the phytoremediation potential of water hyacinth plants under lead contamination, studying its anatomical and physiological traits. Water hyacinth plants were grown on Hoagland nutrient solution under five lead levels: 0.00, 0.50, 1.00, 2.00 and 4.00 mg.L⁻¹ by 20 days. At the end of experiment, the anatomical modifications on root and leaves, photosynthesis, transpiratory rate, stomatal conductance, Ci/Ca rate, and the activity of antioxidant system enzymes APX, CAT and SOD were measured. The leaf anatomy modifications under lead treatments were related to CO₂ assimilation and there were not toxicity signs. The root anatomy modifications exhibited not toxicity signs and xylem and phloem better traits, and an increasing in the apoplastic barriers. The photosynthetic rate and Ci/Ca rate were increased under lead treatments, with no modifications in transpiratory rate and reducing in stomatal conductance. All the antioxidant system enzymes exhibited increased activity on leaves and few modifications on roots. Water hyacinth plants exhibited tolerance to lead stress related to anatomical and physiological modifications.

Keywords: *Eichhornia crassipes*. Heavy metals. Ecophysiology. Plant anatomy. Macrophytes.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente por chumbo e outros elementos tóxicos vem se tornando um grave problema mundial (GRATÃO et al., 2005). O chumbo é um dos principais poluentes desde a antiguidade, sendo produzido por atividades como mineração, efluentes de solo urbano, gases automotivos, chaminés industriais, processamento de minérios, efluentes de indústria de bateria, fertilizantes e pesticidas (SHARMA; DUBEY, 2005). A fitorremediação é um processo limbo e de baixo custo para a descontaminação do solo e cursos d'água (GRATÃO et al., 2005).

Para a fitorremediação de ambientes de água doce, a utilização da macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (aguapé), nativa e pertencente à família Pontederiaceae é uma alternativa viável. Essa espécie demonstrou capacidade para a hiperacumulação de crômio (FAISAL; HASNAIN, 2003), sendo capaz de acumular Cd proporcionalmente ao tempo de exposição e à concentração da solução contaminada (OLIVEIRA et al., 2001). A espécie ainda demonstrou potencial para a fitorremediação de efluentes de biofertilizantes contendo zinco e cobre (MONDARDO; GONÇALVES JÚNIOR; SACON, 2006), sendo ainda descrita a capacidade de hiperacumulação de arsênio para a espécie (DHANKHER et al., 2002; SNYDER, 2006). A capacidade para a hiperacumulação e fitorremediação do chumbo de *E. crassipes* foi descrita por Gonçalves Júnior et al. (2008), que descreveram uma alto potencial de hiperacumulação desse metal na espécie e, que a acumulação ocorre mais na raiz. A capacidade de hiperacumulação dessa espécie parece ser dependente da relação entre a massa fresca da planta e o volume da solução, sendo que fatores como pH e temperatura não tiveram influencia no processo (SCHOENHALS; OLIVEIRA; FOLLADOR, 2009).

Os efeitos do chumbo na fotossíntese ainda são pouco estudados, contudo, em cianobactérias, a presença de chumbo promoveu reduções no conteúdo de clorofila e na fotossíntese, sendo que os efeitos desse metal podem ser relacionados diretamente com o fotossistema II (PINCHASOV; BERNER; DUBINSKY, 2006). Em plantas de arroz, a presença de chumbo promoveu um intenso aumento na peroxidação lipídica; a presença desse metal promoveu ainda um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, sendo que as peroxidases foram mais ativas que a dismutase do superóxido, e essas enzimas são importantes para a defesa contra os efeitos oxidativos do chumbo no arroz (VERMA; DUBEY, 2003).

As modificações na anatomia de *E. crassipes* sob a presença de efluentes de indústria têxtil, são descritas como envolvendo a redução do tamanho das células dos tecidos foliares (MAHMOOD et al., 2005). Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo verificar as modificações nas características anatômicas, de trocas gasosas e do sistema antioxidante que possam atuar nos mecanismos de tolerância ao chumbo em plantas de *E. crassipes*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes* Mart.) em Alfenas-MG, em açudes naturais da região, formados à partir de uma nascente que se localiza à cerca de 60 m do local e, aparentemente isentos de fontes de contaminação por chumbo. As plantas foram lavadas em água corrente e cultivadas em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras em solução de Hoagland à 40% da força iônica por um período de 30 dias, para obtenção de gerações clonais aclimatizadas e isentas de chumbo endógeno.

As plantas foram padronizadas quanto ao tamanho, número de folhas e ausência de estolões para compor as unidades experimentais. Essas plantas foram cultivadas em vasos de polipropileno com capacidade para 6 L, contendo 4 L de solução nutritiva de Hoagland à 20% da força iônica acrescida de concentrações crescentes de chumbo sendo: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,00 mg L⁻¹. As concentrações de chumbo aplicadas foram baseadas na concentração máxima permitida pela Res. 357 do CONAMA (WOLFF et al., 2009), correspondendo ao controle (concentração 0,00 mg L⁻¹) e 100, 200, 400 e 800 vezes a concentração máxima permitida, respectivamente, à partir da concentração de 0,50 mg L⁻¹. As plantas foram deixadas nessas condições por um período de 20 dias, após os quais as plantas foram coletadas para as diferentes análises.

Decorridos 15 dias, as características de trocas gasosas das plantas foram avaliadas utilizando analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LI-6400. Foram avaliadas a taxa fotossintética (A), a condutância estomática (g_s), a taxa transpiratória (E), e a relação entre carbono interno e externo (C_i/C_a). Para a avaliação dessas variáveis, foram selecionadas as folhas completamente expandidas em cinco plantas por tratamento, às 10:00 horas, sendo que a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada na câmara do aparelho para 1000 μmol m⁻² s⁻¹.

Para as análises anatômicas foram coletadas as plantas filhas desenvolvidas ao longo do período experimental, após um período de 20 dias, com folhas e raízes completamente desenvolvidas. As plantas filhas foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e etanol 70% (F.A.A.70) por um período de 72 horas, posteriormente sendo armazenadas em etanol 70% até a data das análises (KRAUS; ARDUIN, 1997). Para as secções paradérmicas utilizou-se lâminas de aço, seccionando as faces abaxial e adaxial, posteriormente os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio 50%, lavados em água destilada duas vezes por 10 minutos, coradas com solução de

safranina 1% e montadas em lâmina e laminula com glicerina 50% (JOHANSEN, 1940). Fragmentos de aproximadamente 2 cm das folhas foram retirados da região da nervura central e da região de ramificação à 2 cm do ápice das raízes e foram utilizados para as secções transversais com auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC. Os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio, lavados em água destilada duas vezes por 10 minutos, corados com solução safrablau (safranina 1% e azul de astra 0,1% na proporção de 7:3) e montados em lamina e laminula em glicerina 50%. As lâminas foram fotografadas em microscópio Olympus modelo BX 60 acoplado à câmera digital Canon A630.

A análise das fotomicrografias foi realizada no software UTHSCSA-Imagetool e medidas: EAB= espessura da epiderme da face abaxial, EAD= espessura da epiderme da face adaxial, MF= espessura do mesofilo, CT= espessura da cutícula, PP= espessura do parênquima paliçádico, PE= espessura do parênquima esponjoso, PP/PE= proporção entre parênquima paliçádico e esponjoso, DF= distância entre os feixes vasculares no mesofilo, CB= diâmetro das células da bainha do feixe, PAE= proporção de aerênquima na folha (área/área), NE= número de estômatos por campo; NC= número de células epidérmicas por campo; POL= diâmetro polar dos estômatos; EQU= diâmetro equatorial dos estômatos; DE= densidade estomática (estômatos por mm²); FUN= funcionalidade estomática (relação POL/EQU); IE= índice estomático, PAR= proporção de aerênquima no córtex, CC= diâmetro das células corticais, EP= espessura da epiderme, ED= espessura da endoderme, IVC= índice de vulnerabilidade do sistema vascular (índice de vulnerabilidade de Carlquist), PM= diâmetro das células do parênquima medular, EX= espessura da exoderme, FL= espessura do floema. O IVC foi calculado segundo Carlquist (1975), as proporções de área de aerênquima na raiz segundo Pereira et al. (2008) a DE e o IE foram calculados segundo Castro, Pereira e Paiva (2009).

Para as análises bioquímicas, amostras de folhas e raízes foram coletadas aos 20 dias de experimento, no período da manhã sendo congeladas em nitrogênio líquido e preservadas em freezer à -80 °C até a data das análises. Foi realizada extração protéica para a obtenção das enzimas, foram pesados 0,5 g de raízes ou folhas adicionando-se 2,0 mL de tampão de extração constituído de 1,924 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7, 20 µL de EDTA 0,1 M, 8 µL de DTT 0,5 M, 6 µL de PMSF 0,1 M e 40 mg de PVPP adaptado de Bor, Özdemir e Türkan (2003). Após homogeneização, o extrato enzimático foi centrifugado à 14000 g, por 20 minutos, na temperatura de 4°C, após esse período foi coletado o sobrenadante, com o qual foram realizadas as determinações das atividades das enzimas: catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), e dismutase do íon superóxido (SOD).

Para a avaliação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foram adicionados 160 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7, 100 µL de ácido ascórbico 0,005 M, 100 µL de H₂O₂ 0,005 M, 605 µL de água destilada e 35 µL do extrato enzimático adaptado de Nakano e Asada (1981). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância, a 290 nm, por 2 minutos e calculada com base no fator de extinção de 2,8 mM⁻¹cm⁻¹. A atividade da catalase (CAT) foi avaliada adicionando-se em 35 µL do extrato enzimático, 160 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7, sendo ainda adicionados 125 µL de H₂O₂ 0,01 M dissolvida no tampão e 680 µL de água destilada adaptado de Madhusudhan et al. (2003). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância, a 240 nm, por 1 minuto e calculada com base no fator de extinção de 36 mM⁻¹cm⁻¹. A análise da atividade da SOD foi realizada segundo o método proposto por Giannopolitis e Ries (1977).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de

variância e a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott para $P < 0,05$, ou análise de regressão com auxílio do software estatístico Sisvar.

3 RESULTADOS

As diferentes concentrações de chumbo modificaram de forma significativa apenas a fotossíntese dentre as características de trocas gasosas das plantas de *E. crassipes*. Na concentração na concentração de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ ocorreu um aumento de 11,29% em relação ao controle, nas concentrações mais altas os valores para a fotossíntese oscilaram sem exibirem diferenças significativas (Figura 1A). A condutância estomática não demonstrou diferenças significativas na presença de Pb em relação ao controle (Figura 1B). A taxa transpiratória não exibiu diferenças significativas nas concentrações Pb em relação ao controle (Figura 1C). A relação não demonstrou modificações significativas na presença de chumbo em relação ao controle (Figura 1D).

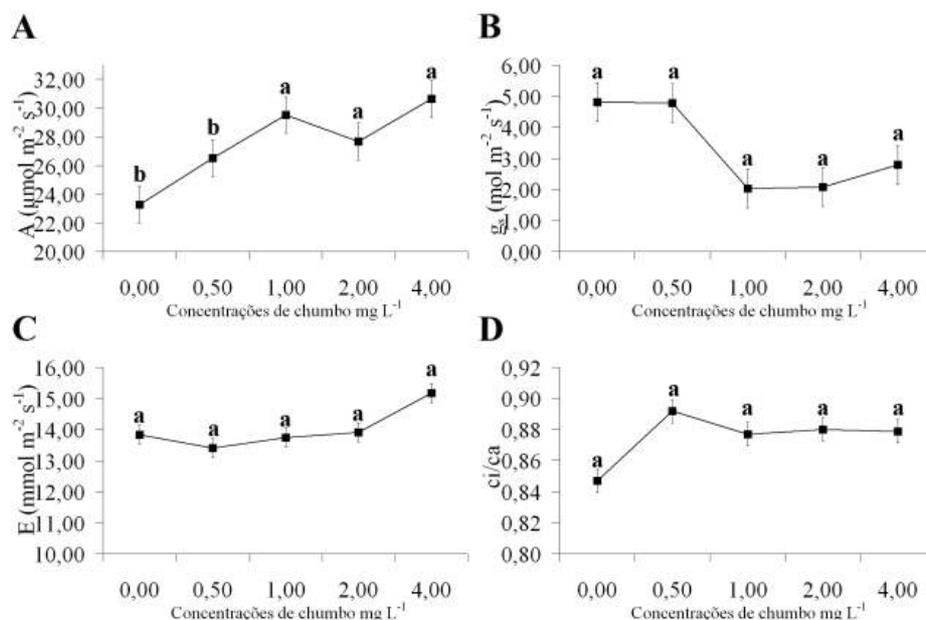


Figura 1 Características de trocas gasosas das plantas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de chumbo. A= fotossíntese, B= condutância estomática, C= transpiração, D= relação Ci/Ca. As barras representam o erro padrão. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott, 5%)

As folhas possuem epiderme unisseriada em ambas as faces, a cutícula é extremamente reduzida. Possuem parênquima paliçádico formado por três a quatro camadas de células voltadas para a face adaxial, e o parênquima esponjoso constituído por grandes câmaras de aerênquima. As câmaras são preenchidas por trabéculas formadas por feixes de células parenquimáticas, ocorre parênquima nas câmaras onde não há aerênquima, que pode exibir idioblastos e colênquima angular. Os feixes vasculares são colaterais, possuem bainha desenvolvida com alguns feixes possuindo o xilema voltado para a face adaxial (para o parênquima paliçádico) e outros voltados para a face abaxial,

podem ocorrer esclereídeos e idioblastos contendo ráfides no parênquima paliçádico e esponjoso, as folhas são anfiestomáticas (Figura 2).

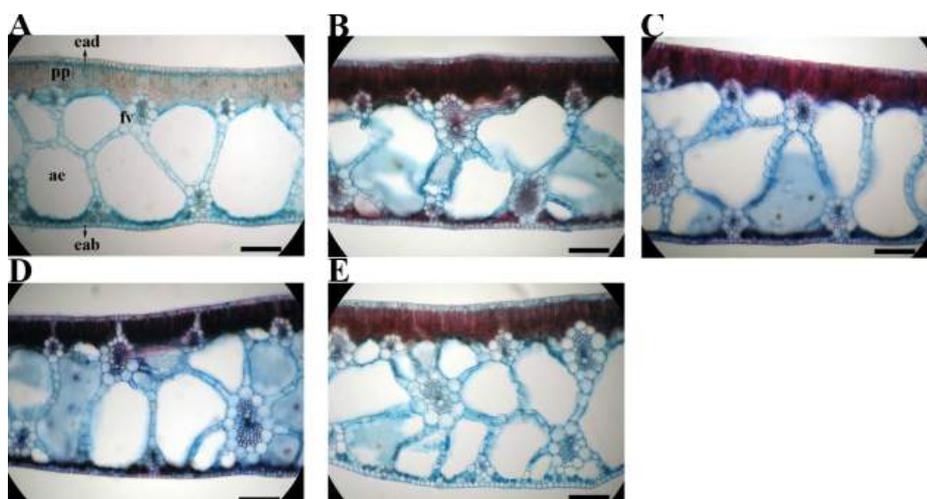


Figura 2 Secções transversais de folhas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de chumbo. ead= epiderme da face adaxial, eab= epiderme da face abaxial, pp= parênquima paliçádico, ae= aerênquima, fv= feixe vascular. A= 0,0; B= 0,5; C= 1,0; D= 2,0 e E= 4,0 mg L⁻¹. barras = 100 µm

As diferentes concentrações de chumbo promoveram modificações nas características anatômicas foliares de *E. crassipes*. Não ocorreram modificações significativas na espessura da epiderme da face abaxial e adaxial de *E. crassipes* na presença de chumbo (Tabela 1). Ocorreu um aumento de 19,0% na espessura do mesofilo a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹ em relação ao controle e à concentração anterior, essa característica não se modificou nas concentrações mais altas (Tabela 1 e Figura 2). Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos para a espessura do parênquima paliçádico e esponjoso e para a relação parênquima paliçádico/parênquima esponjoso (Tabela 1). A distância

entre os feixes vasculares reduziu em 32,05% em todos os tratamentos a partir da concentração de 0,50 mg L⁻¹, contudo, não se modificou nas diferentes concentrações (Tabela 1). Não ocorreram diferenças significativas entre as diferentes concentrações de chumbo em relação ao controle para a proporção de aerênquima foliar (Tabela 1).

Tabela 1 Características dos tecidos foliares em secção transversal de aguapé cultivado em diferentes concentrações de chumbo

Pb mg L ⁻¹	EAB (µm)	EAD (µm)	MF (µm)	PP (µm)	PE (µm)	PP/P E	DF (µm)	PAE
0,00	09,9 a	12,1 a	285,8 b	67,61 a	236,2 a	0,3 a	103,7 a	0,38 a
0,50	09,7 a	12,2 a	273,7 b	66,80 a	209,9 a	0,3 a	082,3 b	0,26 a
1,00	09,3 a	13,2 a	325,7 a	64,13 a	267,2 a	0,2 a	085,2 b	0,35 a
2,00	09,7 a	12,7 a	299,9 a	68,16 a	214,8 a	0,3 a	076,4 b	0,87 a
4,00	11,1 a	13,9 a	324,6 a	69,15 a	277,8 a	0,2 a	069,6 b	0,32 a

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). EAB= espessura da epiderme da face abaxial, EAD= espessura da epiderme da face adaxial, MF= espessura do mesofilo, PP= espessura do parênquima paliçádico, PE= espessura do parênquima esponjoso, PP/PE= proporção entre parênquima paliçádico e esponjoso, DF= distância entre os feixes vasculares no mesofilo, PAE= proporção de aerênquima na folha (área/área)

Nas secções paradérmicas da face abaxial, percebe-se que ocorreu um aumento na densidade estomática correspondente à 15,00% em relação ao controle na concentração de 0,5 mg L⁻¹, sendo que na concentração de 1,0 mg L⁻¹ ocorreu outro aumento nessa característica equivalente à 8,69% em relação à concentração anterior (Tabela 2). O aumento na densidade estomática está diretamente relacionado ao aumento observado no número de estômatos. Não ocorreram diferenças significativas no número de células epidérmicas, ou nas dimensões estomáticas, definidas pelos diâmetros polar e equatorial (Tabela 2). A funcionalidade estomática aumentou em 17,71% a partir da concentração de

1,0 mg L⁻¹ em relação às concentrações iniciais sendo que não ocorreram modificações significativas entre as concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de chumbo (Tabela 2). O índice estomático aumentou a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹, sendo que esse aumento foi 13,33% em relação ao controle e à concentração de 0,5 mg L⁻¹, contudo, sem se modificar à partir dessa concentração (Tabela 2).

Tabela 2 Características anatômicas de folhas de aguapé em secção paradérmica cultivadas em diferentes concentrações de chumbo

Chumbo mg L ⁻¹	FACE ABAXIAL						
	NE	NC	POL (µm)	EQU (µm)	DE	FUN	IE (%)
0,00	08,0 c	63,0 a	44,38 a	25,4 a	102,7 c	1,7 b	0,13 b
0,50	09,2 b	73,0 a	42,36 a	23,4 a	118,2 b	1,8 b	0,13 b
1,00	10,0 a	66,0 a	46,07 a	22,8 a	128,4 a	2,0 a	0,15 a
2,00	10,0 a	64,4 a	48,34 a	23,8 a	128,4 a	2,0 a	0,16 a
4,00	10,0 a	65,4 a	45,71 a	22,2 a	128,4 a	2,0 a	0,15 a
Chumbo mg L ⁻¹	FACE ADAXIAL						
	NE	NC	POL (µm)	EQU (µm)	DE	FUN	IE (%)
0,00	8,20 b	65,4 a	44,6 a	26,8 a	105,3 b	1,7 b	0,13 b
0,50	9,80 a	75,0 a	46,6 a	23,7 b	125,9 a	1,5 b	0,13 b
1,00	9,60 a	63,4 a	45,0 a	24,6 b	123,3 a	1,8 b	0,15 a
2,00	9,80 a	65,0 a	45,0 a	21,0 c	125,9 a	2,2 a	0,15 a
4,00	9,80 a	65,2 a	47,3 a	22,1 c	125,9 a	2,2 a	0,15 a

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). NE= número de estômatos por campo; NC= número de células epidérmicas por campo; POL= diâmetro polar dos estômatos; EQU= diâmetro equatorial dos estômatos; DE= densidade estomática (estômatos por mm²); FUN= funcionalidade estomática (relação POL/EQU); IE= índice estomático

Na face adaxial, a densidade estomática aumentou em 19,51% em relação ao controle a partir da concentração de 0,5 mg L⁻¹ permanecendo com valores semelhantes em todas as concentrações de chumbo (Tabela 2), esse

resultado é proporcional aos valores encontrados para o número de estômatos. Não ocorreram modificações no número de células epidérmicas e no diâmetro polar dos estômatos ao longo dos tratamentos (Tabela 2). Ocorreram reduções no diâmetro equatorial, sendo que nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, essa redução foi de 8,15% em relação ao controle, e, nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹, essa redução foi de 14,52% (Tabela 2). Esse resultado promoveu aumento na funcionalidade estomática nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹, sendo que esse aumento foi de 40,90% nessas concentrações em relação às concentrações menores (Tabela 2). O índice estomático aumentou nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹, em relação às iniciais, sendo que esse aumento foi de 13,33% (Tabela 2).

As raízes de aguapé possuem epiderme unisseriada e exoderme formada por uma camada de células de paredes espessadas (Figura 3). O córtex pode ser dividido em córtex externo, com três camadas de grandes células parenquimáticas alongadas em um dos eixos e com poucos espaços intercelulares. O córtex mediano onde ocorre a presença de câmaras de aerênquima delimitadas por trabéculas de células parenquimáticas alongadas. O córtex interno é composto por seis camadas de células parenquimáticas de paredes finas e isodiamétricas contendo espaços intercelulares maiores que os presentes no córtex externo, podendo ocorrer idioblastos, o córtex termina com a endoderme com pequenas células tendendo ao formato tabular (Figura 3). O cilindro vascular é composto por grandes vasos de metaxilema alternados com floema, uma camada de periciclo, parênquima medular com células isodiamétricas localizadas no centro, alguns vasos menores de metaxilema podem ser associados aos vasos maiores, ou formar novos pólos de metaxilema (Figura 3).

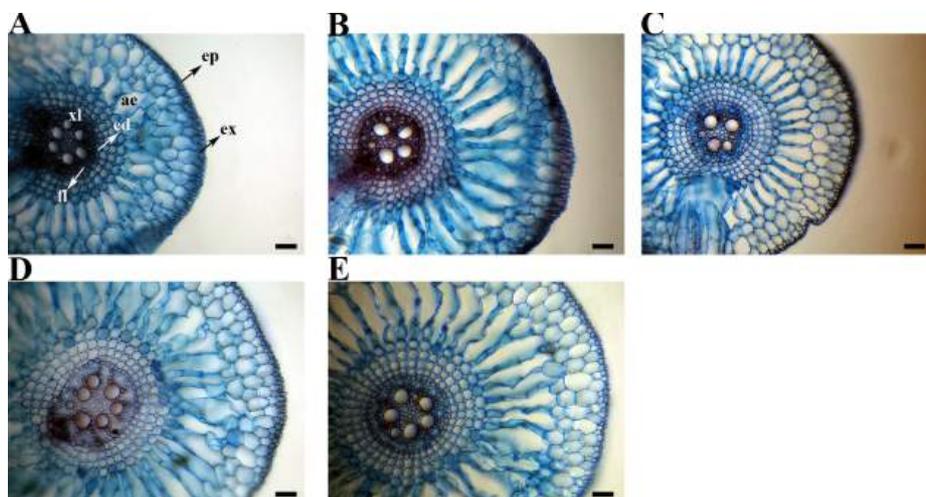


Figura 3 Secções transversais de raízes de plantas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de chumbo. ep= epiderme, ex= exoderme, ae= aerênquima, ed= endoderme, fl= floema, xl= metaxilema. A= 0,0; B= 0,5; C= 1,0; D= 2,0; e E= 4,0 mg.L⁻¹. barras = 100 µm

Em secção transversal, percebe-se que alguns tecidos exibiram modificações na presença de chumbo, contudo, não ocorreram diferenças na proporção de aerênquima nas raízes e na espessura da epiderme para os tratamentos aplicados (Tabela 3). A endoderme demonstrou um incremento em sua espessura em 31,52% a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹, sendo que os valores não se modificaram nas concentrações subsequentes (Tabela 3). A espessura do córtex aumentou em 52,07% nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de chumbo em relação às concentrações anteriores (Tabela 3). O IVC reduziu em 33,91% em todos os tratamentos contendo chumbo, a partir da concentração de 0,5 mg L⁻¹ em comparação ao controle, essa redução está associada ao aumento no número de vasos de metaxilema observado (Tabela 3 e Figura 3). A espessura da exoderme aumentou em 24,36% nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹, em comparação às concentrações iniciais (Tabela 3). A espessura do

floema aumentou em 39,12% nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹, em relação às concentrações anteriores (Tabela 3).

Tabela 3 Características anatômicas de raízes de aguapé em secção transversal cultivado em diferentes concentrações de chumbo

Pb mg L ⁻¹	PAR	EP (µm)	ED (µm)	EC (µm)	IVC	EX (µm)	FL (µm)
0,00	0,20 a	19,90 a	15,1 b	542,24 b	2,30 a	26,27 b	26,99 b
0,50	0,19 a	19,95 a	16,8 b	494,23 b	1,68 b	26,62 b	25,23 b
1,00	0,14 a	18,92 a	17,9 a	555,22 b	1,52 b	31,79 a	30,29 a
2,00	0,17 a	19,82 a	18,4 a	722,90 a	1,53 b	32,67 a	35,10 a
4,00	0,18 a	18,89 a	19,8 a	751,56 a	1,59 b	31,71 a	34,85 a

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). PAR= proporção de aerênquima no córtex, EP= espessura da epiderme, ED= espessura da endoderme, EC= espessura do córtex, IVC= índice de vulnerabilidade do sistema vascular (índice de vulnerabilidade de Carlquist, EX= espessura da exoderme, FL= espessura do floema

O sistema antioxidante de *E. crassipes* demonstrou respostas diferenciadas na presença de chumbo (Figura 4). A atividade da CAT não se modificou nas diferentes concentrações de chumbo em relação ao controle nas raízes de *E. crassipes*. Nas folhas, contudo, a atividade da CAT aumentou em a nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ (Figura 4A). A atividade da APX não demonstrou modificações significativas nas diferentes concentrações de Pb nas raízes e folhas (Figura 4A). A atividade da SOD aumentou nas folhas na presença de Pb, e nas raízes apenas na concentração de 2,0 mg L⁻¹, caindo novamente na última concentração, contudo, nas folhas a atividade da SOD aumenta indefinidamente até a última concentração de chumbo (Figura 4C).

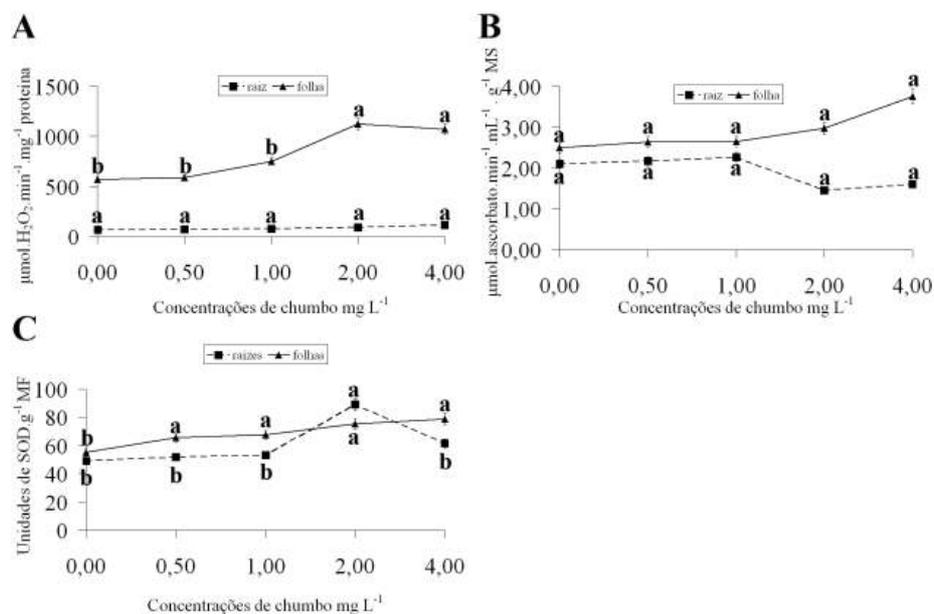


Figura 4 Atividade das enzimas do sistema antioxidante de plantas de aguapé cultivadas em diferentes concentrações de chumbo. A= atividade da catalase, B= atividade da peroxidase do ascorbato, C= atividade da dismutase do íon superóxido. As barras indicam o erro padrão. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott, 5%)

4 DISCUSSÃO

A resposta do sistema fotossintético de *E. crassipes* à presença de chumbo foi diferente da relatada na literatura para outras espécies. Segundo Pinchasov, Berner e Dubinsky (2006), o chumbo pode promover a redução no conteúdo de clorofila e na taxa fotossintética de cianobactérias. Os prejuízos na fotossíntese promovidos pela presença de elementos tóxicos podem ser associados com a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem produzir prejuízos às membranas dos cloroplastos pela peroxidação lipídica

(STOEVA; BINEVA, 2003). A produção de espécies reativas de oxigênio e o aumento na peroxidação lipídica são efeitos relatados para as plantas na presença de chumbo (VERMA; DUBEY, 2003). Dessa forma, no presente trabalho as plantas de aguapé podem ter respondido à presença de chumbo e evitado os efeitos negativos desse elemento na folha por meio da ativação do sistema antioxidante, que aumentou a atividade de todas as enzimas avaliadas, resposta semelhante ao observado por Verma e Dubey (2003). Com as enzimas mais ativas na folha, as plantas de aguapé foram capazes de remover as espécies reativas de oxigênio e evitar seus efeitos deletérios, prejuízos na fotossíntese.

Contudo, a fotossíntese aumentou em *E. crassipes* na presença do chumbo, e, com o sistema protegido, o aumento na taxa fotossintética pode ser relacionado com os fatores que regulam a fotossíntese. A regulação da taxa fotossintética é dependente de diferentes características, mas pode-se associar a radiação e o CO₂, como os dois principais fatores que limitam essa característica (ZHOU; HAN, 2005). Como a radiação foi padronizada para todos os tratamentos com a regulagem da câmara para 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o CO₂ foi o principal fator que contribuiu para o aumento na taxa fotossintética. Esse aumento pode ter ocorrido pelo incremento na capacidade de captação do CO₂ pelas folhas, fato que pode ser confirmado pelo aumento nas características anatômicas associadas com a maior eficiência para a captação desse gás, como o aumento na densidade estomática, no índice estomático, na funcionalidade estomática e na espessura do mesófilo.

A densidade estomática é diretamente relacionada com a captação de CO₂ por aumentar a área disponível para trocas gasosas, em situações de estresse, pode ocorrer o aumento da densidade estomática por permitir trocas gasosas mais eficientes. Esse resultado foi relatado para plantas de café por Grisi et al. (2008) quando submetidas ao estresse hídrico. O aumento no índice estomático confirma esse fato por permitir observar um maior investimento na

diferenciação de células epidérmicas em estômatos ocorreu nas plantas na presença de chumbo, permitindo verificar a importância dessa estrutura para a tolerância ao chumbo em *E. crassipes*, fato que pode ser associado com o aumento da fotossíntese.

O aumento na espessura do mesofilo permite que as folhas possuam uma maior área disponível para armazenar o CO₂ captado pelos estômatos. Como a proporção de aerênquima foliar não se alterou e, esse tecido é diretamente relacionado com o armazenamento de gases (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009), pode-se verificar que um aumento na espessura do mesofilo resulta em um aumento na área disponível para armazenamento do CO₂ nas folhas disponibilizando-o para o clorênquima e, favorecendo a fotossíntese. Essa hipótese é confirmada pela manutenção da relação Ci/Ca, que permite verificar que não ocorreu toxidez por Pb nas folhas, mantendo o fluxo de CO₂ e a relação Ci/Ca.

O aumento na funcionalidade estomática permite verificar que os estômatos se tornaram mais eficientes, visto que o aumento dessa característica pode ser associado à facilidade de captação de CO₂ e a restrição na perda de água por dificultar o fluxo dessa substância por serem moléculas de menor difusão (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Dessa forma, as plantas de *E. crassipes* demonstraram capacidade para captar e armazenar mais CO₂ permitindo o aumento na taxa fotossintética.

A ausência de modificações na epiderme de ambas as faces da folha, na espessura do parênquima paliádico e esponjoso e na relação parênquima paliádico/parênquima esponjoso permitem verificar um correto desenvolvimento dos tecidos foliares de *E. crassipes* na presença de chumbo, não demonstrando sinais de toxidez. A menor distância entre os feixes vasculares observada pode ser relacionada com uma maior disponibilidade de tecidos vasculares nas folhas da planta, permitindo uma melhor condução de

água e nutrientes além de fotoassimilados, pois tais tecidos são diretamente relacionados com essas funções (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

A ausência de modificações na proporção de aerênquima radicular e na espessura da epiderme nas raízes demonstra que as plantas de *E. crassipes* não sofreram toxidez promovidas pelo chumbo. O aerênquima é um tecido fundamental para a fisiologia das raízes de plantas sujeitas à alagamento ou que crescem em ambientes aquáticos (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009) podendo aumentar em condições de estresse por alagamento em algumas espécies como o milho (PEREIRA et al., 2008; SOUZA et al., 2009). A EP pode ser uma barreira para a entrada e saída de substâncias na raiz (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009) e, é a primeira estrutura radicular a entrar em contato com a solução contaminada, e, como não sofreu efeitos do chumbo pode-se perceber que as concentrações aplicadas não promoveram efeitos tóxicos nesse tecido.

O sistema antioxidante foi mais eficiente e mais estimulado nas folhas em relação às raízes (exceto para a SOD na concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$) demonstrando uma maior necessidade dessas enzimas nesse órgão, relacionado com a proteção do sistema fotossintético. A estimulação do sistema antioxidante é uma resposta comum para as plantas de arroz na presença de chumbo (VERMA; DUBEY, 2003). Contudo, nas raízes de *E. crassipes* a ativação dessas enzimas não é tão eficiente, podendo ser associada com a necessidade das espécies reativas de oxigênio para a formação de aerênquima lisígeno, constitutivo da espécie, pois a geração de espécies reativas de oxigênio é importante nesse processo (GUNAWARDENA, 2008).

A capacidade de hiperacumulação dessa espécie para o chumbo é relatada na literatura (SCHOENHALS; OLIVEIRA; FOLLADOR, 2009), e que a acumulação desse metal ocorre principalmente nas raízes em detrimento da parte aérea (GONÇALVES JÚNIOR et al., 2008). A hiperacumulação do chumbo nas raízes pode ser interessante para a sobrevivência, pois esse é menos

translocado para a parte aérea e, dessa forma prejudica menos as folhas, fonte de fotoassimilados. A retenção de substâncias nas raízes pode estar relacionada com o espessamento demonstrado na endoderme e na exoderme, que constituem barreiras apoplásticas (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009), podendo reter o chumbo nas raízes, impedindo o fluxo para a parte aérea e, dessa forma conferindo uma característica de tolerância ao chumbo para *E. crassipes*.

O IVC está diretamente relacionado com a eficiência do sistema vascular, sendo que a sua redução pode ser relacionada a uma maior condutividade hidráulica nas raízes, relacionada com a redução da embolia e aumento no número de vasos, podendo se modificar em condições de estresse (CARLQUIST, 1975; PEREIRA et al., 2008; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; SOUZA et al., 2009). Dessa forma, as raízes de *E. crassipes* demonstraram capacidade para melhorar a condução de água e nutrientes, podendo fornecer nutrientes para a parte aérea e condições do desenvolvimento de novas folhas e plantas filhas, sendo um importante mecanismo de tolerância ao estresse. O aumento da espessura do floema nas raízes ilustra também um efeito do chumbo na capacidade de translocação de fotoassimilados, estando esse órgão diretamente relacionado com a condução dessas substâncias (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Dessa forma, mais fotoassimilados poderão chegar às raízes, permitindo um melhor desenvolvimento das plantas.

5 CONCLUSÃO

O aguapé é capaz de tolerar concentrações de chumbo de até 4,0 mg L⁻¹ sem prejuízos na estrutura anatômica e fisiológica. A presença de chumbo promoveu um aumento na taxa fotossintética do aguapé associada com modificações anatômicas e fisiológicas. A estrutura anatômica nas folhas favoreceu uma melhor captação e armazenamento de CO₂ e não demonstrou sinais de toxidez. A estrutura anatômica da raiz de aguapé não demonstrou sinais de toxidez e exibiu melhorias nas características do xilema e floema, além de melhoria nas barreiras apoplásticas, que podem ser importantes na retenção do chumbo no sistema radicular. O sistema antioxidante foi mais estimulado e as enzimas exibiram atividades mais altas nas folhas em relação às raízes.

REFERÊNCIAS

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.

CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. Berkeley: University of California, 1975. 259 p.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

DHANKHER, O. P. et al. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, n. 11, p. 1140-1145, Nov. 2002.

FAISAL, M.; HASNAIN, S. Synergistic removal of Cr (VI) by *Eichhornia crassipes* in conjunction with bacterial strains. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 6, n. 3, p. 264-268, Feb. 2003.

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

GONÇALVES JÚNIOR, A. C. et al. Remoção de metais pesados tóxicos cádmio, chumbo e cromo em biofertilizante suíno utilizando macrófita aquática (*Eichhornia crassipes*) como bioindicador. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 9-14, jan. 2008.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 53-64, Jan./Mar. 2005.

GRISI, F. A. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'Catuaí' e 'Siriema' submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, nov. 2008.

GUNAWARDENA, A. H. L. A. N. Programmed cell death and tissue remodelling in plants. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, n. 3, p. 445-451, Feb. 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 300 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 221 p.

MADHUSUDHAN, R. et al. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, n. 4, p. 550-557. Apr. 2003

MAHMOOD, Q. et al. Anatomical studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) under the influence of textile wastewater. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 6, n. 10, p. 991-998, Oct. 2005.

MONDARDO, E.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; SACON, E. Uso da macrófita aquática (*Eichhornia crassipes*) na remoção de cobre e zinco em biofertilizante de origem suína. **Ciência Agrônômica Engenharia**, Ponta Grossa, v. 12, n. 2, p. 13-20, ago. 2006.

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.

OLIVEIRA, J. A. et al. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 329-341, set./dez. 2001.

PEREIRA, F. J. et al. 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.

PINCHASOV, Y.; BERNER, T.; DUBINSKY, Z. The effect of lead on photosynthesis, as determined by photoacoustics in *Synechococcus leopoliensis* (Cyanobacteria). **Water, Air, and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 175, n. 1, p. 117-125, Feb. 2006.

SCHOENHALS, M.; OLIVEIRA, V. A.; FOLLADOR, F. A. C. Remoção de chumbo de efluente de indústria recicladora de baterias automotivas pela macrófita aquática *Eichhornia crassipes*. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, p. 55-72, maio/ago. 2009.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 35-52, Jan./Mar. 2005.

SNYDER, K. V. W. Removal of arsenic from drinking water by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). **Journal of United States Stockholm Junior Water Prize**, Stockholm, v. 1, n. 1, p. 41-58, Jan. 2006.

SOUZA, T. C. et al. Morpho-anatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil and Environment**, Czeck, v. 55, n. 11, p. 504-510, Nov. 2009.

STOEVA, N.; BINEVA, T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Sciences**, Sofia, v. 29, n. 1, p. 87-95, Jan. 2003.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alter the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Davis, v. 164, n. 4, p. 645-655, Apr. 2003.

WOLFF, G. et al. 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./mar. 2009.

ZHOU, Y. M.; HAN, S. J. Photosynthetic response and stomatal behaviour of *Pinus koraiensis* during the fourth year of exposure to elevated CO₂ concentration. **Photosynthetica**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 445-449, Sept. 2005.

ARTIGO 4: UM NOVO ÍNDICE DE FITORREMEDIAÇÃO PARA O MANEJO DE SISTEMAS AQUÁTICOS CONTAMINADOS POR ELEMENTOS TÓXICOS

RESUMO

Uma das consequências da poluição ambiental é a contaminação de solos e água com elementos tóxicos e essa contaminação vem aumentando com as atividades antropogênicas. São preocupantes as concentrações de arsênio, cádmio e chumbo liberadas no ambiente pelas indústrias e agricultura. A fitorremediação é uma tecnologia limpa e de baixo custo para remover esses elementos da água e do solo. Um desafio na fitorremediação é estimar o tempo necessário para remover os elementos tóxicos do sistema. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo propor a utilização de um índice de fitorremediação como um modelo matemático para o manejo do sistema, estimando o tempo necessário para atingir a fitorremediação. O modelo foi testado em plantas de alface d'água cultivadas em solução nutritiva com cinco concentrações de arsênio, cádmio e chumbo. O índice de fitorremediação foi capaz de detectar as diferenças entre os tratamentos e de prever o tempo necessário para manter o sistema até a completa remoção dos elementos tóxicos, com alta correlação entre o índice de fitorremediação, o modelo matemático para prever o tempo para a fitorremediação e os tratamentos. Dessa forma, o índice de fitorremediação pode ser uma ferramenta útil em pesquisas e no manejo de sistemas contaminados por elementos tóxicos.

Palavras-chave: *Pistia stratiotes*. Índice fisiológico. Arsênio. Cádmio. Chumbo.

ABSTRACT

One of the consequences of environmental pollution is the toxic elements contamination of soils and water, and these are increasing with anthropogenic activities. Of concern are the concentrations of elements such as arsenic, cadmium and lead released in environment by industry and agriculture. Phytoremediation is a low cost and clean technology to remove these elements from water and soil. A challenging task in phytoremediation is due to estimate the time need to remove the all the toxic elements from the system. In that context, this work aimed to propose the use of a phytoremediation index as a mathematical model to handle the system, predicting the time need to arrive phytoremediation. The model was tested in *Pistia stratiotes* plants, growing in Hoagland nutrient solution with five concentrations of arsenic, cadmium and lead. The phytoremediation index was able to detect the differences between the treatments as well to predict the time need to maintain the system, until the complete removal of toxic elements, with high significance correlations between the phytoremediation index, the mathematical model and the treatments. Therefore, the phytoremediation index can be a useful tool on the research and handle of water systems contaminated by toxic elements.

Keywords: *Pistia stratiotes*. Physiological index. Arsenic. Cadmium. Lead.

1 INTRODUÇÃO

O acúmulo de elementos tóxicos no ambiente vem se tornando um problema que afeta todo o mundo. Esse acúmulo promove reduções na produtividade das culturas ou podem se acumular ao longo das cadeias tróficas, gerando problemas em diferentes níveis. Esses elementos podem se acumular em solos ou em ambiente aquático decorrentes de atividades como: mineração, indústria de celulose, indústrias de tintas, fertilizantes agrícolas e mesmo de emissões atmosféricas (GRATÃO et al., 2005).

Alguns elementos são frequentemente relatados como tóxicos, dentre esses se destacam o cádmio (BENAVIDES; GALLEGOS; TOMARO, 2005), o chumbo (SHARMA; DUBEY, 2005) e arsênio (DHANKHER et al., 2002), que podem causar prejuízos à fisiologia de plantas e animais, sendo a sua remoção de ambientes aquáticos ou terrestres de extremo interesse ambiental. Essa remoção pode ser realizada por plantas hiperacumuladoras pelo processo de fitorremediação (GRATÃO et al., 2005).

Algumas espécies são relatadas como potenciais para a fitorremediação, incluindo muitas macrófitas aquáticas, com capacidade para a hiperacumulação dos metais em sua biomassa. Dentre essas espécies, encontra-se o alface d'água (*Pistia stratiotes*) uma macrófita aquática com grande potencial para a fitorremediação em regiões tropicais (FONKOU et al., 2002).

Questões primordiais a serem entendidas nesses sistemas podem ser relacionadas com o potencial da planta para a hiperacumulação dos metais, sua tolerância aos diferentes níveis de contaminação e, principalmente, quanto tempo essas plantas devem permanecer no sistema para deixar a concentração dos metais em condições aceitáveis. Esses questionamentos são difíceis de responder, e, tentativas de modelar o crescimento das plantas em efluentes contaminados vem sendo testadas, como o modelo de Kumar, Dube e Rai (2005)

que ajusta o crescimento das plantas de *Eichhornia crassipes* baseado em características físico-químicas do efluente. Um modelo utilizando como base o modelo de transporte de solutos foi proposto para a fitoextração de zinco por plantas de *Thlaspi caerulescens*, sendo ajustado para determinadas condições de solo e podendo ser aplicado para a identificação de áreas onde a fitoextração é comercialmente viável (WHITING et al., 2003).

A utilização de modelos e índices que representam fenômenos fisiológicos nas plantas vem, ao longo dos anos, sendo estabelecidos e auxiliam no manejo das plantas. A taxa de crescimento relativo é um dos índices fisiológicos mais utilizados, introduzido por Blackman (1919), podendo ser aplicado no manejo de espécies e em estudos ecológicos, explicando fenômenos como distribuição e seleção das espécies no ambiente (PUGNAIRE; VALLADARES, 2007). Modelos que expliquem a fitoextração em plantas hiperacumuladoras são uma demanda atual, como o proposto por Gonelli et al. (2000), que utilizaram espécies terrestres e o modelo para definir um limite para a acumulação de níquel nas plantas, dependente do crescimento das mesmas.

Uma questão que deve ser trabalhada é o tempo necessário para remover o elemento tóxico de um sistema aquático, ou seja, quanto tempo deve-se deixar as plantas na solução para que esta atinja níveis aceitáveis do elemento. Até o momento não há propostas de índices ou modelos abrangentes para resolver essa questão. Dessa forma esse trabalho teve como objetivo propor um índice de fitorremediação que possa auxiliar nessa questão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 O modelo

O índice de fitorremediação foi deduzido assumindo-se que o acúmulo do elemento tóxico na planta é dependente e proporcional ao crescimento (acúmulo de biomassa), que o acúmulo de elementos tóxicos é proporcional ao tempo de exposição e que o crescimento limita a capacidade de fitoextração da planta.

Considerando-se a taxa de crescimento relativo (TCR) como demonstrado na Eq. 1, onde P1 e P2 representam as massas secas em gramas e T representa o tempo em dias. Essa equação é a que define o crescimento das plantas da forma mais aplicada possível considerando-se o ganho em massa em função do tempo e da massa inicial, como descrito por Blackman (1919).

$$\text{TCR} = \frac{\ln P2 - \ln P1}{dT} \quad \text{Eq. 1}$$

O acúmulo do elemento tóxico na planta é expresso, na maioria dos trabalhos na forma de teor, que representa a quantidade de massa do metal em gramas ou miligramas (Mm) dividida pela quantidade de massa seca da planta em gramas (ms) como mostrado na Eq. 2.

$$\text{Teor do metal pesado} = \frac{Mm}{ms} \quad \text{Eq. 2}$$

O teor de metal é diretamente proporcional ao crescimento da planta por ser relacionado com a massa seca e dependente do crescimento, que, se limitado inibe a bioacumulação. Dessa forma, uma relação direta pode ser estabelecida multiplicando-se o TCR pelo teor do elemento tóxico, obtendo-se a relação da

Eq. 3 desde que esses estejam nas mesmas unidades (g g^{-1} para o teor e g dia^{-1} para o TCR). Essa relação pode ser definida como aproximadamente constante para condições específicas do sistema, com uma mesma concentração inicial de metal e , considerando-se o sistema homogêneo. Essa relação pode ser considerada como um índice de fitorremediação (IF), e pode ser entendida como a capacidade da planta de remover uma determinada quantidade de elemento tóxico em relação ao tempo, dependente do crescimento dessa planta no sistema específico.

$$\text{IF} = \text{TCR} \cdot \text{teor de metal} = \text{g/t} * \text{g/g} = \text{g/t} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde g = gramas e t = tempo em dias

Com a relação estabelecida pelo IF (g/t) pode-se simplesmente converter a massa do elemento para moles dividindo-se a massa do elemento obtida no teor pelo peso molecular desse elemento, e, dessa forma, estimar quantos moles são removidos da solução por dia de exposição, relacionado com o crescimento da planta Eq. 4.

$$\text{Teor} = \text{Mm/ms} = (\text{Mm/PM})/\text{ms} = \text{mol dia}^{-1} \quad \text{Eq. 4}$$

A idéia que o IF pode ser calculado com base na fitoextração molar representada pela Eq. 4, indicando quanto tempo será necessário que as plantas fiquem em contato com o sistema para remover uma quantidade desejada em moles do elemento. Esse tempo pode simplesmente ser dividido pelo número de plantas introduzidas no sistema para estimar a quantidade de moles removidos ou o tempo necessário para remover uma determinada quantidade do metal. Dessa forma, a fitorremediação em dias (FT) pode ser definida como

demonstrado na Eq. 5, sendo C a quantidade em moles do metal na solução que deve ser removida para ficar em níveis aceitáveis, IF o índice de fitorremediação e Np o número de plantas a serem colocadas no sistema. A proposta é que a Eq. 5 pode ser utilizada para determinar quanto tempo as plantas devem ser mantidas no sistema para que a fitorremediação atinja os níveis desejados, definindo o tempo, em dias para que esse processo ocorra.

$$FT = (C/IF)/Np \quad \text{Eq.5}$$

2.2 Teste do modelo

O experimento foi realizado em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas plantas de *Pistia stratiotes* (alface d'água) aclimatizadas em casa de vegetação por um período de 30 dias, sendo selecionadas as plantas filhas, completamente desenvolvidas com o mesmo tamanho e biomassa. As plantas foram introduzidas em solução de Hoagland com 40% da força iônica. Com as concentrações de nutrientes: N-NH₄⁺ = 10,5 mg L⁻¹; N-NO₃⁻ = 10,5 mg L⁻¹; K = 23 mg L⁻¹; Ca = 20 mg L⁻¹; Mg = 5,9 mg L⁻¹; Fe = 0,6 mg L⁻¹; H₃BO₃ = 2,68 mg L⁻¹; MnCl₂ 4H₂O = 1,81 g L⁻¹; ZnSO₄ 7H₂O = 0,22 g L⁻¹; CuSO₄ 5H₂O = 0,08 g L⁻¹; H₂Mo₂ 4H₂O = 0,02 g L⁻¹ (WOLFF et al., 2009).

As plantas foram submetidas a cinco concentrações diferentes dos metais pesados: cádmio (Cd), arsênio (As) e Chumbo (Pb), sendo que as concentrações foram determinadas de acordo com os limites estabelecidos pela Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (WOLFF et al., 2009). As concentrações foram: 0,0; 0,25; 0,50, 1,00 e 2,00 mg L⁻¹ para o arsênio, 0,0; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg L⁻¹ para o cádmio e para o chumbo 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹, sendo aplicadas em vasos plásticos com capacidade de 4 L. As plantas

foram cultivadas por um período de 20 dias sendo posteriormente secas em estufa de circulação forçada à 70 °C até peso constante. As plantas foram pesadas em balança analítica para a obtenção da massa seca e posteriormente trituradas em moinho tipo Willey com peneira de malha de 0,38 mm. O material foi submetido à digestão ácida em solução de ácido nítrico e ácido perclórico em bloco digestor com forno ajustado para 400 °C, posteriormente sendo analisado o teor de Cd, As e Pb por espectrofotometria de absorção atômica (WOLFF et al., 2009).

O TCR foi calculado segundo Blackman (1919) pela Eq. 1 e o IF e o cálculo da fitorremediação (em dias) segundo as Eq. 3 e Eq. 5. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições e cinco concentrações por metal, independentemente. Os resultados foram submetidos à anava e a comparação das médias com o teste de Scott-Knott à $P < 0,05$. Foram realizados os testes de Shapiro-Wilk para a normalidade e de Lavene para a homocedasticidade para $P < 0,05\%$ e as matrizes de correlação para $P < 0,05\%$. Foi utilizado o software estatístico R para a análise dos dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que o IF pode ser aplicado às amostras, sendo possível identificar as diferenças entre os tratamentos como ilustrado na Tabela 1. A correlação o do IF com os tratamentos a 5% de probabilidade foi de 94% para o arsênio, 93% para o cádmio e de 95% para o chumbo, ilustrando a relação positiva do IF com os tratamentos. Os valores do IF foram diferentes para as diferentes concentrações, separando os tratamentos de acordo com seu efeito (Tabela 1). Esses fatos, associados a testes positivos para a distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk, 5%) e para a homocedasticidade (Lavene, 5%) demonstram a aplicabilidade dos dados gerados pelo IF podendo ser utilizado

em experimentos que utilizem a anava como forma de avaliação dos dados e permitindo a discriminação dos tratamentos.

Tabela 1 Efeito de três metais pesados em diferentes concentrações na taxa de crescimento relativo (TCR), teor de elemento tóxico na planta, índice de fitorremediação (IF) e dias para a fitorremediação da solução (FT)

Arsênio					
mg L ⁻¹	TCR g dia ⁻¹	Teor g g ⁻¹	IF g dia ⁻¹	FT dias	
0,00	0,104 a	0,000003 e	0,000000 e	0,00 e	
0,25	0,102 a	0,001800 d	0,000184 d	5,60 d	
0,50	0,104 a	0,002290 c	0,000236 c	8,53 c	
1,00	0,102 a	0,002818 b	0,000287 b	14,21 b	
2,00	0,111 a	0,003460 a	0,000382 a	21,25 a	
Cádmio					
mg L ⁻¹	TCR g dia ⁻¹	Teor g g ⁻¹	IF g dia ⁻¹	FT dias	
0,00	0,120 a	0,000003 e	0,000000 e	0,00 e	
0,40	0,105 a	0,001837 d	0,000193 d	8,47 d	
0,80	0,109 a	0,002337 c	0,000255 c	12,69 c	
1,60	0,095 b	0,003039 b	0,000288 b	22,43 b	
3,20	0,093 b	0,003931 a	0,000365 a	35,41 a	
Chumbo					
mg L ⁻¹	TCR g dia ⁻¹	Teor g g ⁻¹	IF g dia ⁻¹	FT dias	
0,00	0,093 a	0,000004 e	0,000000 e	0,00 e	
0,50	0,095 a	0,000795 d	0,000076 d	26,61 d	
1,00	0,095 a	0,001290 c	0,000122 c	33,13 c	
2,00	0,094 a	0,002498 b	0,000236 b	34,70 b	
4,00	0,082 a	0,004792 a	0,000394 a	41,32 a	

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%)

Os dados da Tabela 1 demonstram que o IF e FT possuem grande potencial para a aplicação em experimentos, pois os resultados foram coerentes para as diferentes concentrações, demonstrando que as maiores concentrações dos elementos tóxicos refletiram em maiores teores do elemento na planta com correlação de 93% para o arsênio, 97% para o cádmio e 95% para o chumbo. O

IF permitiu verificar diferenças na velocidade de remoção dos elementos tóxicos da solução em função das maiores concentrações sendo que a correlação do IF com as diferentes concentrações (tratamentos) foi de 86% para o arsênio, 97% para o cádmio e 97% para o chumbo. Dessa forma, os dados gerados pelo IF e FT podem ser aplicados em experimentos para a aquisição de conhecimento científico, uma das principais funções atribuídas à descrições matemáticas de um sistema (DOURADO NETO et al., 1998). Os valores diferentes para os diferentes elementos tóxicos permitem inferir uma resposta específica para IF, podendo ser potencial para estudos da cinética da absorção, uma vez que o IF permite inferir diferentes velocidades de absorção do elemento para os diferentes elementos estudados, discriminando-os (Tabela 1).

O FT demonstrou uma simulação satisfatória do tempo estimado para a fitorremediação das soluções em todos os elementos tóxicos testados no experimento. A análise dos dados da Tabela 1 permite verificar que o tempo necessário para a remoção total dos elementos tóxicos na solução foi crescente em decorrência do aumento das concentrações desses elementos. O aumento do tempo foi, em parte, amenizado pelo aumento no IF observado nas concentrações maiores. Esse fato resultou em valores proporcionais e que descrevem de forma coerente a fitorremediação nas condições do experimento, pois se a velocidade de absorção fosse a mesma em todos os tratamentos (estimada pelo IF) o tempo nas concentrações maiores seria muito maior do que o real, e esse erro poderia superestimar o tempo. Esse fato foi corrigido pelo IF, demonstrando a utilidade desse índice na simulação do tempo para a fitorremediação. A correlação do FT com os tratamentos foi significativa em todos os metais (97% para o arsênio e cádmio e 86% para o chumbo) e também a correlação do FT com o IF (86, 85 e 72% para o arsênio, cádmio e chumbo, respectivamente).

Os valores obtidos para o acúmulo dos elementos tóxicos nas plantas (Tabela 2) correspondem a valores próximos aos estimados pelo FT. Dessa forma, os valores em dias para a fitorremediação podem estar muito próximos dos reais. Os valores obtidos para o acúmulo de metais nas plantas podem ser relacionados com o volume total da solução (4 L) portanto, a concentração total a ser removida pode ser o da concentração molar do tratamento multiplicada pelo volume. Como exemplo, observa-se que o valor total de arsênio no tratamento com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ no volume de 4 L de solução é de 2 mg, esse valor foi exatamente o encontrado para o acúmulo dessas plantas no período (2,04 mg) como pode ser observado na Tabela 2 fato que permite inferir a aplicabilidade do FT, pois, o tempo previsto para absorver todo esse conteúdo foi de 8,53 dias (Tabela 1) e, como o período experimental foi superior (15 dias) observa-se que o FT estimou de forma satisfatória a fitorremediação. Esse fato se repete nos demais tratamentos, podendo sofrer algumas variações decorrentes de fatores do experimento como a troca de solução (necessária, devido à evapotranspiração) e da perda de folhas ao longo do período (que pode retornar parte do elemento já absorvido). Dessa forma, o FT demonstra ser um bom estimador para o tempo necessário à fitorremediação, podendo ser utilizado no manejo de sistemas onde a fitorremediação é necessária. Esse fato comprova a capacidade de simulação do FT, fato necessário e inerente de um bom modelo (DOURADO NETO et al., 1998).

Tabela 2 Acúmulos totais de elementos tóxicos em plantas de *Pistia stratiotes* ao longo do período experimental (15 dias) com uma troca de solução aos 7 dias

As (mg L ⁻¹)	acúmulo (mg)	Cd (mg L ⁻¹)	acúmulo (mg)	Pb (mg L ⁻¹)	acúmulo (mg)
0,00	0,004	0,00	0,005976	0,00	0,004280
0,25	1,436	0,40	2,066519	0,50	0,662743
0,50	2,041	0,80	2,736926	1,00	1,067847
1,00	2,728	1,60	3,016663	2,00	2,231107
2,00	4,641	3,20	4,026868	4,00	2,977696

4 CONCLUSÃO

O IF demonstra ser aplicável e útil como um índice fisiológico para a fitorremediação. O IF ilustra das diferenças entre tratamentos e condições ambientais, gerando valores proporcionais às concentrações de metais e diferentes para cada metal. O FT possui capacidade de simulação e gera dados coerentes, permitindo estimar o tempo em dias para a fitorremediação do sistema.

REFERÊNCIAS

BENAVIDES, M. P.; GALLEGOS, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 21-34, Jan./Mar. 2005.

BLACKMAN, V. H. The compound interest law in plant growth. **Annals of Botany**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 353-360, July 1919.

DHANKHER, O. P. et al. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, n. 11, p. 1140-1145, Nov. 2002.

DOURADO NETO, D. et al. Principles of crop modeling and simulation: I. uses of mathematical models in agricultural science. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 46-50, Aug. 1998.

FONKOU, T. et al. Potentials of water lettuce (*Pistia stratiotes*) in domestic sewage treatment with macrophytic lagoon systems in Cameroon. **Proceedings of International Symposium on Environmental Pollution Control and Waste Management**, Tunis, v. 7, n. 10, p. 709-714, Jan. 2002.

GONELLI, C. et al. Assessing plant phytoextraction potential through mathematical modeling. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 2, n. 4, p. 343-351, Dec. 2000.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 53-64, Jan./Mar. 2005.

KUMAR, S.; DUBE, K. K.; RAI, J. P. N. Mathematical model for phytoremediation of pulp and paper industry wastewater. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New York, v. 64, n. 1, p. 717-721, Jan. 2005.

PUGNAIRE, F. I.; VALLADARES, F. **Functional plant ecology**. London: CRC, 2007. 724 p.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 35-52, Jan./Mar. 2005.

WHITING, S. N.; BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J. Applying a solute transfer model to phytoextraction: zinc acquisition by *Thlaspi caerulescens*. **Plant and Soil**, Crawley, v. 249, n. 1, p. 45–56, Jan. 2003.

WOLFF, G. et al. 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./mar. 2009.