



**POTENCIAL FITORREMEIADOR de  
*Brachiaria arrecta*: MODIFICAÇÕES NAS  
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E  
FISIOLÓGICAS NA PRESENÇA DE ARSÊNIO E  
CÁDMIO**

**LAVRAS – MG  
2011**

**JOÃO ANTÔNIO ARGENTA**

**POTENCIAL FITORREMEIADOR de *Brachiaria arrecta*:  
MODIFICAÇÕES NAS CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E  
FISIOLÓGICAS NA PRESENÇA DE ARSÊNIO E CÁDMIO**

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

Dr. Moacir Pasqual  
Orientador

Dr. Evaristo Mauro de Castro  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2011**

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

Argenta, João Antônio.

Potencial fitorremediador de *Brachiaria arrecta* : modificações nas características anatômicas e fisiológicas na presença de arsênio e cádmio / João Antônio Argenta. – Lavras : UFLA, 2011.

95 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Fitorremediação. 2. Anatomia vegetal. 3. Metais pesados. 4. Fisiologia vegetal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.2

**JOÃO ANTÔNIO ARGENTA**

**POTENCIAL FITORREMEIADOR de *Brachiaria arrecta*:  
MODIFICAÇÕES NAS CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E  
FISIOLÓGICAS NA PRESENÇA DE ARSÊNIO E CÁDMIO**

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

APROVADA EM 05 de dezembro de 2011

Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr. Fabrício José Pereira	UFLA
Dr. Itamar Ferreira de Souza	UFLA
Dr. Francisco Dias Nogueira	EPAMIG

Dr. Moacir Pasqual  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2011**

*A minha família em especial a minha esposa Christiane e aos meus filhos Luiz  
Felipe e Anna Caroline.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida.

Aos meus pais Alda e Luiz (*in memoriam*), a minha esposa Christiane, aos meus filhos Luiz Felipe e Anna Caroline.

As minhas irmãs Tânia e Leda e aos meus cunhados Luiz e Érico e as suas famílias.

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Pasqual e ao meu coorientador Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro pelo apoio, confiança e oportunidade.

À UFLA e em especial ao programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, aos professores e funcionários.

Ao Prof. Dr. Fabrício José Pereira e a colega doutoranda Cynthia pelo auxílio neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia vegetal e em especial a colega Marines pelo auxílio.

À Direção e funcionários do Unilavras.

Ao Sr. Paulo Roberto M. Carvalho, Gerente Geral do Consórcio AHE Funil.

## RESUMO

Elementos tóxicos são depositados no ambiente por atividades antrópicas em crescentes quantidades. Técnicas para a remoção desses, como a fitorremediação, necessitam do conhecimento de diferentes espécies tolerantes a esses elementos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características anatômicas foliares e radiculares, as características de trocas gasosas, de crescimento e desenvolvimento, e a obtenção da quantificação de DNA em plantas de *Brachiaria arrecta* sob diferentes concentrações de arsênio (As) e cádmio (Cd), visando à detecção de mecanismos que proporcionem a tolerância dessa espécie a estes poluentes, possibilitando a indicação desta espécie para programas de fitorremediação de efluentes contaminados por estes metais pesados. As plantas de *B. arrecta* foram cultivadas em casa de vegetação por 60 dias para reprodução clonal. Os clones foram cultivados em solução nutritiva de Hoagland contendo arsênio e cádmio nas concentrações de 0,0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> de As e 0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Após 21 dias de experimento foram coletadas as folhas das plantas para a realização de análises anatômicas, quantificação de DNA e as análises de crescimento. As análises para avaliação da quantidade de DNA foram realizadas no 18º dia após a instalação do experimento. O delineamento utilizado foi **DIC**, com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott com  $p < 0,05$ . Devido ao fato da planta apresentar plasticidade anatômica e fisiológica por meio das modificações induzidas no ambiente, a espécie *B. arrecta* demonstrou potencial para aplicação em programas de biorremediação de ambientes contaminados com As, devido à tolerância a este contaminante. Por apresentar sintomas de toxicidade nas maiores concentrações de Cd testadas, a espécie pode ser considerada como bioindicadora da poluição por Cd. Possui também plasticidade por meio das modificações anatômicas, e menos sensibilidade nas concentrações maiores de Cd testadas, mas não suficientes para causar a senescência e morte das plantas. A espécie *B. arrecta* demonstra potencial para aplicação em programas de extração de Cd de ambientes aquáticos.

[U1] Comentário: Favor colocar o significado da sigla entre parênteses

Palavras-chave: *Brachiaria arrecta*. Fitorremediação. Cádmio. Arsênio.

## GENERAL ABSTRACT

Toxic elements are deposited in the environment by human activities in increasing amounts. Techniques for the removal of these, such as phytoremediation, require knowledge of different species tolerant to these elements. This study had as objective to evaluate the leaf and root anatomical features, the characteristics of gas exchange, growth and development and to achieve quantification of DNA in plants of *Brachiaria arrecta* under different concentrations of arsenic (As) and cadmium (Cd), aiming at the detection mechanisms that provide tolerance of this species to these pollutants, providing an indication of this species in phytoremediation programs effluent contaminated by these heavy metals. The plants of *B. arrecta* were grown in a greenhouse for 60 days for clonal reproduction. The clones were grown in Hoagland nutrient solution containing arsenic and cadmium in concentrations of 0,0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 and 4,0 mg L<sup>-1</sup> of As and 0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 and 6,4 mg L<sup>-1</sup> of Cd. After 21 days of the experiment leaves were collected from plants for their anatomical analysis, DNA quantification and analysis of growth. The tests for the amount of DNA were performed on the 18th day after the experiment. The experimental was completely randomized design with six replicates. The data were subjected to analysis of variance and the Scott-Knott test with  $p < 0.05$ . Due the plant to have anatomical and physiological plasticity by the changes induced to the environment, the species *B. arrecta* demonstrated potential for application in bioremediation programs of environments contaminated with As, due the tolerance to this contaminant. For symptoms of toxicity at the highest concentrations of Cd tested, the species can be considered as bioindicators of pollution by Cd. It also has plasticity by means of anatomical changes, and less sensitivity in higher concentrations of Cd tested, but not sufficient to cause senescence and death of plants. The species *B. arrecta* shows potential for application programs to extract Cd from aquatic environments.

[U2] Comentário: DIC, favor conferir

Keywords: *Brachiaria arrecta*. Phytoremediation. Cadmium. Arsenic.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<i>Brachiaria arrecta</i> : características morfológicas .....	13
<b>2.2</b>	Macrófitas aquáticas .....	16
<b>2.3</b>	Poluição no meio aquático por metais pesados .....	16
<b>2.3.1</b>	Arsênio (As) .....	18
<b>2.3.2</b>	Cádmio (Cd) .....	20
<b>2.4</b>	Fitorremediação .....	21
<b>2.5</b>	Estrutura e funcionalidade das plantas fitorremediadoras .....	23
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	35
	<b>ARTIGO 1</b> Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de braquiária do brejo ( <i>Brachiaria arrecta</i> (Hack.) Stent.), para a tolerância à contaminação por arsênio (As) .....	36
	<b>RESUMO</b> .....	37
	<b>ABSTRACT</b> .....	38
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>2.1</b>	Coleta do material vegetal .....	42
<b>2.2</b>	Montagem dos experimentos .....	43
<b>2.3</b>	Análises anatômicas .....	44
<b>2.4</b>	Análises fotossintéticas e de crescimento .....	45
<b>2.5</b>	Citometria de fluxo .....	46
<b>2.6</b>	Análise estatística .....	47
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48

3.1	Análises anatômicas e de trocas gasosas .....	48
3.2	Análises de crescimento .....	59
3.3	Análise do conteúdo de DNA nuclear .....	61
4	CONCLUSÃO .....	63
	REFERÊNCIAS .....	64
	ARTIGO 2 Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de braquiária do brejo ( <i>Brachiaria arrecta</i> (Hack.) Stent.), para a tolerância à contaminação por cádmio (Cd).....	67
	RESUMO .....	68
	ABSTRACT .....	69
1	INTRODUÇÃO .....	70
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	72
2.1	Coleta do material vegetal .....	72
2.2	Montagem dos experimentos .....	72
2.3	Análises anatômicas .....	74
2.4	Análises fotossintéticas e de crescimento .....	75
2.5	Análise estatística .....	76
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	77
3.1	Análises anatômicas .....	77
3.2	Trocas gasosas e análise de crescimento .....	87
4	CONCLUSÃO .....	91
	REFERÊNCIAS .....	92

**PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

A destruição da cobertura vegetal em áreas contaminadas por elementos tóxicos agrava a degradação do solo, promovendo erosão hídrica e a lixiviação dos contaminantes para o lençol freático e cursos de água, desencadeando progressivo grau de contaminação de outras áreas.

Solos e águas contaminadas por metais pesados exigem agente remediador, que diminua os teores desses poluentes a níveis ambientalmente seguros. A fitorremediação utiliza plantas capazes de sobreviver e acumular elevados teores de metais pesados nos seus tecidos. Em razão do seu baixo custo, a técnica tem grande potencial para remediação *in situ* em grandes áreas com baixo ou médio nível de contaminação (PILON-SMITS, 2005).

Visando desenvolver uma solução ambiental tecnologicamente sustentável, eficiente e viável economicamente para a recuperação de áreas contaminadas, a fitorremediação tem sido amplamente estudada no mundo inteiro. Entretanto, para que a fitorremediação possa ser aplicada no Brasil, é fundamental o estudo de espécies com potencial para uso nas condições e tipo de contaminações encontradas no país.

Trabalhos realizados pela linha de pesquisa em Fitorremediação com o uso de macrófitas aquáticas da UFLA têm apresentado diferentes respostas relacionadas às modificações estruturais e de funcionalidade em diversas espécies, quando submetidas à contaminação por metais pesados, tornado-se necessário testar o comportamento de cada espécie ao efeito dos contaminantes.

A espécie *Brachiaria arrecta* é amplamente difundida e encontrada na nossa região Sudeste do Brasil, apresenta características desejáveis para ser utilizado na fitorremediação, pelo seu rápido crescimento, grande volume de massa e adaptação tanto em solo quanto no meio aquático.

Para que a fitorremediação possa ser aplicada no Brasil, é fundamental o estudo dos fatores componentes desta técnica, a fim de ser utilizada como solução tecnológica que atenda à legislação ambiental.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial fitorremediador de plantas de *Brachiaria arrecta* expostas a diferentes concentrações de arsênio e cádmio e verificar as modificações anatômicas e fisiológicas, visando conhecer a plasticidade morfológica em função dos níveis de contaminação aos quais foram submetidas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Brachiaria arrecta*: características morfológicas

Dentro das macrófitas aquáticas, a espécie *Brachiaria arrecta* (Hack.) Stent., é conhecida popularmente na região de Lavras-MG como braquiária do brejo (Figura 1), ou internacionalmente como capim Tanner-Grass. Espécie da família Poaceae, tem hábito de crescimento herbáceo, perene, estolonífera, multiplicada facilmente por via vegetativa sendo mínima a reprodução por sementes. A planta apresenta hastes de 1,20 m ou mais de comprimento, sub-ereta, fortemente radicante nos nós inferiores. As folhas são lanceoladas, de base cordiforme, com 70-150 mm de comprimento e 12-25 mm de largura, brilhante, de aspecto suculento e cor verde escura. A inflorescência é formada por 6-12 racemos, sendo os basais de 40-80 mm de largura. As espiguetas são sub-sésseis, ovaladas com 4 mm de comprimento, glabras e bisseriadas ao longo da ráquis. Os nós são de cor verde amarelada, salientes, glabros e quando em contato com o solo e/ou água emitem raízes. As sementes são inférteis, e a ráquis é destituída de tricomas (KISSMANN, 1991).



Figura 1 *Brachiaria arrecta* na represa do Funil em Lavras-MG, fevereiro 2011

A *Brachiaria arrecta* é espécie de origem africana, introduzida para fins de pastagens, porém pelo seu baixo valor proteico e por conter maiores teores de taninos é uma forrageira que foi descartada para tal finalidade. Atualmente é considerada infestante, adaptando-se com grande facilidade às áreas alagadas e em cursos de água. Em função disso, está apresentando sérios problemas de infestações na Represa do Funil em Lavras, Minas Gerais e segundo Tanaka et al. (2002) também em outros reservatórios de água no Brasil. Esta espécie causa empecilho nas grades de contenção das turbinas, prejudicando a produção de energia e obrigando as empresas responsáveis a investir na retirada desta planta dos reservatórios.

Estudo sobre esta espécie vegetal também foi realizado e citado por Martins et al. (2003), que analisaram a composição química de plantas aquáticas

encontradas no reservatório de Salto Grande-SP, onde as amostras da espécie *B. arrecta* coletadas apresentaram os menores teores de macro e micronutrientes e o maior teor médio de elementos químicos pesados na matéria seca, em relação às demais espécies aquáticas estudadas, demonstrando o possível potencial fitoextrator.

Silva e Vidal (2010) detectaram teores foliares de contaminantes metálicos (Fe, Zn e Cu) em plantas cultivadas de *Brachiaria arrecta* em aterros provenientes da atividade de mineração, em comparação com aquelas coletadas fora da área do aterro.

Em estudos desenvolvidos por Calijuri et al. (2009) esta mesma espécie vegetal constituiu-se em boa opção para pós-tratamento de efluentes anaeróbios em esgoto sanitário pois comprovadamente apresentou elevada capacidade de remoção de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos, assim como de nutrientes e de organismos indicadores de contaminação o que demonstra o potencial da espécie para a fitorremediação no tratamento de águas contaminadas.

Há necessidade de estudar novas plantas acumuladoras que sejam viáveis para a fitorremediação em diferentes climas, por isso é necessário encontrar e conhecer novas espécies de plantas acumuladoras para uso em diferentes condições (CHEHREGANI et al., 2009).

As plantas aquáticas são também utilizadas como bioindicadores de qualidade da água. Valitutto et al. (2007), que estudaram quatro espécies vegetais aquáticas flutuantes (*S. auriculata*, *P. stratiotes*, *E. crassipes* e *E. azurea*), os resultados mostram que todos os elementos estudados são acumulados pelas plantas aquáticas, como o Cu, Mo e Pb entre outros, demonstrando o grande potencial destas espécies para o uso na fitorremediação.

## 2.2 Macrófitas aquáticas

Ainda há várias controvérsias em relação à definição e o conceito de plantas ou macrófitas aquáticas, com uma extensa variação entre os diferentes autores (POTT; POTT, 2000), essas também podem ser chamadas de macrófitas aquáticas ou hidrófitas.

Segundo Fasset (1996) e Irgan e Gastal Júnior (1996) o conceito ideal de macrófitas aquáticas é o que atribui a característica de plantas com as partes fotossinteticamente ativas expostas a flutuação em ambiente aquático permanentemente ou por alguns períodos do ano, sendo visíveis a olho nu.

Ainda segundo Irgan e Gastal Júnior (1996) as plantas encontradas nas margens dos ambientes aquáticos, denominadas emergentes, também são consideradas macrófitas aquáticas.

Estas plantas possuem grande importância ao meio ambiente, especialmente nos ecossistemas aquáticos, por fornecerem a base da cadeia alimentar e podem ser consideradas a peça chave no ciclo de nutrientes em ambientes aquáticos e inundáveis pelo seu papel ecológico como base para o tratamento de água poluída, sua relação com os microrganismos associados às raízes, os quais degradam moléculas orgânicas enquanto outras plantas absorvem os produtos da decomposição. Há necessidade de se conhecer as plantas aquáticas, tanto pela importância econômica como pelo seu papel na conservação da natureza como plantas despoluidoras (POTT; POTT, 2000).

## 2.3 Poluição no meio aquático por metais pesados

A água é um dos recursos naturais mais utilizados pelos seres vivos. É fundamental para a existência e a **manutenção** da vida, para isso deve estar presente no ambiente em quantidade e qualidade apropriada. Segundo Braga et

[U3] Comentário: Sugiro: conservação

al. (2005) a demanda de água pelo homem pode superar a oferta, seja em termos quantitativos, seja por que a qualidade da água local está prejudicada devido à poluição ambiental. Esta degradação pode afetar a oferta de água e também poderá gerar graves problemas de desequilíbrio ambiental. Ainda segundo o mesmo autor, é importante distinguir a diferença entre poluição e contaminação, sendo a poluição associada ao uso que se faz da água e a contaminação refere-se à transmissão de substâncias ou microrganismos nocivos à saúde pela água, não implicando necessariamente num desequilíbrio ecológico.

Segundo Rocha et al. (2006), as previsões de escassez de água para o uso humano e o declínio das espécies aquáticas têm despertado atenção de pesquisadores para a conservação e recuperação dos recursos hídricos, sendo que à medida que a economia e a população crescem necessita mais água para suas atividades e aumentando com isso a responsabilidades dos técnicos, biólogos, agrônomos e engenheiros sobre a sustentabilidade deste recurso ambiental.

**[U4] Comentário:** Sugiro que reescreva a sentença, pois há incoerência textual

Entre os poluentes do meio aquático estão os metais que podem ser solubilizados pela água, podendo gerar danos à saúde em função da quantidade ingerida, pela sua toxicidade ou de seus potenciais carcinogênicos, mutagênicos ou teratogênicos. São exemplos de metais tóxicos o arsênio, o bário, o cádmio, o cromo, o chumbo e o mercúrio, podendo estes ser bioacumulados aumentando seu efeito nocivo em toda a cadeia alimentar, colocando em risco os organismos situados no topo desta cadeia (BRAGA et al., 2005).

**[U5] Comentário:** Sugiro: São exemplos de metais tóxicos: arsênio, bário, cádmio, cromo, chumbo e o mercúrio

Citado por Pereira et al. (2010) metal pesado é um termo genérico aplicado a um grupo heterogêneo de elementos, incluindo metais, semimetais ou metaloides (arsênio, antimônio, silício, germânio, telúrio e polônio) e não metais ou ametais (flúor e selênio).

Os metais pesados ocorrem naturalmente nos solos e alguns deles, tais como o cobre (Cu), zinco (Zn) e cobalto (Co), desempenham importante papel

na nutrição de plantas e animais, enquanto outros, como o Arsênio (As) e o cádmio (Cd) podem exercer efeitos deletérios (SILVA et al., 2007).

Uma determinada área é considerada contaminada se, entre outros fatores, as concentrações de elementos ou substâncias de interesse ambiental estão além de um dado limite denominado valor de intervenção conforme Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2005). Acima desse limite, há um risco potencial de efeito deletério sobre a saúde humana, havendo necessidade de uma ação imediata na área (ZEITTOUNI; BERTON; ABREU, 2007).

### **2.3.1 Arsênio (As)**

Conforme Chou et al. (2007) o arsênio é um elemento natural que é amplamente distribuído na crosta da Terra. O arsênio com número atômico 33 é classificado quimicamente como um metaloide, tendo ambas as propriedades de um metal e um não metal, no entanto, é frequentemente referido como um metal. É encontrado geralmente no ambiente combinado com outros elementos, como oxigênio, cloro e enxofre. No passado, os compostos de arsênico inorgânico foram predominantemente utilizados como pesticidas, principalmente em campos de algodão e pomares, porém compostos inorgânicos de arsênio não podem mais ser utilizados na agricultura.

A contaminação ambiental por arsênio (As) tem recebido enorme atenção devido ao grande potencial para causar doenças ao homem, como: conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios do sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele e gangrena nos membros (LÉONARD; LAUWERYS, 1980).

De acordo com Panda (2010), o As é tóxico em baixas concentrações e não tem função conhecida como nutriente nas plantas. As principais formas fitodisponíveis do arsênio inorgânico são o arsenito e o arseniato.

A principal forma de contaminação do homem por arsênio é através da ingestão de água ou peixes contaminados por esse elemento (MATSCHULLAT et al., 2000). A contaminação de ambientes por arsênio tem origens naturais e antropogênicas. As fontes naturais são rochas que possuem o As em sua constituição, que ao serem lavadas liberam-no para reservatórios de água. No Brasil, o arsênio é encontrado em seu estado natural no minério chamado de mispíquel associado às piritas nas jazidas de ouro do Estado de Minas Gerais. Especialmente na região do Quadrilátero Ferrífero encontram-se as áreas mais problemáticas no Brasil quanto à presença de As em substratos e conseqüentemente nas águas para o consumo humano (MELO et al., 2009).

A contaminação de origem antropogênica, principal fonte de contaminação dos ambientes aquáticos, ocorre devido aos rejeitos de mineração.

Os insumos agrícolas podem conter compostos de arsênio, como o arseniato de chumbo ( $PbHAsO_4$ ) e o arseniato de cálcio ( $CaAsO_4$ )<sub>2</sub>, que são facilmente lixiviados para os reservatórios e ambientes hidromórficos (CALZADA et al., 1998).

Em muitas partes do mundo em reservatórios e ambientes hidromórficos, o arsênio tem causado problemas ambientais e de saúde. As técnicas disponíveis para a remediação do arsênio são economicamente inviáveis, destroem a paisagem natural e ainda podem afetar a saúde das pessoas diretamente envolvidas no processo, de acordo com Gonzaga, Santos e Ma (2006). Em solos não contaminados, podem ser encontrados teores de arsênio inferiores a  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  e em áreas contaminadas os teores podem ser três mil vezes superiores (VAUGHAN, 1993).

### 2.3.2 Cádmio (Cd)

O cádmio (Cd) é um elemento químico com número atômico 48. Metal que constitui um problema significativo, pois é tóxico em quantidades traços, além de ser móvel nas plantas, e de fácil incorporação em ciclos biológicos (OLIVEIRA et al., 2001). Ainda de acordo com Alloway (1993), os níveis naturais de Cd encontrados normalmente no ambiente não causam toxicidade aguda, o maior risco à saúde humana provém da sua acumulação crônica nos rins.

O Cd entra no ambiente principalmente através de processos industriais de beneficiamento do couro e de outros metais como Zinco (Zn) e o chumbo (Pb) e está presente em fertilizantes fosfatados. É usado na produção de tintas, lubrificantes, na fabricação de baterias níquel-cádmio, em pigmentos para tintas e plásticos, em vários tipos de ligas e em revestimentos anticorrosivos (JIANG; WANG, 2007). A presença de Cd interfere no crescimento das plantas inibindo diretamente ou indiretamente processos fisiológicos como respiração, fotossíntese, trocas gasosas e outros, causando a senescência das mesmas (LAGRIFFOUL et al., 1998).

Os sintomas visuais de toxidez de Cd são clorose, encarquilhamento e enrolamento de folhas. O aumento da lignificação das paredes celulares da epiderme e colênquima, do tecido vascular e da endoderme foi associado a níveis críticos tóxicos de Cd e de Zn no solo (CUNHA; NASCIMENTO; SILVA, 2008).

Ainda Kopittke et al. (2010), estudaram a contaminação de Cd em *Brachiaria decumbens* Staf. e *Chloris gayana* Kunth, onde o crescimento tanto da parte aérea e raízes diminuiu acentuadamente com o aumento de Cd em solução. Embora tenha havido diferença entre as duas espécies em resposta ao

Cd , houve redução de até 50% na parte aérea e massa fresca de raiz de ambas espécies, além de promover uma clorose nas nervuras das folhas.

#### **2.4 Fitorremediação**

Uma das formas mais viáveis, tanto ecologicamente quanto economicamente, para a remoção de metais pesados e recuperação de áreas contaminadas é através da fitorremediação. Esta técnica oferece diversas vantagens como o tratamento de grandes áreas, menor impacto ambiental e custos de implementação muito inferiores àqueles alcançados pelos métodos físico-químicos, e ainda possibilita remediar água, solo e subsolo contaminados e simultaneamente embeleza o ambiente (ABOULROOS et al., 2006; ADESODUN et al., 2010; HU et al., 2010; KING et al., 2010; LEE et al., 2007; SKREBSKY et al., 2008).

No cenário da chamada economia verde, as tecnologias de baixo custo e impacto devem ser promovidas. A fitorremediação faz parte da fitotecnologia que, segundo Marchiol e Fellet (2011), são tecnologias de remediação que usam plantas para a contenção da degradação, ou a remoção de contaminantes de locais poluídos para a recuperação de ecossistemas degradados e contaminados. O processo de fitoextração substancialmente é baseado em interações planta-solo ou planta-água ou relação água-solo-planta, que envolve a transferência de um poluente inorgânico do solo ou água para a biomassa da planta. Isto implica que a gestão dos dois ou três elementos do sistema único (planta-solo + planta-água) tenha efeitos positivos sobre a eficiência do processo. Como fitorremediação é uma abordagem agrônômica é essencial dependendo seu sucesso, em última análise, das práticas agrícolas dentro da área pesquisada.

Segundo Pilon-Smits (2005), as plantas utilizam vários mecanismos para remediar áreas contaminadas: fitoextração, absorção e acumulação dos metais

pesados nos tecidos das plantas; fitoadsorção, adsorção dos metais no sistema radicular, imobilizando os contaminantes; fitoestabilização, liberação para o solo de oxigênio e outros compostos, que podem imobilizar os metais pesados; e rizorremediação, estimulação da biorremediação por fungos ou outros microrganismos localizados no sistema solo-raiz.

Muito importante também é a complexação estável quimicamente dos metais ionizados presentes na solução do solo, pelos exudatos rizosféricos, principalmente ácidos orgânicos de baixa massa molecular (PINTON; VARAZANINI; NANNIPIERI, 2001).

O princípio da técnica da fitorremediação, foco deste trabalho, baseia-se nos mecanismos de tolerância à acumulação de metais nas plantas, de forma a manter as funções celulares mesmo na presença de grandes quantidades de metais.

Uma planta para ser utilizada com sucesso na recuperação de áreas contaminadas, deve ser acumuladora de metais, produzir grandes quantidades de biomassa e ser capaz de adaptar-se às condições do ambiente impactado (ANDERSON, 1993).

A escolha da planta a ser utilizada nesta técnica deve ser realizada a partir da capacidade de adaptação da mesma ao meio. O grupo de plantas que melhor adapta-se tanto ao meio aquático quanto ao terrestre é o das macrófitas aquáticas e este grupo se tornou uma das comunidades mais estudadas e utilizadas na fitorremediação e biomonitoramento de águas contaminadas por metais pesados em países como os Estados Unidos, Canadá e Austrália (SOUZA et al., 2009).

No Brasil, esta tecnologia ainda carece de mais pesquisas para que seja utilizada por profissionais envolvidos na área ambiental, apesar de apresentar condições climáticas e ambientais favoráveis ao desenvolvimento deste processo.

Para a fitorremediação as plantas devem, portanto, ser tolerantes a metais pesados, adaptáveis às características ambientais e capazes de absorver grandes quantidades de metais pesados no solo e água. Além disso, a composição química da água e solo contaminados deve ser considerada, pois a biodisponibilidade dos elementos químicos atóxicos ou tóxicos é a medida do seu potencial absorvível pelos seres vivos, estando diretamente relacionada com a forma química deste composto no meio ambiente (HU et al., 2010).

## **2.5 Estrutura e funcionalidade das plantas fitorremediadoras**

Segundo Castro, Pereira e Paiva (2009), as características anatômicas e fisiológicas dos seres vivos adaptam-se ao meio ambiente podendo desenvolver tolerância às situações de estresse ambiental, formando um fenótipo particular para a situação. Esse comportamento resulta-se das relações entre organismo e ambiente, e das características do genótipo. Os indivíduos que se adaptam e modificam seu fenótipo para sobreviverem em ambiente considerado hostil, possuem plasticidade fenotípica e com isso maior possibilidade de sobrevivência no ambiente. Segundo o mesmo autor, há aumento recente do interesse na realização de estudos sobre este assunto, pois existe estreita relação entre a morfologia externa e interna da planta com a sua fisiologia e ecologia, onde cada tipo de adaptação dos órgãos, tecidos, células ou mesmo expressão de genes, no nível molecular, está relacionada a uma função que poderá proporcionar a adaptabilidade e sobrevivência da espécie.

Conforme os resultados apresentados por Oliveira (2010), a espécie *Pistia stratiotes* (alface d'água) concentrou teores consideráveis de Cd, Pb e As em seus tecidos, porém na presença de Cd foram observados efeitos de toxidez como clorose nas maiores concentrações. A ação combinada das enzimas do sistema antioxidante e alterações estruturais como espessamento de epiderme,

exoderme e endoderme, foram detectadas nas raízes de *P. stratiotes*, funcionando como estratégias adaptativas que permitem a tolerância da espécie a estes elementos. Portanto, foi verificado que a espécie *P. stratiotes* pode ser utilizada no biomonitoramento de ambientes aquáticos contaminados por Cd, pela facilidade de detecção dos efeitos de toxidez causados por este elemento, além de apresentar potencial promissor na utilização em programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por Pb e As.

Oliveira et al. (2011), ao avaliarem a influência do Cd, Pb e As na formação de aerênquimas nas raízes de *Pistia stratiotes* L., relataram que ocorreu interação significativa para os diferentes metais e concentrações. Ocorreu redução linear de aerênquima em relação ao córtex para os dois metais. O mesmo parâmetro avaliado na concentração de 400% foi menor do que para os demais elementos tóxicos. Assim, a capacidade de flutuação da *P. stratiotes* não foi afetada, indicando característica desejável de sua utilização em programas de fitorremediação.

[U6] Comentário: comparado aos

Com relação à influência do Cd, Pb e As na formação da epiderme radicular de *Pistia stratiotes* L., Oliveira et al. (2011) verificaram que ocorreu interação significativa para os diferentes metais e concentrações para a espessura da epiderme. O espessamento da epiderme apresenta-se como característica desejável, pois indica que a tolerância dessa espécie aos elementos tóxicos testados contribui para a indicação da *P. stratiotes* para o tratamento biológico de ambientes aquáticos contaminados por metais.

Ainda conforme Chandra e Yadav (2010), a observação anatômica de diferentes partes de *T. Angustifolia* (taboa) mostrou deformações no tecido vegetal por deposição de metais pesados e aparente rompimento de células do parênquima, demonstrando a forma da adaptabilidade da planta sobreviver no meio contaminado.

Quanto às características estomáticas de *Pistia stratiotes* L. na presença de arsênio, Oliveira et al. (2011) verificaram que houve aumento na sua densidade e no índice estomático da epiderme em ambas as faces das folhas da espécie. Essas modificações anatômicas indicam maior capacidade de captação de CO<sub>2</sub>, devido ao aumento na densidade estomática, sem haver redução no tamanho dos estômatos. Essa situação pode favorecer o processo fotossintético, que, em geral, é afetado pela presença dos elementos tóxicos, tornando-se um mecanismo compensatório, o que pode manter a fotossíntese como em condições normais, contribuindo para a tolerância desta planta ao arsênio. Dessa forma, a espécie em questão pode ser indicada como potencial para o uso em programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por arsênio.

Ainda estudando a espécie *P. stratiotes*, Silva e Vidal (2010), observaram que a mesma apresenta diversas anormalidades no ciclo mitótico, quando exposta a altas concentrações de Cd. Contudo, o elemento não causa alterações na quantidade de DNA nuclear e no índice mitótico desta espécie. Enquanto Pereira et al. (2011), ao estudarem as modificações na epiderme foliar de aguapé em função de diferentes concentrações e elementos tóxicos, verificou-se que as alterações encontradas não **ilustram** sintomas de toxicidade dos metais avaliados para as plantas de aguapé, ocorrendo poucas mudanças significativas, levando, ao aumento da espessura da epiderme que pode ser relacionada com uma maior capacidade de filtrar o excesso de radiação e de armazenar os metais translocados para a parte aérea, denotando tolerância do aguapé às condições testadas.

No tocante à anatomia radicular das plantas de aguapé, os estudos de Pereira et al. (2011) demonstraram tolerância ao Cd não alterando significativamente a proporção de aerênquima, na epiderme, exoderme e endoderme. Contudo, reduziu o diâmetro das células corticais, o diâmetro dos vasos de xilema e aumentou a espessura do floema. Dessa forma, a presença de

[U7] Comentário: Sugiro:  
demonstram

Cd não promoveu efeitos tóxicos nas raízes de aguapé, preservando a sua estrutura interna, contribuindo para a tolerância dessa espécie por esse elemento.

Felipe, Oliveira e Leão (2009) estudaram o efeito sobre a taxa de crescimento relativo (TCR) de diferentes concentrações de As nas espécies vegetais de *C. cajan* (guandu) e *C. spectabilis* (crotalária). A exposição das plantas ao metal promoveu significativa redução na TCR nas duas espécies, de forma mais intensa na *C. Cajan*, com redução em todas as concentrações testadas, sendo que na maior concentração houve morte das plantas. Na espécie *C. spectabilis* houve menor efeito tóxico do As nas plantas, que segundo os pesquisadores, esta resistência está relacionada, em parte, à atuação dos mecanismos enzimáticos oxidativos.

Souza et al. (2009), estudando diferentes concentrações de cádmio em relação à anatomia da espécie *Polygonum ferrugineum* (erva de bicho), observaram a necrose das células dos tecidos mais externos da raiz quando submetida à concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> de Cd e no tratamento com concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> foi verificado aumento das lacunas do aerênquima, embora estatisticamente não significante, ainda nesta última concentração foi observado aumento significativo de tricomas glandulares nas duas faces da epiderme foliar.

As modificações nos feixes vasculares de aguapé sob diferentes concentrações de elementos tóxicos apresentaram-se diferenciadas em relação aos metais, sendo que as maiores densidades de feixes observados na presença de As e Pb podem favorecer o fluxo de água, nutrientes e fotoassimilados pela planta, contudo, essas modificações não apresentam sintomas de toxicidade desses elementos para o aguapé, segundo Pereira et al. (2011).

Melo et al. (2009) testaram diferentes concentrações de As nas plantas de aveia, amendoim e estilosantes, onde todas as espécies tiveram a matéria seca e o crescimento vegetativo severamente alterado devido à fitotoxidez do As. Estudaram também a localização do As na planta, onde os maiores teores foram

encontrados nas raízes, indicando que há um mecanismo de compartimentalização, a fim de reduzir a translocação do As aos tecidos jovens da parte aérea.

### **3 CONCLUSÃO**

Algumas espécies de plantas já são conhecidas como fitorremediadoras, assim como sua plasticidade fenotípica. Porém, não se conhece as respostas morfofisiológicas da macrofila aquática *Brachiaria arrecta* quando cultivada na presença de elementos tóxicos como o arsênio e o cádmio.

## REFERÊNCIAS

- ABOULROOS, S. A.; HELAL, M. I. D.; KAMEL, M. M. Remediation of Pb and Cd polluted soils using in situ immobilization and phytoextraction techniques. **Soil & Sediment Contamination**, Philadelphia, v.15, p. 199-215, 2006.
- ADESODUN, J. K. et al. Phytoremediation potentials of sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for metals in soils contaminated with zinc and lead nitrates. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 207, n. 1/4, p. 195-201, Mar. 2010.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. London: Blackie Academic & Professional, 1993. 339 p.
- ANDERSON, T. A.; WALTON, B.T. Fate of <sup>14</sup>C trichloroethylene in the root zone of plants from a former solvent disposal site. **Toxicological and Environmental Chemistry**, New York, v. 14, p. 2041- 2047, 1993.
- BRAGA, B. et. al. **Introdução a engenharia ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. 318 p.
- CALIJURI, M. L. et al. Tratamento de esgotos sanitários em sistemas reatores UASB/wetlands construídas de fluxo horizontal: eficiência e estabilidade de remoção de matéria orgânica, sólidos, nutrientes e coliformes. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3 p. 421-430, jul./set. 2009.
- CALZADA, A. T. et al. Determination of arsenic species in environmental samples: use alga *Chlorella vulgaris* for arsenic (III) retention. **Trends Analytical Chemistry**, Oxford, v. 3, p. 167-175, 1998.
- CAMARGO, A. F. M.; PEZZATO, M. M.; HENRY SILVA, G. G. Fatores limitantes à produção primária de macrófitas aquáticas In: THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**. Maringá: UEM, 2003. 341 p.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CHANDRA, R.; YADAV, S. Potential of *Typha angustifolia* for phytoremediation of heavy metals from aqueous solution of phenol and melanoidin. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 36, n. 10, p. 1277-1284, Oct. 2010.

CHEHREGANI, A. et al. Phytoremediation of heavy-metal-polluted soils: Screening for new accumulator plants in Angouran mine (Iran) and evaluation of removal ability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 5, p. 1349-1353, July 2009.

CHOU, S. et al. **Toxicological profile for arsenic**. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007. 559 p.

CUNHA, K. P. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; SILVA, A. J. Silicon alleviates the toxicity of cadmium and zinc for maize (*Zea mays* L.) grown on a contaminated soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Temuco, v. 171, p. 849-853, 2008.

DINARDI, A. L. et al. Fitorremediação. In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 3., 2003, Campinas. **Resumos...** Campinas: CESET-Unicamp, 2003.

FASSET, N. C. **A manual of aquatic plants**. Madison: Universidad Wisconsin, 1996.

FELIPE, R. T. A.; OLIVEIRA, J. A.; LEÃO, G. A. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 245-254, Mar./Apr. 2009.

GONZAGA, M. I. S.; SANTOS, J. A. G.; MA, L. Q. Fitoextração e hiperacumulação de arsênio por espécies de samambaias. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 90-101, 2006 .

GUIMARÃES, F. P. et al. Estudos laboratoriais de acúmulo e toxicidade de arsênio em *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v. 2, p.109-113, 2006.

HENRY SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Composição química de quatro espécies de macrófitas e possibilidade de uso de suas biomassas. **Naturalia**, Rio Claro, v. 25, p. 111-125, 2000.

HU, J. Z. et al. Bioaccumulation and chemical forms of cadmium, copper and lead in aquatic plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 235-240, 2010.

IRGAN, B. E; GASTAL JÚNIOR, C. V. S. **Plantas aquáticas da planície costeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1996. 290 p.

JIANG, X.; WANG, C. Cadmium distribution and its effects on molybdate-containing hydroxylases in *Phragmites australis*. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 86, p. 353–360, 2007.

KIM, S.; BAEK, K.; LEE, I. Phytoremediation and microbial community structure of soil from a metal-contaminated military shooting range: Comparisons of field and pot experiments. **Journal of environmental science and health - Part A - Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, Monticello, v. 45. p. 389-394, 2010.

KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1991. v.1, 607 p.

KOPITKE, P. M. et al. Toxicity of Cd to signal grass (*Brachiaria decumbens* Stapf.) and Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth.). **Plant and Soil**, Crawley, v. 330, n. 1/2, p. 515-523, May 2010.

LAGRIFFOUL, A. et al. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.) **Plant and Soil**, Crawley, v. 200, p. 241–250, 1998.

LEE, I. et al. Phytoremediation of soil co-contaminated with heavy metals and TNT using four plant species. **Journal of Environmental Science And Health Thpart A-toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering**, Monticello, v. 42, p. 2039-2045, 2007.

LÉONARD, A.; LAUWERYS, R. R. Carcinogenicity, teratogenicity and multigenicity of arsenic. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 75, p. 49-62, 1980.

LEWIS, M. A. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 87, p. 319-336, 1995.

- MARCHIOL, L.; FELLET, G. Agronomy towards the green economy. Optimization of metal phytoextraction. **Official Journal of the Italian Society for Agronomy**, Bologna, v. 6, n. 3, Sept. 2011.
- MARTINS, D. et al. Caracterização química das plantas aquáticas coletadas no reservatório de Salto Grande (Americana-SP). **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 21, p. 21-15, 2003.
- MATSCHULLAT, J. et al. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle. Brazil. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 15, p. 193-202, 2000.
- MELO, R. F. et al. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, 2009.
- OLIVEIRA, C. **Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia sptratiotes* L. na presença de Cádmio, Chumbo e Arsênio**. 2010. 120 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- OLIVEIRA, D. M. et al. **Fitorremediação: o estado da arte**. Rio de Janeiro: CETEM, 2006. 34 p. (Tecnológica ambiente, 39).
- 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**, Londrina, v. 13, p. 329-341, 2001.
- OLIVEIRA, J. A. et al. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de Salvinia e Aguapé. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2011.
- PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O. Índice de translocação de nutrientes em mudas de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) submetidas a concentrações crescentes de cádmio, níquel e chumbo. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, p. 467-473, 2002.
- PANDA, S. K. Arsenic stress in plants. **Journal of agronomy and crop science**, California, v. 193, n. 3, p. 161-174, 2010.

PEREIRA, A. A. et al. Heavy metals and micronutrients in soil and in leaves of *Brachiaria decumbens* on the margins of highways. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 347-357, May/June 2010.

PEREIRA, F. J. et al. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 29, p. 259-267, 2011.

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

PINTON, R.; VARAZANINI, Z.; NANNIPIERI, P. The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. New York: M. Dekker, 2001. 424 p.

POMPÊO, M. L. M. ; MOSCHINI-CARLOS, V. **Macrófitas aquáticas e perifiton: aspectos ecológicos e metodológicos**. São Carlos: Rima, 2003. 124 p.

POTT, J. V; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 404 p.

ROCHA, D. et al. **Biologia da conservação: essências**. São Carlos: Rima, 2006. 542 p.

SILVA, A. C; VIDAL, M. Quantificação foliar de metais pesados em área de aterro. **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n. 4, p. 144 –147, out./dez. 2010.

SILVA, M. L. D. et al. Concentration of heavy metals in grain of plants cultivated in soil with different contamination levels. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 527-535, Abr. 2007.

SKREBSKY, E. C. et. al. Efeito do cádmio no crescimento, concentração de micronutrientes e atividade da desidratase do ácido  $\sigma$ -aminolevulínico (ALA-D) e fosfatase ácida (AP) em plantas de *Pfaffia glomerata*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 20, n. 4, p. 285-294, 2008.

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, 2009.

SUNG, H. K.; IN, S. L. Comparison of the ability of organic acids and EDTA to enhance the phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, New York, v. 84, p. 255-259, 2010.

TANAKA, R. H. et al. Ocorrência de plantas aquáticas nos reservatórios da Companhia Energética de São Paulo. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 20, p. 99-111, 2002.

TURAN, M.; BRINGU, A. Phytoremediation based on canola (*Brassica napus* L.) and Indian mustard (*Brassica Juncea* L.) planted on spiked soil by aliquot amount of Cd, Cu, Pb, and Zn. **Plant Soil and Environment**, Praha, v. 53, n. 1, p. 7-15, Jan. 2007.

VALITUTTO, R. S. et al. Accumulation of metals in macrophytes from water reservoirs of a power supply plant, Rio de Janeiro State, Brazil. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 178, n. 1/4, p. 89-102, Jan. 2007.

VAUGHAN, G. T. **The environmental chemistry and fate of arsenical pesticides in cattle tick dip sites and banana land plantations**. Melbourne: CSIRO Division of Coal Industry, Center for Advanced Analytical Chemistry, 1993. 32 p.

ZEITTOUNI, C. F.; BERTON, R. S.; ABREU, C. A. Phytoextraction of cadmium and zinc from na oxisol contaminated with heavy metals. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, 2007.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**ARTIGO 1 Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de braquiária do brejo (*Brachiaria arrecta* (Hack.) Stent.), para a tolerância à contaminação por arsênio (As)**

## RESUMO

Atividades humanas como a produção industrial e uso de defensivos agrícolas depositam constantemente elementos tóxicos no ambiente, como os metais pesados. Portanto, são necessárias novas propostas para a remoção ou neutralização dos efeitos metálicos tóxicos. A fitorremediação é uma proposta ambientalmente eficaz que necessita do estudo de diferentes espécies vegetais sobre a tolerância desses elementos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características anatômicas, foliares e radiculares. Especificamente: quantificar as características de trocas gasosas, de crescimento e desenvolvimento, de obtenção da quantificação de DNA em plantas de *Brachiaria arrecta* sob diferentes concentrações de arsênio (As), bem como detectar os mecanismos que proporcionam a tolerância dessa espécie a este poluente e possibilitar a indicação da mesma para programas de fitorremediação. As plantas de *B. arrecta* foram cultivadas em casa de vegetação para reprodução clonal. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland contendo concentrações de arsênio (As) nas concentrações de 0,0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Para avaliação da quantidade de DNA foram coletadas folhas aos 18 dias do início do experimento. Aos 21 dias, no final do período experimental foram coletadas as plantas para verificação anatômica, quantificação de DNA. Para a avaliação do crescimento foi coletado uma planta por repetição e por tratamento no início e aos 21 dias. O delineamento utilizado foi DIC, com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott com  $p < 0,05$ . Devido ao fato de possuir plasticidade anatômica e fisiológica por meio das modificações encontradas, a espécie *B. arrecta*, demonstra potencial para aplicação em programas de biorremediação de ambientes aquáticos contaminados com As, devido à tolerância da mesma a este contaminante.

Palavras-chave: *Brachiaria arrecta*. Fitorremediação. Anatomia Vegetal. Arsênio.

**ARTICLE 1: ANATOMICAL AND PHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF PLANTS FROM BRACHIARIA OF THE SWAMP (*Brachiaria arrecta* (Hack.) Stent.) TOLERANCE FOR CONTAMINATION BY ARSENIC (As)**

[U8] Comentário: Favor verificar o termo

**ABSTRACT**

Human activities such as industrial production and use of pesticides deposited constantly toxic elements in the environment, such as heavy metals. Therefore, new proposals are necessary for removing or neutralizing the effects of toxic metal. Phytoremediation is an environmentally effective proposal that requires the study of different plant species on the tolerance of these elements. This study had as objective to evaluate the anatomic characteristics, leaf and root. Specifically: to quantify the characteristics of gas exchange, growth and development, to obtain the quantification of DNA in plants of *Brachiaria arrecta* under different concentrations of arsenic (As), as well as detect the mechanisms that provide tolerance of this species to this pollutant and enable indicating the same for phytoremediation programs. The plants of *B. arrecta* were grown in a greenhouse for clonal reproduction. Plants were grown in Hoagland nutrient solution containing concentrations of arsenic (As) at concentrations of 0.0; 0.25; 0.50; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L<sup>-1</sup>. For assess the amount of DNA leaves were collected at 18 days from the beginning of the experiment. At 21 days, at the end of the experimental period, the plants were collected for anatomical verification, quantification of DNA. For the evaluation of growth was collected one plant by repetition and treatment at beginning and at 21 days. The experimental was completely randomized design, with six replicates. The data were subjected to analysis of variance and the Scott-Knott test with  $p < 0.05$ . Due the plant to have anatomical and physiological plasticity by the changes found, the specie *B. arrecta*, demonstrated potential for application in bioremediation programs of the aquatic environments contaminated with As, due the tolerance the same to this contaminant.

Keywords: *Brachiaria arrecta*. Phytoremediation. Plant Anatomy. Arsenic.

## 1 INTRODUÇÃO

A poluição do ambiente aquático por elementos tóxicos decorrentes de indústrias e atividades agrícolas tem desencadeado o processo de acúmulo destes elementos em corpos d'água, o que pode prejudicar a saúde de diversos organismos e até mesmo de humanos, por viabilizar a passagem destas substâncias por toda a teia trófica. Dentre esses poluentes, o arsênio tem se destacado, por ser um dos elementos mais tóxicos encontrados no ambiente, podendo ocasionar diferentes doenças em humanos, animais e vegetais (MELO et al., 2009).

Os custos para a restauração de ambientes aquáticos contaminados com esses tipos de poluentes, por meio dos métodos convencionais físicos e químicos, são elevados. Como alternativa a estes recursos tem-se utilizado a fitorremediação, processo pelo qual é possível obter a remoção destes poluentes a baixo custo e aplicado a extensas áreas, pois baseia-se na utilização de plantas para a remoção dos contaminantes (GRATÃO et al., 2005).

Por sua vez, as espécies vegetais, quando submetidas às condições de contaminação por metais pesados, apresentam uma série de distúrbios fisiológicos e estruturais (MUFARREGE; HADAD; MAINE, 2010), os quais podem apresentar níveis de **dados** diferentes entre as espécies, algumas delas tolerando mais o efeito do metal.

Especificamente o efeito causado pelo elemento tóxico arsênio, proveniente da contaminação por rejeitos da mineração, nas características fisiológicas de plantas, ainda são pouco estudados (OLIVEIRA, 2010; PEREIRA et al., 2011). A ação combinada de enzimas do sistema antioxidante aliada a sua capacidade de resposta aos estímulos fornecidos pela presença de As em *Pistia stratiotes* indica a capacidade de controle do estresse oxidativo ocasionado pela contaminação por este metaloide, como uma estratégia

**[U9] Comentário:** Não seria danos?  
Favor verificar

adaptativa dessa espécie, conferindo-lhe mecanismos de tolerância a este elemento. Além disso, esta mesma espécie apresentou alterações estruturais como redução na proporção de aerênquima de acordo com o incremento da concentração de As, sem que este fato prejudicasse a capacidade de flutuação das mesmas plantas, não afetando sua adaptabilidade a ambientes contaminados por este metaloide. Foi relatado ainda, o espessamento da epiderme, exoderme e endoderme funcionando como barreiras apoplásticas, consideradas mecanismos adaptativos que proporcionam tolerância desta espécie ao As (OLIVEIRA, 2010). Já em estudos realizados com plantas de aguapé demonstraram aumento na fotossíntese, associado provavelmente a uma maior captação de CO<sub>2</sub>, e presença de modificações nas características anatômicas foliares e radiculares (PEREIRA et al., 2011).

Além disso, no intuito de se estudar os diversos mecanismos adaptativos que resultem em tolerância das espécies a este elemento, devem ser analisados ainda a taxa de crescimento relativa e a alteração da quantidade de DNA, a fim de avaliar como a presença do metal interfere nestas características de desenvolvimento das plantas (OLIVEIRA, 2010).

Em muitos estudos de fitorremediação, as macrófitas aquáticas têm sido utilizadas como extratoras de poluentes encontrados em ambientes aquáticos (SKINNER; WRIGHT; PORTER-GOFF, 2007). Uma das espécies mais amplamente encontradas em nosso país, nesse tipo de ambiente, é a *Brachiaria arrecta*, a qual possui rápida propagação vegetativa e alta produção de biomassa (MARTINS et al., 2008), possuindo portanto, potencial para a remoção de contaminantes dos ecossistemas aquáticos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características anatômicas, foliares e radiculares. Especificamente: verificar as características de trocas gasosas, de crescimento e desenvolvimento, de obtenção da quantificação de DNA em plantas de *Brachiaria arrecta* sob diferentes

concentrações de arsênio (As), bem como detectar os mecanismos anatômicos e fisiológicos que proporcionam a tolerância dessa espécie a este poluente e possibilitar a indicação da mesma para programas de fitorremediação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material vegetal

A coleta do material vegetal (*Brachiaria arrecta*) foi realizada no dia 28 de fevereiro de 2011, às margens da Represa do Funil, localizada no município de Lavras–MG (44° 55' W; 21° 05' S). Posteriormente, as plantas foram lavadas em água corrente com a finalidade de eliminação de impurezas e selecionadas quanto ao tamanho. Para o período de aclimatização, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, em bandejas plásticas com capacidade para 20 L, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada com  $1/2$  da força iônica total (Figura 1).

[U10] Comentário: a metade



Figura 1 Aclimação das plantas filhas de *Brachiaria arrecta* em casa de vegetação

## 2.2 Montagem dos experimentos

As plantas filhas foram selecionadas quanto ao tamanho, número de folhas e ausência de estolões, para uniformização das plantas a serem utilizadas no experimento. Essas plantas foram cultivadas em vasos de polipropileno com capacidade para 6 L (Figura 2), contendo 4 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon a 40% da força iônica (HOAGLAND; ARNON, 1950), acrescida de concentrações crescentes de arsênio: 0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 e 4,00 mg L<sup>-1</sup>. As concentrações de arsênio aplicadas foram baseadas na concentração máxima permitida pela Resolução nº 357, 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005 apud WOLFF, 2009), correspondendo ao controle (0 mg L<sup>-1</sup>) e 100, 200, 400, 800 e 1600 vezes a concentração máxima permitida, respectivamente, a partir da concentração de 0,25 mg L<sup>-1</sup>. As plantas foram deixadas nessas condições por um período de 21 dias.



Figura 2 Plantas de *Brachiaria arrecta*, submetidas aos tratamentos, dispostas em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições com três plantas por vaso

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e seis repetições. Cada repetição contou com uma parcela experimental de três plantas.

### 2.3 Análises anatômicas

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Para a realização das análises anatômicas das raízes foram coletadas uma planta de cada uma das seis repetições por tratamento. Para análise da anatomia foliar, foi coletada a segunda folha expandida de uma planta de cada uma das seis repetições presentes em cada um dos tratamentos. Imediatamente após a coleta, os órgãos vegetativos foram fixados em formaldeído, etanol 70% e ácido acético glacial (F.A.A. 70%) por um período de 72 horas e posteriormente repassadas para etanol 70° G.L. (JENSEN, 1962). As amostras coletadas foram emblocadas em historesina segundo a metodologia proposta por O'Brien, Feder e Mc Cully (1964).

Cortes transversais foram realizados em micrótomo de deslizamento na zona pilífera das raízes e na região mediana de folhas completamente expandidas das plantas. Após realizados os cortes, as secções foram coradas com azul de toluidina 1% e montados em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá. Também foram realizadas secções, cortes paradérmicos na região mediana das faces abaxial e adaxial das folhas completamente expandidas de plantas, sendo corados com Safranina 1% segundo metodologia de Burger e Richter (1991). Foram confeccionadas lâminas semipermanentes em glicerina a 50% e realizada a vedação das lâminas com resina de nitrocelulose.

Para o estudo da anatomia quantitativa foram feitas fotomicrografias com auxílio de uma câmera digital OLYMPUS U-TV1X-2, acoplada ao

[U11] Comentário: Favor verificar

[U12] Comentário: Favor colocar o significado da sigla

microscópio OLYMPUS CX41 e com o auxílio do *software* BEL View, as quais foram posteriormente analisadas no *software* para análise de imagens UTHSCSA-Imagetool, medindo-se as características quantitativas dos tecidos em três lâminas por repetição, sendo contabilizados cinco cortes por lâmina e quatro campos por corte.

Foram analisadas nas raízes, as espessuras da epiderme, exoderme e endoderme. A porcentagem de aerênquima no córtex, foi determinada por meio da área total do córtex segundo Pereira et al. (2008), e o somatório das áreas individuais dos aerênquimas. O índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC = diâmetro dos elementos traqueais/número de elementos traqueais) foi calculado segundo Carlquist (1975). Ainda com relação às raízes, foram analisados o número e o diâmetro dos vasos do metaxilema.

Na anatomia das folhas foi calculada a densidade estomática (número de estômatos por mm<sup>2</sup>) e foram medidos os diâmetros polares e equatoriais dos estômatos das faces adaxial e abaxial das folhas. Nos cortes transversais foram medidas as espessuras da epiderme das faces adaxial e abaxial, parênquima clorofiliano e pelo somatório dos mesmos, foi determinada a espessura do limbo foliar. Foram também contados os conjuntos de células buliformes por mm da secção da folha e também medido a área destes conjuntos, bem como contado o número de feixes vasculares por mm<sup>2</sup> de folha.

#### 2.4 Análises fotossintéticas e de crescimento

Ao décimo oitavo dia do período experimental foram avaliadas em folhas completamente expandidas (cinco plantas por tratamento) as seguintes características de trocas gasosas foliares das plantas: a taxa fotossintética (A), a condutância estomática ( $g_s$ ) e a transpiração (E), com o uso do analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo Modelo ADC – LCA – 4

**[U13] Comentário:** Sugiro: Foi determinada a porcentagem de aerênquima por meio da área total do córtex segundo.... Favor analisar

**[U14] Comentário:** Favor verificar

(Hoddesdon, UK). As análises foram realizadas a partir das 10 h da manhã, com uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos fixados no aparelho para  $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PEREIRA et al., 2011).

A taxa de crescimento relativo (TCR) do sistema radicular e da parte aérea das plantas foi avaliada. A razão de área foliar (RAF), a taxa assimilatória líquida (TAL) e a área foliar específica (AFE) foram realizadas pelo método proposto por Hunt, Causton e Shipley (2002), a partir da massa seca da raiz, caule e folhas, obtidas por meio de pesagem em balança analítica e da área foliar (AF) das plantas mensurada a partir de fotografias das folhas das plantas analisadas no *software* UTHSCSA-Imagetool.

## 2.5 Citometria de fluxo

A avaliação da quantidade de DNA nuclear foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, utilizando-se a técnica de citometria de fluxo. É uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula. Foi utilizado a metodologia proposta por Dolezel e Bartos (2005). O padrão interno de referência utilizado foi a espécie *Pisum sativum*.

Para a determinação do conteúdo de DNA, aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens das plantas de *Brachiaria arrecta* e de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação dos núcleos (DOLEZEL; BARTOS, 2005). A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50  $\mu\text{m}$ . Os núcleos foram corados pela adição de 25  $\mu\text{L}$  de uma solução de 1 mg/1 mL de

[U15] Comentário: possíveis as análises

iodeto de propídeo, sendo adicionados, ainda, 5 µL de RNase a cada amostra. As amostras foram analisadas imediatamente após o preparo. Para cada amostra, 5000 núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas obtidos com o *software* Cell Quest e analisados estatisticamente no *software* WinMDI 2.8.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da Interfase) do padrão de referência (*P. sativum*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg). As análises foram realizadas em três folhas de três plantas de cada tratamento, perfazendo um total de nove repetições.

## **2.6 Análise estatística**

Os dados foram submetidos às análises de variância e ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, com auxílio do *software* estatístico Sisvar.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Análises anatômicas e de trocas gasosas**

Com relação às análises anatômicas referentes à folha, o limbo foliar teve sua espessura significativamente aumentada em relação ao tratamento sem adição de As na solução, até a concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As (Tabela 1; Figura 3), devido ao aumento significativo da espessura do mesofilo, aumentando a quantidade de parênquima clorofiliano. Não foram observadas modificações significativas na espessura da epiderme em ambas as faces da folha (Tabela 1; Figura 3). O resultado apresentado mostra que os tecidos fotossintéticos foram estimulados ao desenvolvimento, como forma de compensar o estresse ocasionado pela presença do metal, mantendo a taxa fotossintética similar à condição da testemunha (Tabela 2), ocasionando a espessura do limbo foliar. No entanto, a partir da concentração de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As, o limbo foliar manteve-se semelhante ao encontrado no controle, indicando que a partir dessa concentração, a taxa fotossintética foi mantida (Tabela 2).

Tabela 1 Características anatômicas das folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes concentrações de As em solução. (EAD = Epiderme Adaxial; EAB = Epiderme Abaxial; MF = Parênquima Clorofiliano; Limbo = Limbo Foliar; NCB = Número de conjuntos de células buliformes por mm da secção da folha; ACCB = Área dos conjuntos de células buliformes por mm da secção da folha; NFV = Número de feixes vasculares)

Arsênio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	EAD ( $\mu\text{m}$ )	EAB ( $\mu\text{m}$ )	MF ( $\mu\text{m}$ )	Limbo ( $\mu\text{m}$ )	NCB	ACCB ( $\text{mm}^2$ )	NFV
0	11,20 a	7,18 a	113,80 b	132,18 b	5,91 b	4,32 b	6,46 b
0,25	11,00 a	7,16 a	136,04 a	154,20 a	7,97 a	6,95 a	6,17 b
0,5	10,60 a	7,00 a	145,40 a	163,00 a	7,89 a	7,97 a	6,69 b
1	11,00 a	7,26 a	145,14 a	163,40 a	8,05 a	8,07 a	6,36 b
2	10,80 a	7,18 a	121,42 a	139,40 b	6,04 b	4,23 b	7,65 a
4	11,25 a	7,20 a	109,55 b	128,00 b	6,17 b	4,25 b	8,11 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para  $P < 0,05$

[U16] Comentário: Favor verificar a sigla com o respectivo significado

[U17] Comentário: Não tem sigla?

[U18] Comentário: Ou NCCB?

[U19] Comentário: Ou ACCB?

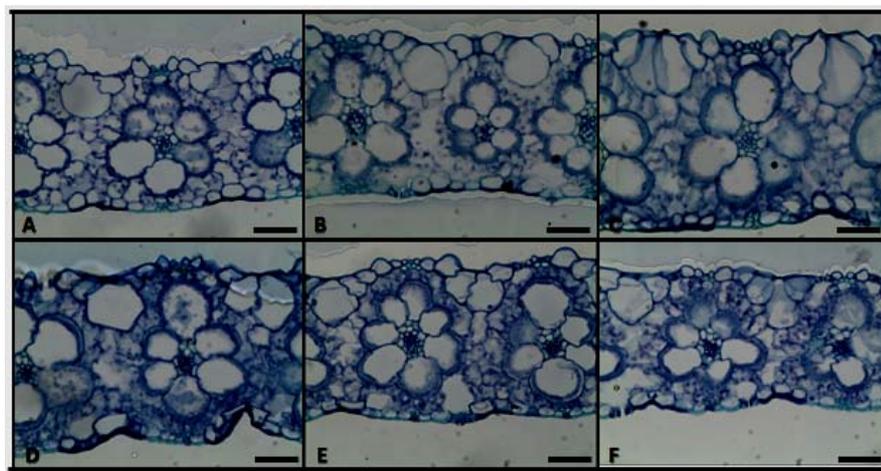


Figura 3 Secções transversais do limbo das folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de As em solução. (A= 0,0; B= 0,25; C= 0,50; D=1,0; E= 2,0 e F= 4,0  $\text{mg L}^{-1}$  de As). Barra = 50 $\mu\text{m}$

Tabela 2 Análises de trocas gasosas em plantas de *Brachiaria arrecta* submetidas ao As em solução. A= taxa fotossintética; gs = condutância estomática; E= transpiração

Arsênio (mg L <sup>-1</sup> )	A ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	gs ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	E ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
0,00	5,707500 a	26,960000 a	0,505000 a
0,25	4,725000 a	31,455000 a	0,600000 a
0,50	5,207500 a	44,935000 a	0,787500 a
1,00	3,637500 a	33,700000 a	0,655000 a
2,00	4,107500 a	24,715000 a	0,512500 a
4,00	6,200000 a	22,467500 a	0,515000 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para  $P < 0,05$

Ocorreu ainda, um aumento significativo no número de estômatos presentes na face adaxial da folha (Tabela 3; Figura 5) além do aumento no número de feixes vasculares, nestas concentrações em relação aos tratamentos com concentrações menores do que 2,0 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 1; Figura 4). O aumento no número de estômatos faz com que a captação de CO<sub>2</sub> possa ser aumentada, o que é favorável ao processo fotossintético da planta, principalmente em uma condição onde a transpiração aumentada por essa maior densidade de estômatos não seja limitante, como é o caso de plantas crescidas em ambientes aquáticos, como estudado neste trabalho. Além disso, um maior número de feixes vasculares presentes na folha permite a melhor distribuição e escoamento da maior quantidade de fotoassimilados produzidos em uma condição de maior absorção e assimilação de carbono, colaborando para a melhor distribuição de energia fonte-dreno nas plantas sob essas condições. Essas características adaptativas de tolerância a um determinado estresse, causado pela presença do arsênio, visa manter o processo fotossintético da planta como em condições normais de cultivo **visando** sua sobrevivência neste ambiente.

[U20] Comentário: Sugiro que use um sinônimo

Tabela 3 Características anatômicas da epiderme das folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes concentrações de As em solução. DP = diâmetro polar; DEQ = diâmetro equatorial; DE = densidade estomática (estômatos por mm<sup>2</sup>)

Arsênio (mg L <sup>-1</sup> )	Face Adaxial			Face Abaxial		
	DP (μm)	DEQ (μm)	DE	DP (μm)	DEQ (μm)	DE
0,00	29,75 a	7,13 a	117,17 b	32,83 a	7,25 b	124,71 a
0,25	28,50 a	7,17 a	123,42 b	32,21 a	7,88 a	114,54 a
0,50	29,42 a	7,86 a	126,75 b	32,58 a	8,29 a	108,33 a
1,00	27,92 b	7,79 a	139,84 a	31,29 b	8,46 a	110,42 a
2,00	27,63 b	7,29 a	145,04 a	30,79 b	8,29 a	109,33 a
4,00	26,83 b	7,03 a	146,63 a	30,63 b	8,29 a	119,00 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para P<0,05

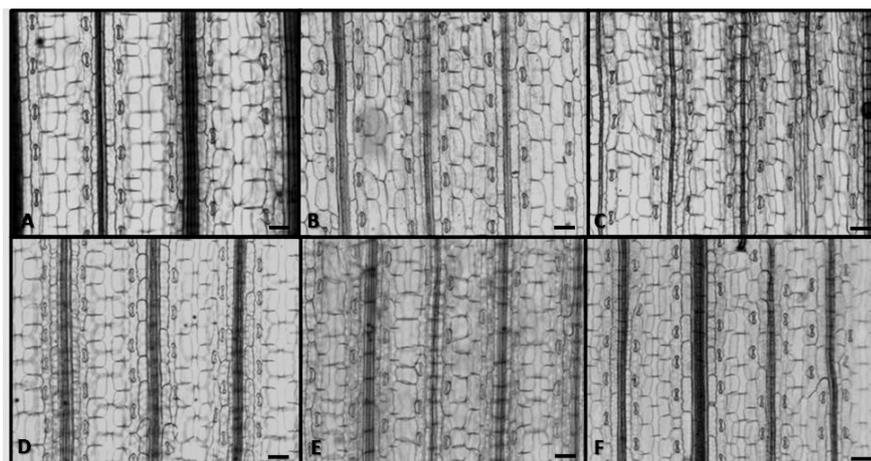


Figura 5 Secções paradérmicas da face adaxial de folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de As em solução. (A= 0,0; B= 0,25; C= 0,50; D= 1,0; E= 2,0 e F= 4,0 mg L<sup>-1</sup> de As). Barra = 50μm

Estudos de Maranhão et al. (2006), envolvendo a espécie *Podocarpus lambertii* sob contaminação por petróleo e de Grisi et al. (2008), com uma cultivar resistente de café sob estresse hídrico, afirmam que maior densidade estomática visa manter a captação de CO<sub>2</sub> quando o diâmetro polar dos mesmos

é menor, mantendo as condições para uma mesma taxa fotossintética, corroborando os dados encontrados.

O comportamento foi semelhante ao do número de estômatos para o número de conjuntos e a área dos conjuntos de células buliformes, os quais aumentaram significativamente até a concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As (Tabela 1; Figura 4), o número e a área das células buliformes reduziram significativamente em relação aos tratamentos das menores concentrações de As, ficando semelhantes estatisticamente ao tratamento na ausência de As (Tabela 1; Figura 4).

As células buliformes, presentes em Poaceae, são responsáveis pelo dobramento da folha, em condições de maior intensidade luminosa, como forma de evitar a transpiração excessiva das mesmas, mantendo as condições hídricas necessárias ao processo fotossintético. Brito e Rodella (2002), ao estudarem duas espécies do gênero *Brachiaria*, destacaram a importância destas células no dobramento das folhas dessas plantas, corroborando com os dados encontrados.

Para a face adaxial das folhas a partir da concentração de  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  de As, houve um aumento significativo na densidade estomática em comparação com as menores concentrações, como forma de compensar a diminuição significativa no diâmetro polar dos mesmos nestas concentrações, de forma a garantir a captação necessária de  $\text{CO}_2$  ao processo fotossintético (Tabela 3; Figura 5), colaborando para a manutenção da taxa fotossintética das plantas sob condições de elevadas concentrações de As (Tabela 2).

Na face abaxial das folhas de *B. arrecta* sob concentrações de As, a epiderme não teve modificações significativas com relação à densidade estomática, embora o diâmetro polar dos estômatos tenha diminuído significativamente a partir da concentração de  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  de As, com relação às menores concentrações testadas. A face adaxial, por estar diretamente exposta às

condições de radiação solar, tende a responder mais às alterações ambientais, do que a face abaxial.

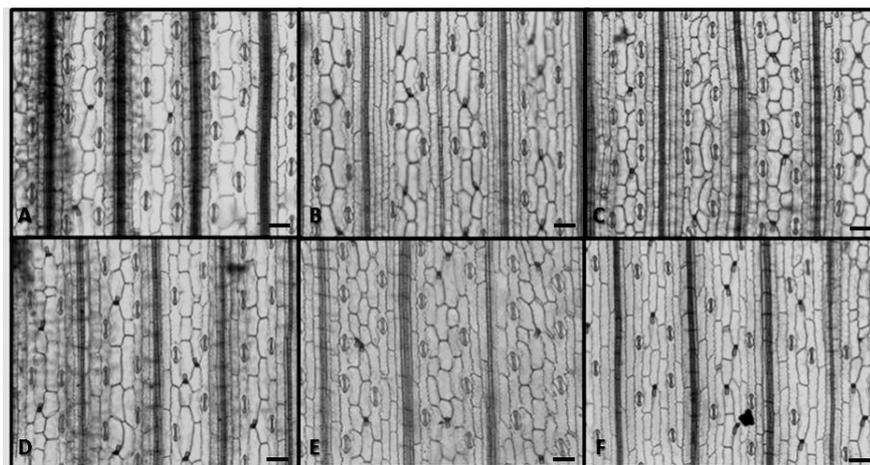


Figura 6 Secções paradérmicas da face abaxial de folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de As em solução. (A= 0,0; B= 0,25; C= 0,50; D=1,0; E= 2,0 e F= 4,0 mg L<sup>-1</sup> de As). Barra = 50μm

Portanto, este comportamento indica plasticidade anatômica nas folhas de *B. arrecta* em condições de exposição ao As nas concentrações testadas, indicando a tolerância desta espécie ao elemento em questão.

Com relação à anatomia radicular, o cilindro vascular, manteve-se com o número de vasos de metaxilema estatisticamente semelhante, e os mesmos não apresentaram diferenças significativas em seu diâmetro em relação ao tratamento sem adição de As na solução, até a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As (Tabela 4; Figura 7), indicando que o fluxo de nutrientes e do As para a parte aérea não foi afetado. No entanto, a partir da concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As, o número de vasos de metaxilema, bem como o seu diâmetro diminuíram significativamente com relação a todas as outras concentrações testadas (Tabela 3; Figura 7), indicando que esta modificação pode ter sido no sentido de se

evitar a translocação excessiva de As nas maiores concentrações testadas, como forma de proteção dos tecidos fotossintéticos, presentes na parte aérea.

Tabela 4 Características anatômicas radiculares de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes concentrações de As em solução. EP = espessura da epiderme; EX = espessura da exoderme; EN = espessura da endoderme; PA = porcentagem de aerênquimas em relação ao córtex; NV = número de vasos de metaxilema; DV = diâmetro de vasos de metaxilema; IVC = índice de vulnerabilidade do sistema vascular (índice de vulnerabilidade de Carlquist)

Arsênio (mg L <sup>-1</sup> )	EP (μm)	EX (μm)	EN (μm)	PA (%)	NV	DV (μm)	IVC (%)
0	16,60 a	12,40 d	5,20 f	31,20 a	8,00 a	52,00 a	6,50 a
0,25	13,40 b	18,60 c	9,20 e	32,40 a	8,00 a	52,40 a	6,55 a
0,5	9,80 c	26,20 b	10,80 d	28,60 a	8,00 a	51,60 a	6,45 a
1	6,80 d	27,00 b	13,60 c	30,60 a	8,00 a	50,80 a	6,35 a
2	6,60 d	28,40 b	16,00 b	29,20 a	6,00 b	41,40 b	6,90 a
4	0,00 e	35,00 a	19,60 a	28,60 a	6,00 b	38,60 c	6,43 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para P<0,05

O índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC), não apresentou diferença estatisticamente significativa para quaisquer das concentrações testadas, indicando que a redução no número de vasos de metaxilema e em seu diâmetro, mantendo a mesma condutividade hidráulica para todas as concentrações testadas, não comprometendo o fluxo de seiva bruta. Segundo Denardi e Marchiori (2005), um maior IVC, indicaria uma maior vulnerabilidade do sistema de condução de seiva bruta da planta, por maior risco de ocorrência de embolia. No entanto, a não alteração do IVC nas condições testadas, colabora para o fluxo de seiva bruta como em condições de ausência de As.

[U21] Comentário: manteve

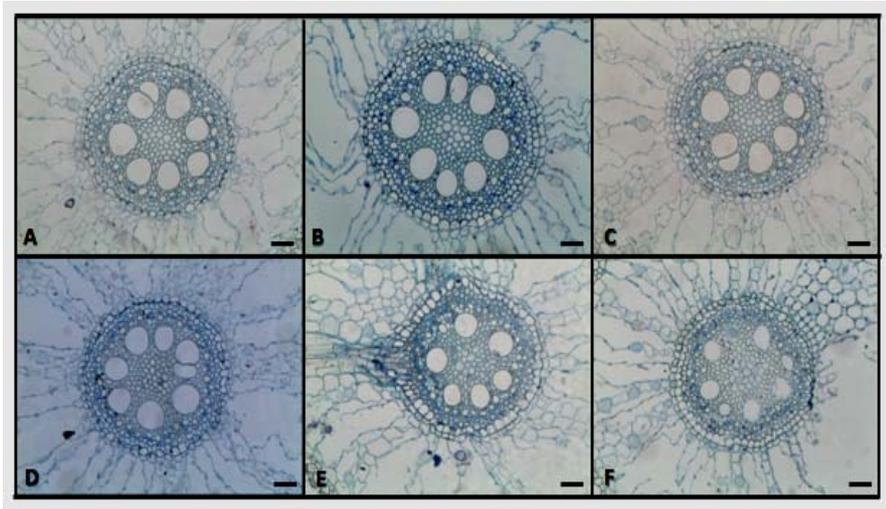


Figura 7 Secções transversais do cilindro central das raízes de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de As em solução. (A= 0,0; B= 0,25; C= 0,50; D= 1,0; E= 2,0 e F= 4,0 mg L<sup>-1</sup> de As). Barra = 50μm

A exoderme e a endoderme aumentaram significativamente o espessamento de acordo com o aumento nas concentrações de As em solução, no caso da endoderme até a concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As (Figuras 9 e 10), o que indica que estas barreiras apoplásticas funcionam como filtros à absorção excessiva deste elemento, sendo consideradas características que conferem à espécie *Brachiaria arrecta* tolerância ao As nas concentrações testadas. No tratamento com adição de 4,0 mg L<sup>-1</sup> de As (Figura 10) pode-se observar, que a organização das células da endoderme não exibiram comportamento similar aos tratamentos com menores concentrações de As, ocorrendo o desarranjo das células da endoderme, o que pode indicar início de toxicidade, causada pelo As.

[U22] Comentário: para

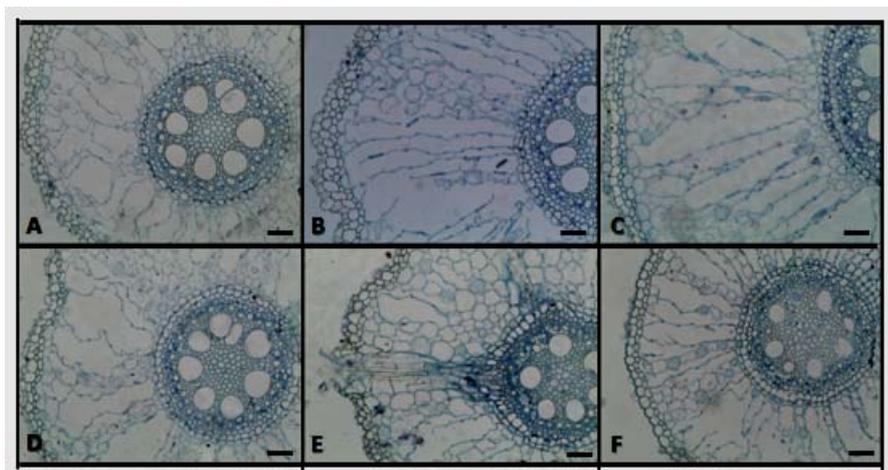


Figura 8 Secções transversais do córtex das raízes de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de As em solução. (A= 0,0; B= 0,25; C= 0,50; D=1,0; E= 2,0 e F= 4,0 mg L<sup>-1</sup> de As). Barra = 50μm

Estudos realizados por Oliveira (2010), com a espécie macrófita aquática, *Pistia stratiotes* (alface d'água), apresentaram aumento significativo nas espessuras da exoderme e endoderme diretamente proporcionais às concentrações crescentes de Cd e Pb e às mesmas concentrações de As testadas nesta pesquisa, indicando que essas barreiras anatômicas funcionam como mecanismos de tolerância da espécie estudada a estes poluentes, podendo ser utilizada para a extração dos mesmos, sendo empregada em programas de fitorremediação, corroborando com os dados encontrados.

A epiderme foi reduzida significativamente de acordo com o aumento das concentrações de As testadas, sendo que na concentração mais alta (4 mg L<sup>-1</sup> de As) ela foi totalmente degradada, apenas com algumas paredes remanescentes aderidas à exoderme (Tabela 3; Figura 9).

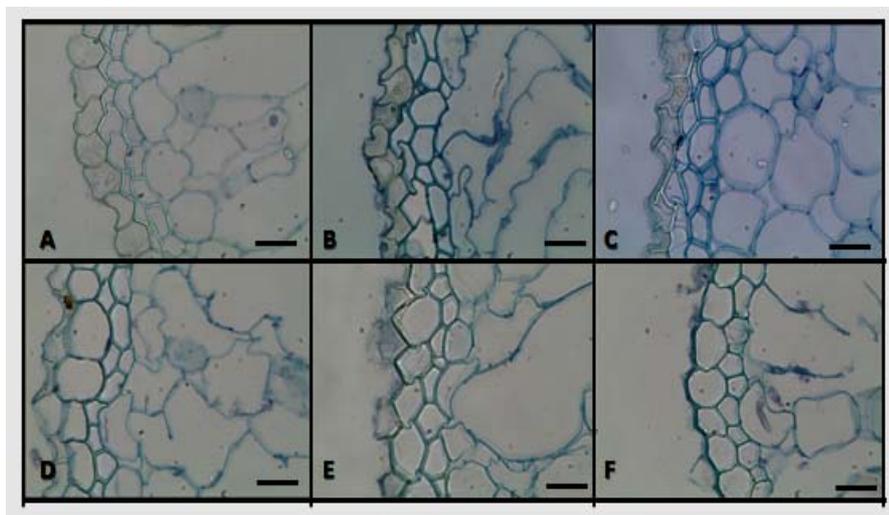


Figura 9 Secções transversais da epiderme e da exoderme das raízes de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de As em solução. A= 0,0; B= 0,25; C= 0,50; D= 1,0; E= 2,0 e F= 4,0 mg L<sup>-1</sup> de As. Barra= 20μm

Segundo Oliveira (2010) em espécies aquáticas, submetidas ao estresse por contaminação de metais pesados, há a tendência de que a epiderme seja substituída pela exoderme, ocorrendo de acordo com o aumento na concentração dos poluentes, devido à necessidade do espessamento deste filtro biológico, como forma de impedir a absorção excessiva dos metais, a qual teria ações tóxicas à planta, ocasionando o rompimento da epiderme e assumindo também o papel de proteção contra o meio externo.

Estes resultados corroboram com os encontrados para *Brachiaria arrecta*, sob contaminação de As, indicando que a mesma tem a capacidade de substituição da epiderme pela exoderme, no intuito de que sejam aumentadas as barreiras anatômicas, demonstrando estratégia de tolerância ao As.

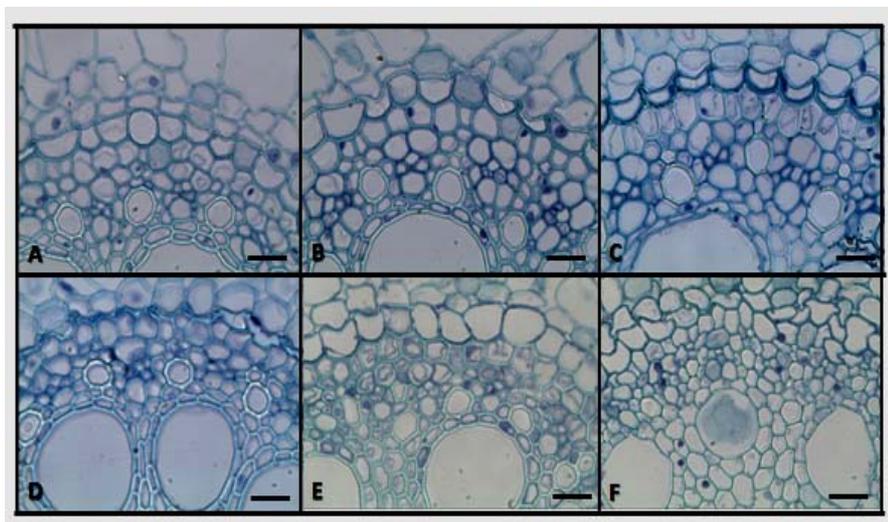


Figura 10 Secções transversais da endoderme das raízes de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de As em solução. A= 0,0; B= 0,25; C= 0,50; D= 1,0; E= 2,0 e F= 4,0 mg L<sup>-1</sup> de As. Barra = 20μm

Os resultados das análises fotossintéticas demonstraram que não houve diferença significativa nas diferentes concentrações de As testadas para a taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração, indicando que as modificações anatômicas apresentadas no tópico anterior, permitem que a mesma tenha plasticidade morfológica nessas condições, sendo tolerante a contaminação de As sob as concentrações testadas.

A ausência de modificações significativas para a condutância estomática (Tabela 2) pode ser explicada pelo aumento significativo na densidade estomática observada na face adaxial das folhas de *B. arrecta*. Isso compensou o menor tamanho dos mesmos, ocasionado pelo menor diâmetro polar dos estômatos encontrados nas mesmas concentrações em ambas as faces, adaxial e abaxial (Tabela 3; Figura 5), contribuindo para a manutenção da taxa fotossintética (Tabela 2).

A transpiração manteve-se inalterada ao longo dos tratamentos, devido o fato de todas as plantas terem sido cultivadas em solução nutritiva o que não determina uma condição ambiental que favoreça a transpiração excessiva.

### 3.2 Análises de crescimento

Com relação às características do crescimento da *B. arrecta* em concentrações de As, na maior concentração testada ( $4,00 \text{ mg L}^{-1}$  de As), a área foliar foi significativamente menor do que nas demais concentrações, bem como o número de folhas produzidas no período experimental, o que consequentemente ocasionou a redução na massa seca total encontrada também nessa concentração (Tabela 5). Porém, a relação entre a massa seca foliar e a área foliar, ou seja, a área foliar específica, não foi significativamente diferente na concentração de ( $4,00 \text{ mg L}^{-1}$  de As), em relação às demais, demonstrando que não houve diferença entre as concentrações testadas na alocação da biomassa da folha por unidade de área. Esse comportamento reflete que, independente da concentração testada, o As não provocou alterações na produção da biomassa foliar e na conservação de nutrientes (Tabela 5), a qual pode ser atribuída como característica de tolerância.

Em estudos realizados com salvinia e aguapé sob contaminação por Cádmio (OLIVEIRA et al., 2001), as taxas de crescimento relativo decresceram intensamente com o aumento da concentração do contaminante Cd na solução nutritiva, indicando a toxicidade deste metal nas concentrações testadas a estas plantas. Portanto, a ausência de diferenças significativas para a taxa de crescimento relativa de *B. arrecta* sob concentrações de As, indica tolerância desta espécie a este contaminante nas concentrações testadas.

As diferentes concentrações testadas também não causaram modificações significativas na taxa de crescimento relativo das plantas, e na

razão de área foliar (Tabela 5), o que unido à alocação de recursos da plantas para a biomassa foliar não alterada significativamente, representada pela área foliar específica, contribui para que a taxa assimilatória líquida permanecesse estatisticamente semelhante em todas as concentrações testadas de As (Tabela 5), indicando plasticidade fisiológica das plantas de *B. arrecta* sob estas condições.

Tabela 5 Características de crescimento de plantas de *Brachiaria arrecta* submetidas a diferentes doses de As em solução nutritiva. MS = massa seca total; AF = área foliar; NF = número de folhas produzidas no período; TCR = taxa de crescimento relativo; RAF = razão de área foliar; TAL = taxa assimilatória líquida; AFE = área foliar específica

As (mg L <sup>-1</sup> )	MS (g)	AF (cm <sup>2</sup> )	NF	TCR (g dia <sup>-1</sup> )	RAF (g cm <sup>-2</sup> )	TAL (g dia <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> )	AFE (g cm <sup>2</sup> )
0,00	1,676 a	153,26 a	13,50 a	0,043 a	65,63 a	2,897 a	220,295 a
0,25	1,915 a	162,89 a	16,00 a	0,049 a	65,63 a	3,285 a	227,321 a
0,50	1,524 a	125,01 a	15,00 a	0,038 a	60,07 a	2,330 a	213,804 a
1,00	1,850 a	157,72 a	20,17 a	0,047 a	67,54 a	3,208 a	246,025 a
2,00	1,650 a	134,61 a	13,67 a	0,042 a	64,38 a	2,942 a	246,359 a
4,00	1,027 b	97,31 b	08,17 b	0,021 a	70,76 a	1,641 a	269,708 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para P<0,05

As variáveis TCR, RAF e TAL nos estudos de Alves et al. (2003) apresentaram um decréscimo significativo na presença de Cu em aguapé, em relação ao tratamento com a presença de Cu, indicando a toxicidade do Cu, pelos efeitos apresentados nos índices de crescimento e desenvolvimento do aguapé submetido a este elemento, o que não foi percebido no presente estudo, indicando tolerância da *B. arrecta* ao As.

### 3.3 Análise do conteúdo de DNA nuclear

Os resultados relacionados à quantificação de DNA por citometria de fluxo não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott (Tabela 6, Figura 11).

Tabela 6 Quantificação de DNA em plantas de *Brachiaria arrecta* submetidas ao As em solução – UFLA, 2011

Arsênio (mg L <sup>-1</sup> )	Conteúdo de DNA (pg)
0,00	2,210000 a
0,25	2,136667 a
0,50	2,110000 a
1,00	2,150000 a
2,00	2,100000 a
4,00	2,086667 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para P<0,05

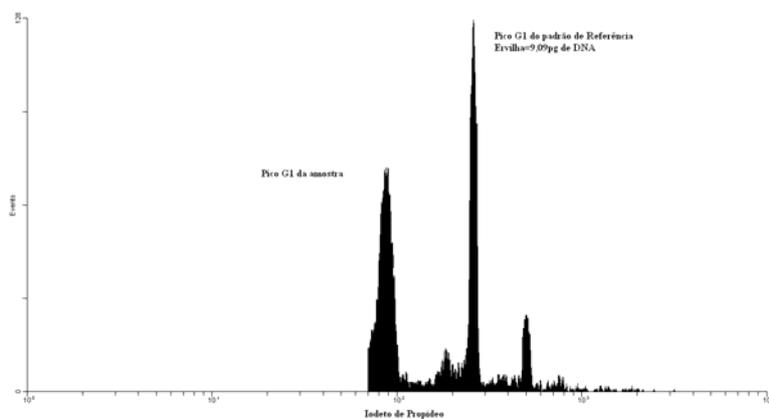


Figura 11 Histograma de citometria de fluxo para quantificação de DNA da *Brachiaria arrecta*, sob diferentes concentrações de As em solução. UFLA, 2011

Portanto, os resultados encontrados no presente estudo, em *B. arrecta* indicam que o As nas concentrações testadas não provocou danos ao conteúdo de DNA. Esta avaliação, no entanto, não permite constatar se o As provoca danos cromossômicos.

#### 4 CONCLUSÃO

B. arrecta possui plasticidade anatômica tanto foliar quanto radicular, bem como fisiológica na presença de arsênio, contudo, sem modificações significativas no conteúdo de DNA.

A espécie *B. arrecta*, não demonstra inibição do crescimento ou taxas de trocas gasosas na presença de arsênio, e as modificações anatômicas encontradas não ilustram sinais de toxicidade.

*B. arrecta* demonstra tolerância para o arsênio nas concentrações testadas.

[U23] Comentário: Sugiro:  
A *Brachiaria...*

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E. et al. Avaliações fisiológicas e bioquímicas de plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*) cultivadas com níveis excessivos de nutrientes. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 21, p. 27-35, 2003.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.
- BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 160 p.
- BRITO, C. J. F. A.; RODELLA, R. A. Caracterização morfo-anatômica da folha e do caule de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 221-228, jun. 2002.
- CARLQUIST, S. **Ecological strategies in xylem evolution**. Berkeley: University of California, 1975.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357**, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2011.
- DENARDI, L.; MARCHIORI, J. N. C. Anatomia ecológica da madeira de *Blepharocalyx salicifolius* (H. B. K.) berg. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, p. 99-110, 2005.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, p. 99-110, 2005.
- FELIPE, R. T. A.; OLIVEIRA, J. A.; LEÃO, G. A. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 245-254, Mar./Apr. 2009.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: Green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 53-64, 2005.

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

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

HUNT, R.; CAUSTON, D. R.; SHIPLEY, B. A Modern tool for classical plant growth analysis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 90, p. 485-488, 2002.

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

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

MARANHO, L. T. et al. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 20, n. 3, p. 615-624, 2006.

MARTINS, D. et al. Caracterização da comunidade de plantas aquáticas de dezoito reservatórios pertencentes a cinco bacias hidrográficas do estado de São Paulo. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 26, n. 1, p. 17-32, 2008.

MELO, E. E. C. et al. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 479-483, Aug. 2009.

MELO, R. F. et al. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, 2009.

MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R.; MAINE, M. A. Response of *Pistia stratiotes* to Heavy Metals (Cr, Ni, and Zn) and Phosphorous. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 58, n. 1, p. 53-61, 2010.

O' BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MC CULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, New York, v. 59, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, C. **Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de cádmio, chumbo e arsênio.** 2010. 120 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.

PEREIRA, F. J. et al. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1649-1656, 2008.

PEREIRA, F. J. et al. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 29, p. 259-267, 2011.

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

WOLFF, G. A. **Avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Salvinia auriculata* Aublet na presença de cádmio e chumbo.** 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

**ARTIGO 2 Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de braquiária do brejo (*Brachiaria arrecta* (Hack.) Stent.), para a tolerância à contaminação por cádmio (Cd)**

## RESUMO

Em muitas áreas industriais de mineração e agrícolas tem-se observado o aumento da deposição de elementos tóxicos no meio aquático, como os metais pesados. Neste contexto, novas propostas economicamente e ecologicamente viáveis para a remoção desses elementos devem ser apresentadas, e dentre elas encontra-se a fitorremediação que utiliza as plantas para realizar esta tarefa. Para isso é necessário o conhecimento sobre a tolerância de diferentes espécies de plantas a esses elementos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características anatômicas foliares, radiculares, e as trocas gasosas, de crescimento e desenvolvimento em plantas de *Brachiaria arrecta* sob diferentes doses de Cd, visando à detecção de mecanismos que proporcionem a provável tolerância dessa espécie a este contaminante, possibilitando a indicação da mesma para programas de fitorremediação de efluentes contaminados por este metal pesado. As plantas de *B. arrecta* foram cultivadas em casa de vegetação vários dias para reprodução clonal. Após os clones foram cultivados em solução nutritiva de Hoagland contendo concentrações de cádmio (Cd), nas concentrações de 0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 mg L<sup>-1</sup>. Após 21 dias de experimento foram coletadas as plantas para a realização de análises anatômicas e as análises de crescimento. As análises feitas pelo IRGA foram realizadas também aos 18 dias do início do experimento. O delineamento utilizado foi DIC, com seis repetições, os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott para P<0,05. Pelo motivo da espécie *B. arrecta* apresentar sintomas de toxicidade nas maiores doses testadas para o Cd, pode ser considerada como bioindicadora da poluição por este contaminante. A espécie possui características plásticas anatômicas e fisiológicas, não sendo suficientes para causar a senescência das plantas, demonstrando seu potencial uso para a aplicação em programas de extração de Cd de ambientes aquáticos.

Palavras-chave: *Brachiaria arrecta*. Fitorremediação. Anatomia vegetal. Cádmio.

**[U24] Comentário:** As plantas de *B. arrecta* foram cultivadas vários dias em casa de vegetação para reprodução clonal. Favor analisar

**[U25] Comentário:** serem

**ARTICLE 2: ANATOMICAL AND PHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF PLANTS FROM BRACHIARIA OF THE SWAMP (*Brachiaria arrecta* (Hack.) Stent.) TOLERANCE FOR CONTAMINATION BY CADMIUM (Cd)**

**ABSTRACT**

In many industrial areas, mining and agriculture has been observed to increase the deposition of toxic elements in the aquatic environment, such as heavy metals. In this context, new proposals economically and ecologically viable for the removal of these elements should be presented, and among them is the phytoremediation which uses plants to accomplish this task. This requires knowledge about the tolerance of different plant species to these elements. This study had as objective to evaluate the anatomical characteristics of leaf, root, and gas Exchange of growth and development in plants of *Brachiaria arrecta* under different levels of Cd, in order to detect the probable mechanisms that provide tolerance these species to this contaminant, providing the indication of the same for phytoremediation programs of wastewater contaminated by this heavy metal. The plants of *B. arrecta* were grown in a greenhouse days to clonal reproduction. After the clones were grown in Hoagland nutrient solution containing concentrations of cadmium (Cd), at concentrations of 0.0; 0.4; 0.8; 1.6; 3.2 and 6.4 mg L<sup>-1</sup>.

After 21 days of the experiment the plants were collected for anatomical and of growth analysis.

The analysis by the IRGA were also carried out at 18 days from the beginning of the experiment. The experimental was completely randomized design, with six replicates, the data were subjected to analysis of variance and Scott-Knott test P <0.05. By reason of the species *B. arrecta* present symptoms of toxicity in the highest doses tested for Cd, can be considered as bioindicators of pollution by this contaminant. The species has plastic characteristics anatomical and physiological, not being sufficient to cause senescence of plants, demonstrating their potential use for application in programs to extract Cd from aquatic environments.

Keywords: *Brachiaria arrecta*. Phytoremediation. Plant anatomy. Cadmium.

[U26] Comentário: Favor verificar o termo para efluentes

[U27] Comentário: Ou many days  
Favor verificar

## 1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos contaminados por metais pesados provenientes de atividades industriais e agrícolas podem ser depurados por meio de processos físicos e químicos, os quais os custos são elevados. Como alternativa a estes recursos tem-se utilizado a técnica de fitorremediação, pela qual é possível obter a remoção destes contaminantes a baixo custo e aplicado a extensas áreas, pois baseia-se na utilização de plantas para a remoção dos contaminantes (GRATÃO et al., 2005).

Por ser um elemento móvel e tóxico, o Cd apresenta elevado potencial de risco ambiental, especialmente em regiões com elevado número de indústrias com curtimento e beneficiamento de couro, justificando estudos que contribuam para o desenvolvimento de técnicas que visem à recuperação de ambientes aquáticos contaminados por este metal (MARQUES et al., 2011).

Por sua vez, as espécies vegetais, quando submetidas a condições de contaminação por metais pesados, como é o caso da exposição ao Cd, apresentam uma série de distúrbios fisiológicos e estruturais que devem ser estudados para determinar e identificar plantas que sejam tolerantes a esta exposição ao Cd, elucidando se é viável que as mesmas sejam aplicadas com esta técnica (MARQUES et al., 2011; MUFARREGE; HADAD; MAINE, 2010).

Em muitos estudos de fitorremediação, as macrófitas aquáticas têm sido utilizadas como extratoras de poluentes encontrados em ambientes aquáticos (SKINNER; WRIGHT; PORTER-GOFF, 2007), sendo preferencialmente indicadas. Uma das espécies mais amplamente encontrada em nosso país, nesse tipo de ambiente é a *Brachiaria arrecta*, a qual possui rápida propagação vegetativa e alta produção de biomassa (MARTINS et al., 2003; MARTINS et

al., 2008), possuindo portanto, potencial para a remoção de contaminantes dos ecossistemas aquáticos.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar as características anatômicas foliares e radiculares, as características de trocas gasosas e de crescimento e desenvolvimento de plantas de *Brachiaria arrecta* sob diferentes concentrações de Cd, visando à detecção de mecanismos de tolerância dessa espécie a este contaminante, possibilitando a indicação da mesma para programas de fitorremediação de efluentes contaminados por este metal pesado.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta do material vegetal**

A coleta do material vegetal (*Brachiaria arrecta*) foi realizada às margens da Represa do Funil, localizada no município de Lavras – MG (44° 55' W; 21° 05' S). Posteriormente, as plantas foram lavadas em água corrente com a finalidade de eliminação de impurezas e selecionadas quanto ao tamanho. Para o período de aclimatização, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, em bandejas plásticas com capacidade para 20L, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total.

### **2.2 Montagem dos experimentos**

Posteriormente ao período de aclimatização, no dia 02 de maio de 2011, as plantas selecionadas quanto ao tamanho, foram repassadas para bandejas plásticas com capacidade de 4L (Figura 1) contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) como aplicada para a aclimatização, adicionada das concentrações de Cd: 0; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; e 6,4 mg L<sup>-1</sup>, na forma de Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O.

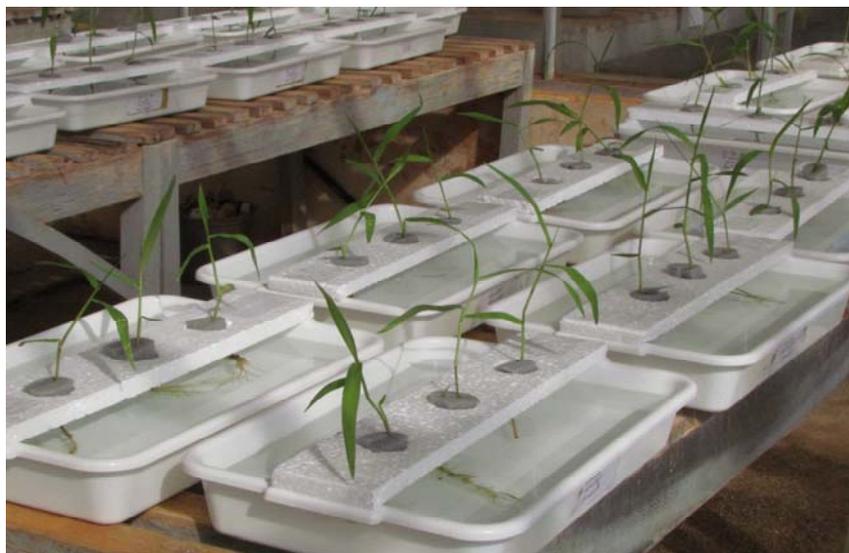


Figura 1 Plantas de *Brachiaria arrecta*, submetidas aos tratamentos de Cd, dispostas em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições com três plantas por bandeja

As concentrações aplicadas nos tratamentos foram calculadas com base na Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, a qual apresenta como valor máximo permitido total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2005 apud OLIVEIRA, 2010). As concentrações de Cd com exceção ao controle foram proporcionais a 100, 200, 400, 800 e 1600 vezes a concentração máxima permitida.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, caracterizado por seis tratamentos e seis repetições, cada um caracterizado por uma bandeja composta de três plantas. O experimento foi conduzido por um período experimental **foi** de 21 dias.

[U28] Comentário: Favor eliminar

### 2.3 Análises anatômicas

Para a realização das análises anatômicas das raízes foi coletada uma planta de cada uma das seis repetições por tratamento. Para análise da anatomia foliar, foi coletada a segunda folha expandida de uma planta de cada uma das seis repetições presentes em cada um dos tratamentos. Imediatamente após a coleta, os órgãos vegetativos foram fixados em formaldeído, etanol 70% e ácido acético glacial (F.A.A. 70%) por um período de 72 horas e posteriormente repassadas para etanol 70° G.L. (JENSEN, 1962). As amostras coletadas foram emblocadas em historesina segundo a metodologia proposta por O'Brien, Feder e Mc Cully (1964).

Cortes transversais foram realizados em micrótomo de deslizamento na zona pilífera das raízes e na região mediana de folhas completamente expandidas das plantas. Após realizados os cortes, as secções foram coradas com azul de toluidina 1% e montados em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá. Também foram realizadas secções, cortes paradérmicos na região mediana das faces abaxial e adaxial das folhas completamente expandidas de plantas sendo corados com Safranina 1% segundo metodologia de Burger e Richter (1991). Foram confeccionadas lâminas semipermanentes em glicerina a 50% e realizada a vedação das lâminas com resina de nitrocelulose.

Para o estudo da anatomia quantitativa foram feitas fotomicrografias com auxílio de uma câmera digital OLYMPUS U-TV1X-2, acoplada ao microscópio OLYMPUS CX41 e com o auxílio do *software* BEL View, as quais foram posteriormente analisadas no *software* para análise de imagens UTHSCSA-Imagetool, medindo-se as características quantitativas dos tecidos em três lâminas por repetição, sendo contabilizados cinco cortes por lâmina e quatro campos por corte.

[U29] Comentário: Favor verificar

Foram analisadas nas raízes, as espessuras da epiderme, exoderme e endoderme. A porcentagem de aerênquima no córtex foi determinada por meio da área total do córtex segundo Pereira et al. (2008), e o somatório das áreas individuais dos aerênquimas. O índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC = diâmetro dos elementos traqueais/número de elementos traqueais) foi calculado segundo Carlquist (1975). Ainda com relação às raízes, foram analisados o número e o diâmetro dos vasos do metaxilema.

Na anatomia das folhas foi calculada a densidade estomática (número de estômatos por  $\text{mm}^2$ ) e foram medidos os diâmetros polares e equatoriais dos estômatos das faces adaxial e abaxial das folhas. Nos cortes transversais foram medidas as espessuras da epiderme das faces adaxial e abaxial, parênquima clorofiliano e pelo somatório dos mesmos foi determinada a espessura do limbo foliar. Foram também contados os conjuntos de células buliformes por mm da secção da folha e também medido a área destes conjuntos, bem como contados o número de feixes vasculares por  $\text{mm}^2$  de folha.

#### **2.4 Análises fotossintéticas e de crescimento**

Ao décimo quinto dia do período experimental foram avaliadas em folhas completamente expandidas (cinco plantas por tratamento) as seguintes características de trocas gasosas foliares das plantas: a taxa fotossintética (A), a condutância estomática ( $g_s$ ) e a transpiração (E), com o uso do analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo Modelo ADC – LCA – 4 (Hoddesdon, UK). As análises foram realizadas a partir das 10h da manhã, com uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos fixados no aparelho para  $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PEREIRA et al., 2011).

A taxa de crescimento relativo (TCR) do sistema radicular e da parte aérea das plantas foi avaliada. A razão de área foliar (RAF), a taxa assimilatória

líquida (TAL) e a área foliar específica (AFE) foram realizadas pelo método proposto por Hunt, Causton e Shipley (2002), a partir da massa seca de raiz, caule e folhas obtidas por meio de pesagem em balança analítica e da área foliar (AF) analisada a partir de fotografias digitais de todas as folhas das plantas no *software* de análise de imagens UTHSCSA-Imagetool.

## **2.5 Análise estatística**

Os dados foram submetidos às análises de variância e ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, com auxílio do *software* estatístico Sisvar.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análises anatômicas

Com relação às análises anatômicas referentes à folha, o limbo foliar teve sua espessura significativamente reduzida em relação ao tratamento sem adição de Cd na solução, na concentração de  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd (Tabela 1). Nas concentrações de  $0,8$  e  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd a espessura do limbo foliar foi também reduzida significativamente em relação à concentração anterior e não apresentou diferenças significativas entre elas. Nas maiores concentrações testadas ( $3,2$  e  $6,4 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd), também não houve diferenças significativas entre elas com relação à espessura do limbo foliar, porém as espessuras encontradas foram menores que nos demais tratamentos, demonstrando que o aumento nas concentrações de Cd em solução promoveu uma menor espessura do limbo foliar (Tabela 1; Figura 2).

As menores espessuras encontradas de acordo com o aumento nas concentrações de Cd em solução são devidas a menor espessura da epiderme da face adaxial e do mesófilo, visto que, para a epiderme adaxial manteve sua espessura estatisticamente inalterada até a concentração de  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd, sendo que na concentração de  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd a espessura foi significativamente menor que nas demais concentrações mais baixas testadas e por sua vez estatisticamente maiores do que as encontradas na concentração de  $6,4 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd, concentração na qual foi observada a menor espessura da epiderme adaxial (Tabela 1; Figura 2).

Tabela 1 Características anatômicas das folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de cádmio (mg L<sup>-1</sup>) em solução. EAD = espessura da epiderme Adaxial; EAB = espessura da epiderme abaxial; PC = espessura do parênquima Clorofiliano; Limbo = espessura do limbo Foliar; N° CCB = número de conjuntos de células buliformes; ACCB = área dos conjuntos de células buliformes (mm<sup>-1</sup> folha); FV= número de feixes vasculares

As mg L <sup>-1</sup>	EAD ( $\mu\text{m}$ )	EAB ( $\mu\text{m}$ )	PC ( $\mu\text{m}$ )	Limbo ( $\mu\text{m}$ )	N° CCB	ACCB ( $\mu\text{m}^2$ )	FV
0	13,95 a	13,25 a	133,78 a	161,18 a	4,84 b	2756,93 b	5,38 b
0,4	13,40 a	10,53 b	112,91b	136,84 b	4,30 b	3211,64 a	5,32 b
0,8	12,58 a	13,40 a	87,90 c	113,88 c	4,80 b	3375,07 a	6,99 a
1,6	12,63 a	10,27 b	89,74 c	112,64 c	4,84 b	1286,22 d	5,91 a
3,2	11,91 b	7,37 c	78,70 d	97,98 d	4,84 b	1901,11 c	6,45 a
6,4	9,21 c	9,04 b	66,60 e	84,85 d	5,91 a	1742,25 c	6,98 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para P<0,05

[U30] Comentário: Favor verificar as siglas com seus respectivos significados

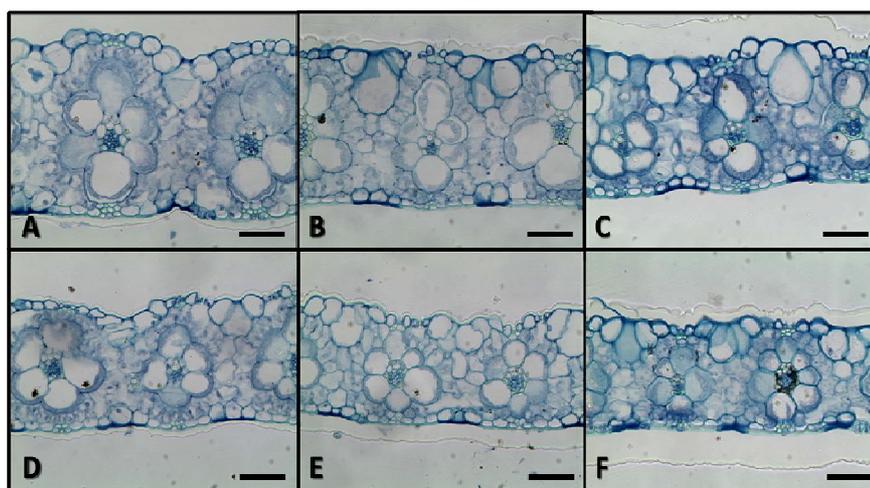


Figura 2 Secções transversais do limbo das folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de Cd em solução. A= 0,0; B= 0,4; C= 0,8; D= 1,6; E= 3,2 e F= 6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Barra = 50 $\mu\text{m}$

Para o mesofilo, a espessura foi significativamente menor na concentração de 0,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd em relação ao tratamento sem Cd, que por sua vez foi estatisticamente maior que nos demais tratamentos. Para as

concentrações de 0,8 e 1,6 mg L<sup>-1</sup> de Cd a espessura do mesofilo não foi alterada significativamente, porém foi maior do que nas maiores concentrações testadas (3,2 e 6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd). Na maior concentração testada (6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd) a espessura do mesofilo foi a menor (Tabela 1; Figura 2).

A espessura da epiderme da face abaxial foi menor estatisticamente nos tratamentos de maiores concentrações (1,6; 3,2 e 6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd), em relação ao tratamento controle (ausência de Cd), bem como no tratamento de 0,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd, somente permaneceu estatisticamente inalterada na concentração de 0,8 mg L<sup>-1</sup> de Cd.

A menor espessura do limbo foliar, ocasionada pela menor espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial e do mesofilo nas maiores concentrações de Cd, indica que o metal afetou a formação destes tecidos, demonstrando toxicidade do mesmo, afetando o desenvolvimento dos tecidos, mas não o suficiente **abortar** a formação da folha.

[U31] Comentário: para abortar

O número de conjuntos de células buliformes foi significativamente **maior** concentração testada (6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd) (Tabela 1), compensando a menor área desses conjuntos encontrados nessa concentração e na concentração de 3,2 mg L<sup>-1</sup> de Cd. A área dos conjuntos de células buliformes foi significativamente menor nas maiores concentrações de Cd testadas (1,6; 3,2 e 6,3 mg L<sup>-1</sup> de Cd) em relação à ausência de Cd e às concentrações de 0,4 e 0,8 mg L<sup>-1</sup> de Cd.

[U32] Comentário: maior que a ...

Brito e Rodella (2002), ao estudarem duas espécies do gênero *Brachiaria*, destacam a importância destas células no dobramento das folhas dessas plantas, como em condições de estresse **como** as encontradas neste estudo.

[U33] Comentário: devido

O número de feixes vasculares nas folhas foi maior na presença de Cd a partir da concentração de 0,8 mg L<sup>-1</sup>, indicando plasticidade anatômica. Isso acarreta uma translocação mais eficiente de fotoassimilados nas situações em

que o mesófilo apresentou menor espessura, colaborando para uma maior eficiência na distribuição de fotoassimilados, nas situações onde sua produção é mais crítica devido à menor espessura dos tecidos especializados, ocasionada pela presença de maiores concentrações de Cd.

Os diâmetros equatoriais dos estômatos presentes na face adaxial não apresentaram diferenças significativas. Já para os diâmetros polares, os diâmetros foram menores estatisticamente apenas nas concentrações de 3,2 e 6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd, nas quais a densidade estomática foi estatisticamente maior que nas demais concentrações testadas (Tabela 2; Figura 3). A maior densidade estomática encontrada nestas concentrações em que foram encontrados os menores diâmetros polares é uma característica que permite a compensação da entrada de CO<sub>2</sub> em uma situação em que esta seria prejudicada.

Tabela 2 Características anatômicas da epiderme das folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes concentrações de Cd em solução. DP = diâmetro polar; DEQ = diâmetro equatorial; DE = densidade estomática

Cádmio (mg L <sup>-1</sup> )	Face Adaxial			Face Abaxial		
	DP (µm)	DEQ (µm)	DE	DP (µm)	DEQ (µm)	DP (µm)
0,00	30,75 a	8,38 a	120,38 b	30,46 a	8,38 a	117,79 a
0,40	30,55 a	7,79 a	121,32 b	31,27 a	8,56 a	119,23 a
0,80	29,65 a	8,03 a	123,19 b	30,76 a	8,78 a	117,27 a
1,60	29,78 a	8,42 a	126,18 b	30,89 a	8,39 a	118,34 a
3,20	27,63 b	7,87 a	159,51 a	31,91 a	8,22 a	115,15 a
6,40	26,83 b	7,57 a	148,33 a	32,67 a	8,15 a	117,44 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para P<0,05

Estudos de Maranhão et al. (2006), envolvendo a espécie *Podocarpus lambertii* sob contaminação por petróleo e de Grisi et al. (2008), com uma cultivar resistente de café sob estresse hídrico, afirmam que uma maior densidade estomática visa manter a captação de CO<sub>2</sub> quando o diâmetro polar dos mesmos é menor, mantendo as condições para uma mesma taxa

fotossintética, corroborando com os dados encontrados. Não foram encontradas diferenças significativas para os diâmetros polares, equatoriais e para a densidade de estômatos para a epiderme na face abaxial da folha (Figura 4; Tabela 2). Soares et al. (2005), relatam que pela exposição direta à luz, a face adaxial das folhas pode ser mais afetada do que abaxial, corroborando com os dados encontrados.

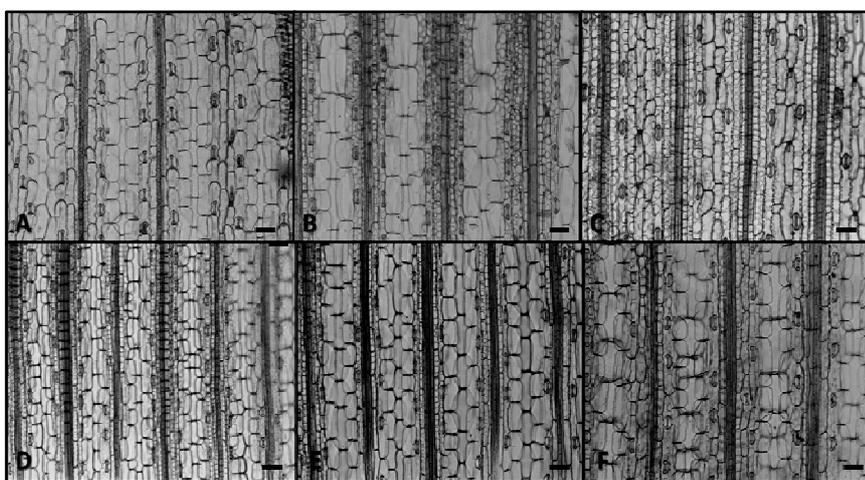


Figura 3 Secções paradérmicas da face adaxial de folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de Cd em solução. A= 0,0; B= 0,4; C= 0,8; D= 1,6; E= 3,2 e F= 6,4 mg L<sup>-1</sup>. Barra = 50μm

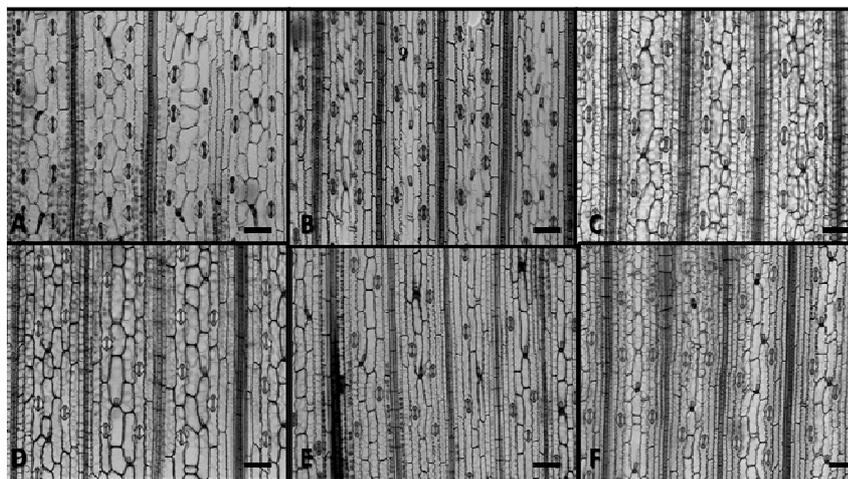


Figura 4 Secções paradérmicas da face abaxial de folhas de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de Cd em solução. A= 0,0; B= 0,4; C= 0,8; D= 1,6; E= 3,2 e F= 6,4 mg L<sup>-1</sup>. Barra = 50μm

Portanto, este comportamento indica que o Cd ocasiona sintomas de toxicidade nas folhas de *B. arrecta* em condições de exposição ao Cd nas concentrações testadas, indicando que com o aumento das concentrações a tolerância desta espécie ao elemento em questão diminui.

Com relação à anatomia radicular, o cilindro vascular manteve-se com o número de vasos de metaxilema estatisticamente semelhante, e os mesmos não apresentaram diferenças significativas em seu diâmetro em relação ao tratamento sem adição de Cd na solução (Tabela 3; Figura 5), indicando que o fluxo de nutrientes e do elemento Cd para a parte aérea não foi afetado, indicando que a translocação de Cd não foi afetada, o que pode ter sido o motivo do desencadeamento dos sintomas de toxicidade causados pelas concentrações crescentes de Cd.

[U34] Comentário: Sugiro que use um sinônimo

Tabela 3 Características anatômicas radiculares de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de Cd em solução. EP = espessura da epiderme, EX = espessura de exoderme, ED = espessura da endoderme, PAR =

Porcentagem de aerênquimas em relação ao córtex; N° VMX = número de vasos de metaxilema; DVMX = diâmetro de vasos de metaxilema; IVC = índice de vulnerabilidade do sistema vascular (índice de vulnerabilidade de Carlquist)

[U35] Comentário: Favor verificar

Cádmio (mg L <sup>-1</sup> )	EP (μm)	EX (μm)	ED (μm)	PAR (%)	N° VMX	DVMX (μm)	IVC (%)
0,00	16,15 a	18,08 c	12,39 b	33,48 a	8,00 a	66,18 a	8,27 a
0,40	15,12 a	27,66 b	17,40 a	31,40 a	8,00 a	65,94 a	8,24 a
0,80	16,39 a	28,25 b	16,88 a	30,62 a	9,00 a	63,42 a	7,04 a
1,60	12,27 b	28,54 b	17,40 a	31,87 a	8,00 a	66,19 a	8,27 a
3,20	10,14 b	28,97 b	15,00 a	30,43 a	8,00 a	66,75 a	8,34 a
6,40	10,03 b	31,00 a	16,98 a	29,18 a	8,00 a	62,98 a	7,87 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para P<0,05

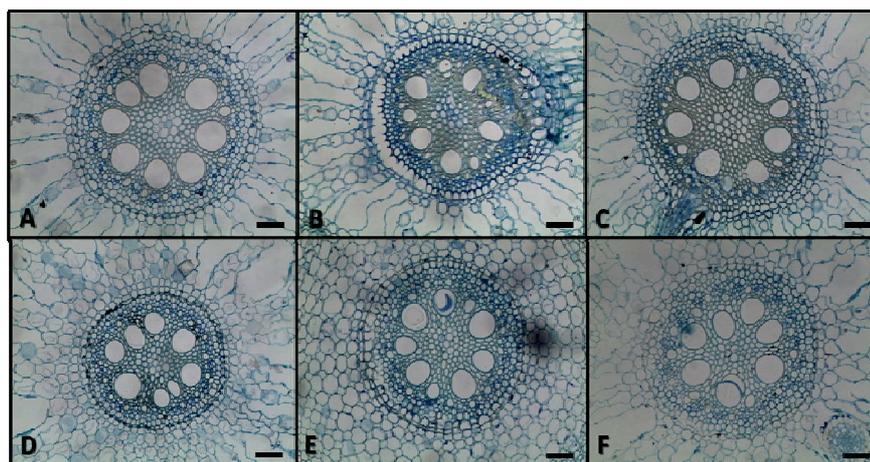


Figura 5 Secções transversais do cilindro central das raízes de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de Cd em solução. A= 0,0; B= 0,4; C= 0,8; D= 1,6; E= 3,2 e F= 6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Barra = 50μm

O índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC), não apresentou diferença estatisticamente significativa para nenhuma das concentrações testadas, devido à ausência de diferenças significativas dos diâmetros e números de vasos de metaxilema, mantendo a segurança na condutividade hidráulica para todas as concentrações testadas, não comprometendo o fluxo de seiva bruta.

Segundo Denardi e Marchiori (2005), um maior IVC, indicaria uma maior vulnerabilidade do sistema de condução de água e nutrientes da planta, por maior risco de ocorrência de embolia. No entanto, a não alteração do IVC nas condições testadas, colabora para o fluxo de água e nutrientes semelhantes na ausência ou presença de Cd.

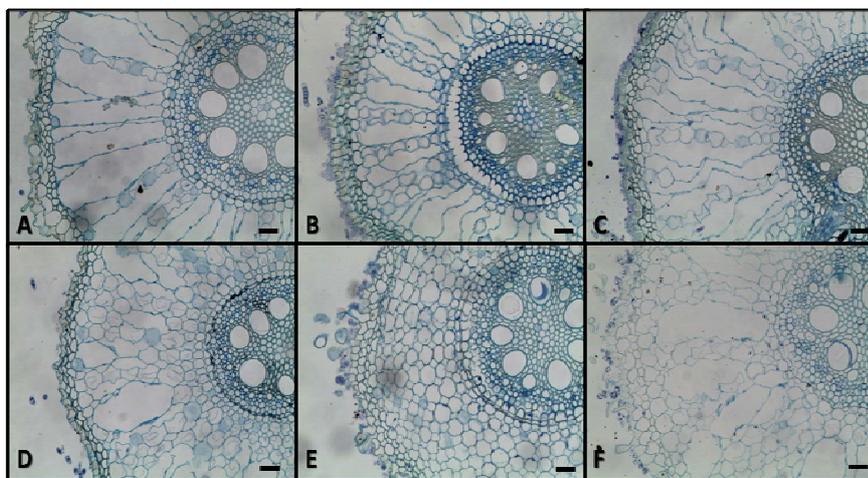


Figura 6 Secções transversais do córtex das raízes de *Brachiaria arrceta*, sob diferentes doses de Cd em solução. A= 0,0; B= 0,4; C= 0,8; D= 1,6; E= 3,2 e F= 6,4 mg L<sup>-1</sup>. Barra = 50μm

A exoderme e a endoderme aumentaram significativamente o espessamento nos tratamentos na presença de Cd em relação ao tratamento sem adição de Cd. No entanto, a espessura da endoderme não apresentou diferenças significativas na presença de Cd. Já o espessamento da exoderme não diferiu significativamente na presença de Cd até a concentração de 3,2 mg L<sup>-1</sup> de Cd, e o maior espessamento foi encontrado na maior concentração de Cd (6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd) (Figuras 5, 6 e 7). O aumento da espessura destes tecidos indica que estes funcionam como barreiras apoplásticas, que agem como filtros à absorção excessiva de Cd, sendo consideradas estratégias de plasticidade anatômica, as

quais conferem a espécie *Brachiaria arrecta* tolerância ao Cd nas concentrações testadas.

Oliveira (2010) ao estudar a macrófita aquática, *Pistia stratiotes*, relatou aumento significativo nas espessuras da exoderme e endoderme diretamente proporcionais às concentrações crescentes de Cd em solução, indicando que por essas barreiras anatômicas funcionarem como mecanismos de tolerância da espécie estudada a estes poluentes, a mesma pode ser utilizada para a extração destes metais pesados, sendo empregada em programas de fitorremediação, corroborando com os dados encontrados. Marques et al. (2011) ao estudarem plantas de eucalipto expostas ao Cd afirmam que o aumento em espessura deste tecido pode representar menor translocação do Cd para a parte aérea, diminuindo os efeitos tóxicos deste metal ao sistema fotossintético.

A epiderme foi reduzida significativamente a partir da concentração de  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo que a partir da concentração de  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd a espessura da epiderme foi estatisticamente menor do que nas concentrações anteriores, porém estatisticamente semelhante a das concentrações mais altas que foram testadas ( $3,2$  e  $6,4 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd) (Tabela 3; Figura 8).

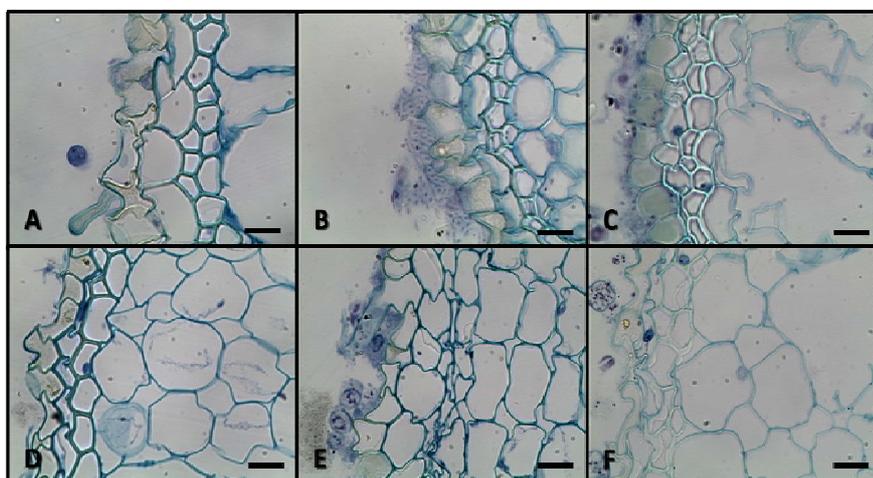


Figura 7 Secções transversais da epiderme e da exoderme das raízes de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de Cd em solução. A= 0,0; B= 0,4; C= 0,8; D= 1,6; E= 3,2 e F= 6,4 mg L<sup>-1</sup>. Barra = 20μm

A diminuição da espessura da epiderme pode indicar início de toxicidade causada pelo Cd, indicando que em altas concentrações de Cd a formação das células epidérmicas pode ser comprometida por toxicidade. Em estudos realizados por Marques et al. (2011) verificaram que o Cd afetou significativamente a espessura dos tecidos radiculares, e o mesmo autor afirma que tanto as alterações de espessura quanto à constituição química das barreiras apoplásticas são adaptações importantes para a tolerância das plantas a fatores de estresse.

A porcentagem de aerênquimas no córtex não foi afetada pelas diferentes concentrações de Cd testadas, indicando que a permanência desta espécie em ambientes aquáticos contaminados por Cd não afeta sua capacidade de flutuação quanto à presença de aerênquimas, que são estruturas fundamentais para a sobrevivência destas espécies vegetais na água.

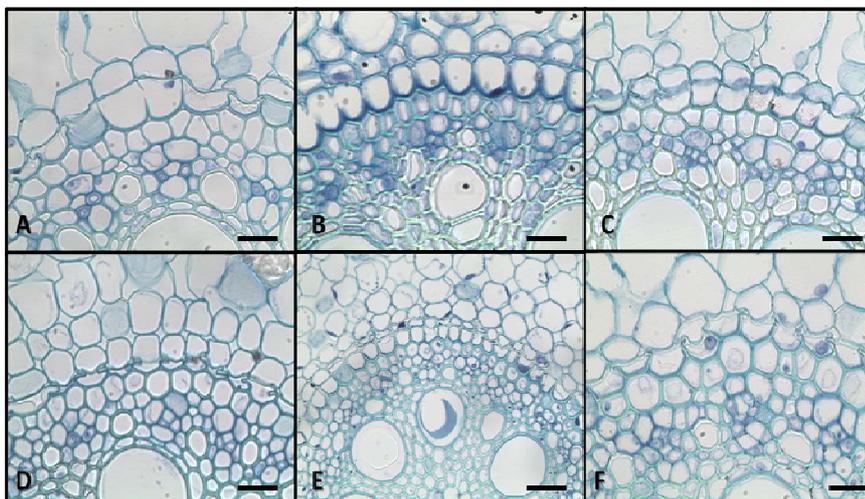


Figura 8 Secções transversais da endoderme das raízes de *Brachiaria arrecta*, sob diferentes doses de Cd em solução. A= 0,0; B= 0,4; C= 0,8; D= 1,6; E= 3,2 e F= 6,4 mg L<sup>-1</sup>. Barra = 20µm

### 3.2 Trocas gasosas e análise de crescimento

Os resultados das análises fotossintéticas demonstraram que não houve diferença significativa nas diferentes concentrações de Cd testadas para a taxa fotossintética, embora tenha ocorrido a menor espessura dos tecidos fotossintéticos nas maiores concentrações testadas, porém o número de feixes vasculares responsáveis pela distribuição dos fotossintatos tenha aumentado, nas maiores concentrações (Tabela 4). A não alteração da taxa fotossintética, demonstra tolerância da espécie ao metal.

Tabela 4 Análises fotossintéticas em plantas de *Brachiaria arrecta* submetidas ao Cd em solução. A= taxa fotossintética; gs= condutância estomática; E= transpiração

Cádmio (mg L <sup>-1</sup> )	A ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	gs ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	E ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
0,00	1,282500 a	11,947500 b	0,215000 b
0,40	1,977500 a	8,9625000 b	0,205000 b
0,80	2,227500 a	13,442500 b	0,342500 b
1,60	1,632500 a	4,4800000 b	0,227500 b
3,20	2,582500 a	25,387500 a	0,585000 a
6,40	3,355000 a	20,907500 a	0,307500 b

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para  $P < 0,05$

[U36] Comentário: Favor verificar

No entanto, a condutância estomática e a transpiração foram afetadas significativamente, sendo maiores nas maiores concentrações testadas (3,2 e 4,6 mg L<sup>-1</sup> de Cd) (Tabela 4), podendo ser explicada pelo aumento significativo na densidade estomática observada na face adaxial das folhas de *B. arrecta*, terem compensado o menor tamanho dos mesmos, ocasionado pelo menor diâmetro polar dos estômatos encontrados nas mesmas concentrações em ambas as faces, adaxial e abaxial (Tabela 2; Figuras 4 e 5), contribuindo para o aumento desses parâmetros (Tabela 4), porém, para a manutenção da taxa fotossintética, devido ao menor espessamento do clorênquima (Tabela 1).

[U37] Comentário: Favor analisar

Com relação às características do crescimento da *B. arrecta* em concentrações de Cd, o número de folhas desenvolvidas no período influenciou diretamente na massa seca total das plantas (Figura 5), exibindo o mesmo comportamento, o qual foi uma redução significativa drástica no número de folhas na presença de Cd, em relação à ausência de Cd, não apresentando diferenças significativas entre as concentrações de Cd até a concentração de 3,2 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Na concentração de 6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd houve maior formação de folhas que nas menores concentrações de Cd, porém significativamente inferior que na ausência de Cd. Por consequência, a área foliar apresentou o mesmo comportamento devido ao número de folhas desenvolvidas no período

experimental. O mesmo comportamento foi verificado para a massa seca total (Tabela 5).

Porém, a relação entre a massa seca foliar e a área foliar, ou seja, a área foliar específica, não foi significativamente diferente em nenhuma concentração testada, demonstrando que não houve diferença entre as concentrações testadas na alocação da biomassa da folha por unidade de área, o que reflete que independente da concentração testada o Cd não provocou alterações na produção da biomassa foliar e na conservação de nutrientes (Tabela 5), a qual pode ser atribuída como característica de tolerância. Portanto, embora tenha ocorrido à redução na massa seca total, devido ao menor número de folhas desenvolvidas no período a relação entre elas se manteve a mesma, por exibirem comportamentos semelhantes.

Tabela 5 Características de crescimento de plantas de *Brachiaria arrecta* submetidas a diferentes doses de Cd em solução nutritiva. MS= massa seca total; AF= área foliar; NF= número de folhas produzidas no período; TCR= taxa de crescimento relativo; RAF= razão de área foliar; TAL= taxa assimilatória líquida; AFE= área foliar específica

Cádmio mg L <sup>-1</sup>	MS	NF	AF (cm <sup>2</sup> )	TCR (g dia <sup>-1</sup> )	RAF (g cm <sup>-2</sup> )	TAL (g dia <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> )	AFE (g cm <sup>2</sup> )
0,00	1,67 a	17,00 a	127,70 a	0,12 a	104,39 a	12,21 a	351,23 a
0,40	0,17 c	00,50 c	018,34 c	0,04 c	96,13 a	03,75 b	340,77 a
0,80	0,50 c	01,17 c	024,16 c	0,06 b	93,08 a	05,33 b	331,76 a
1,60	0,67 c	01,33 c	024,71 c	0,06 b	91,22 a	05,59 b	311,18 a
3,20	0,50 c	01,00 c	022,77 c	0,06 b	88,96 a	05,64 b	297,76 a
6,40	1,00 b	06,83 b	045,63 b	0,08 b	99,60 a	07,50 b	340,56 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para P<0,05

[U38] Comentário: Favor verificar a ordem perante o título

Em estudos realizados com salvinia e aguapé sob contaminação por Cádmio por Oliveira et al. (2011), verificaram que as taxas de crescimento relativo decresceram intensamente com o aumento da concentração do contaminante Cd na solução nutritiva, indicando a toxicidade deste metal nas

concentrações testadas a estas plantas, portanto, corroborando com os dados encontrados neste estudo, indicando que *B. arrecta* sob concentrações de Cd, desenvolve sintomas de toxicidade provocados por este metal.

As diferentes concentrações testadas causaram modificações significativas na taxa de crescimento relativa das plantas, sendo que na presença do Cd a TCR foi significativamente reduzida, ou seja, a área útil para a realização dos processos fotossintéticos, contribuindo para que a taxa assimilatória líquida também fosse reduzida significativamente na presença de Cd, indicando toxicidade nas plantas de *B. arrecta* sob estas condições.

Contudo, a razão de área foliar não afetada significativamente pelas diferentes concentrações de Cd, demonstrando que a área responsável pela interceptação de energia luminosa e captação de CO<sub>2</sub> pela matéria seca total, ou seja, a área foliar que esta sendo usada pela planta para produzir um grama de matéria seca não foi afetada, demonstrando que embora a *B. arrecta* tenha apresentado sintomas de toxicidade para os demais parâmetros, possui ainda até a concentração mais alta de Cd testada, biomassa vegetal suficiente para manter o processo fotossintético e sobreviver.

As variáveis TCR, RAF e TAL nos estudos de Alves et al. (2003) apresentaram um decréscimo significativo na presença de Cu em aguapé, em relação ao tratamento com a presença de Cu, indicando a toxicidade do Cu, pelos efeitos apresentados nos índices de crescimento e desenvolvimento do aguapé submetido a este elemento, corroborando com os dados apresentados no presente estudo, indicando toxicidade da *B. arrecta* ao Cd.

#### 4 CONCLUSÃO

*Brachiaria arrecta* apresenta sintomas de toxicidade nas maiores concentrações de cádmio testadas, e por esse motivo, pode ser considerada uma bioindicadora da poluição por Cd.

No entanto possui plasticidade anatômica e fisiológica exibindo modificações que não causam a morte das plantas na presença das concentrações de Cd testadas.

Os principais sintomas de toxicidade do cádmio em *Brachiaria arrecta* são redução do crescimento e da espessura dos tecidos foliares.

## REFERÊNCIAS

- BRITO, C. J. F. A.; RODELLA, R. A. Caracterização morfo-anatômica da folha e do caule de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 221-228, jun. 2002.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelcolorung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.
- BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 160 p.
- CARLQUIST, S. **Ecological strategies in xylem evolution**. Berkeley: University of California, 1975.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357**, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2011.
- DENARDI, L.; MARCHIORI, J. N. C. Anatomia ecológica da madeira de *Blepharocalyx salicifolius* (H. B. K.) Berg. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, p. 99-110, 2005.
- GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 53-64, 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./dez. 2008.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).
- HUNT, R.; CAUSTON, D. R.; SHIPLEY, B. A Modern Tool for Classical Plant Growth Analysis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 90, p. 485-488, 2002.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principle and practice**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962.408 p.

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

MARANHO, L. T. et al. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botanica Brasílica**, Feira de Santana, v. 20, n. 3, p. 615-624, 2006.

MARQUES, T. C. L. L. S. M. et al. **Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de eucalipto expostas ao cádmio**. Revista *Árvore*, Viçosa, MG, v. 35, n. 5, p. 997-1006, Sept./Oct. 2011.

MARTINS, D. et al. Caracterização da comunidade de plantas aquáticas de dezoito reservatórios pertencentes a cinco bacias hidrográficas do estado de São Paulo. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 26, n. 1, p. 17-32, 2008.

\_\_\_\_\_. Caracterização química das plantas aquáticas coletadas no reservatório de Salto Grande (Americana – SP). **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 21, p. 21-25, 2003.

MELO, E. E. C. et al. **Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution**. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 479-483, Aug. 2009.

MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R.; MAINE, M. A. Response of *Pistia stratiotes* to Heavy Metals (Cr, Ni, and Zn) and Phosphorous. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 58, n. 1, p. 53-61, 2010.

O' BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MC CULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, New York, v. 59, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, C. **Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de cádmio, chumbo e arsênio**. 2010. 120 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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

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**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2011.

PEREIRA, F. J. et al. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 29, p. 259-267, 2011.

PEREIRA, F. J. et al. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1649-1656, 2008.

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

SOARES, M. L. et al. Caracterização farmacognóstica de folhas de Davilla elliptica St. Hil. (Dilleniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 352-360, out./dez. 2005.