

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
BIOINDICADOR E FITORREMEDIADOR DE  
*Salvinia auriculata* AUBLET NA PRESENÇA  
DE CÁDMIO E CHUMBO**

**GRAZIELE WOLFF DE ALMEIDA**

**2009**

**GRAZIELE WOLFF DE ALMEIDA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOINDICADOR E  
FITORREMEIADOR DE *Salvinia auriculata* AUBLET NA  
PRESENÇA DE CÁDMIO E CHUMBO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Ecologia Aplicada, área de concentração em Ecologia e Conservação de Paisagens Fragmentadas e Agrossistemas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

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

Almeida, Grazielle Wolff de.

Avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Salvinia auriculata* Aublet na presença de cádmio e chumbo.

/ Grazielle Wolff de Almeida. – Lavras : UFLA, 2009.

72 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. Planta aquática. 2. Metal pesado. 3. Morfoanatomia. 4.  
Ultraestrutura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 628.5

**GRAZIELE WOLFF DE ALMEIDA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOINDICADOR E  
FITORREMEDIADOR DE *Salvinia auriculata* AUBLET NA  
PRESENÇA DE CÁDMIO E CHUMBO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências programa de Pós-graduação em Ecologia, área de concentração em Ecologia e Conservação de Paisagens Fragmentadas e Agrossistemas, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 13 de fevereiro de 2009.

**Prof. Dr. João José Granate de Sá e Melo Marques**  
**Prof. Dra. Flávia Freitas Coelho**

**UFLA**  
**UFLA**

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

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**

*A DEUS ofereço tudo o que tenho e o que sou.*

*A Ele toda honra e toda glória.*

*A meu esposo, amigo, companheiro e eterno namorado, Giuslan.*

*A meus pais, Toninho e Elen, exemplos de vida.*

*A meu irmão, Mateus, que sempre acreditou em mim.*

*Dedico essa vitória.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me capacitado e me dado forças em toda a caminhada.

A meu esposo, Giuslan, pela parceria e ajuda em todo o trabalho.

A meus pais, Elen e Toninho, por lutarem para que hoje eu estivesse aqui.

A meu irmão, Mateus, que, mesmo a distância, sempre me apoiou.

A meus sogros, Jair e Lúcia, e toda a família Pereira, que nos apoiaram nessa decisão.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização mestrado.

À Capes, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao CNPq, pelo fomento do trabalho.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pela orientação, ensinamentos e amizade.

À professora Janice Guedes de Carvalho, pela coorientação e ajuda com os experimentos.

Ao professor João José G. S. M. Marques, pela coorientação e auxílio durante todo o processo.

Aos membros da banca examinadora, professores João José e Flávia F. Coelho, pela disponibilidade e contribuições valiosas.

A todos os professores do Setor de Ecologia, pela amizade, apoio e ensinamento, em especial ao Prof. Júlio N. C. Louzada, pelas valiosas e construtivas ideias.

Ao professor Eduardo Alves (DFP), pela disposição e orientação nas análises de microscopia.

A Heloisa, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Ultra-Estrutura (DFP), pela imensa ajuda no preparo das amostras.

A todos do laboratório de Botânica Estrutural, em especial aos amigos Cynthia e Renata, pelas horas divertidas e de muito trabalho e Jessé e Fabrício, pela colaboração e dicas preciosas.

A todos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (DCS), pela paciência e ajuda.

A todos do Laboratório de Pedologia e Geoquímica Ambiental (DCS), em especial a Livia Botelho e João Gualberto, pelo auxílio nas análises.

Aos amigos da turma, Alexandre, Andréia, Arthur, Cecília, Elton e Marianna, pelos ótimos e divertidos momentos que passamos. Com certeza, vocês são inesquecíveis!

A Thaisa, pelo socorro em todas as horas e pelas boas conversas. Sentirei sua falta!

Aos eternos amigos e conterrâneos, Fabiano e Tália, pela presença e carinho.

Aos novos amigos feitos nessa jornada, Cris, Dayane, Nathi, Márlon, Marco Aurélio, Yuri, Flávia, Dani, Vaneska, Goneis, Guto, Hisaías, Grazi, Lud, Fábio, Cléver, Carla, Robson, Thaís, Amanda, Chesse e Mariana.

Aos meus queridos alunos da Biologia, que me fizeram sentir uma verdadeira professora durante a docência voluntária, obrigada pelo carinho.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO.....  | i  |
| ABSTRACT .....   | ii |
| CAPÍTULO 1.....  | 1  |
| 1 Introdução Geral .....   | 2  |
| 2 Referencial teórico.....   | 3  |
| 2.1 Contaminação por metais pesados .....  | 3  |
| 2.1.1 Chumbo .....   | 4  |
| 2.1.2 Cádmio .....   | 5  |
| 2.2 Fitorremediação .....  | 7  |
| 2.3 Indicador ecológico e biomonitoramento.....  | 9  |
| 2.4 Plantas aquáticas .....  | 10 |
| 2.3.1 <i>Salvinia auriculata</i> Aublet.....   | 12 |
| 3 Referências bibliográficas.....  | 14 |
| CAPÍTULO 2 - Uso de <i>Salvinia auriculata</i> como bioindicador: crescimento clonal e respostas estruturais dependentes das concentrações de cádmio.... | 19 |
| Resumo .....   | 20 |
| Abstract.....  | 20 |
| 1 Introdução .....   | 21 |
| 2 Materiais e métodos.....   | 23 |
| 2.1 Instalação do bioensaio .....  | 23 |
| 2.2 Crescimento clonal .....   | 25 |
| 2.3 Respostas morfológicas e anatômicas.....   | 25 |
| 2.4 Análise estatística .....  | 26 |
| 3 Resultados e discussão.....  | 26 |
| 3.1 Crescimento clonal .....   | 26 |
| 3.2 Respostas morfológicas e anatômicas.....   | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 4 Conclusões .....   | 32 |
| 5 Referências bibliográficas.....  | 33 |
| CAPÍTULO 3 - Efeitos da concentração de cádmio sobre a ultraestrutura de<br>folhas submersas de <i>Salvinia auriculata</i> Aublet..... | 37 |
| Resumo .....   | 38 |
| Abstract.....  | 38 |
| 1 Introdução .....   | 39 |
| 2 Materiais e métodos.....   | 41 |
| 2.1 Instalação do experimento.....   | 41 |
| 2.2 Bioconcentração de cádmio.....   | 42 |
| 2.3 Modificações estruturais nas folhas submersas .....  | 43 |
| 2.4 Análise estatística .....  | 43 |
| 3 Resultados e discussão.....  | 44 |
| 3.1 Bioconcentração de cádmio em <i>S. auriculata</i> .....  | 44 |
| 3.2 Efeito da bioconcentração de cádmio na morfologia e na ultraestrutura<br>das folhas submersas de <i>Salvinia auriculata</i> .....  | 47 |
| 4 Conclusão .....  | 49 |
| 5 Referências bibliográficas.....  | 50 |
| CAPÍTULO 4 - Potencial fitorremediador de <i>Salvinia auriculata</i> na presença<br>de chumbo.....                                     | 54 |
| Resumo .....   | 55 |
| Abstract.....  | 55 |
| 1 Introdução .....   | 56 |
| 2 Materiais e métodos.....   | 57 |
| 2.1 Instalação dos experimentos.....   | 57 |
| 2.2 Crescimento clonal e alocação de biomassa.....   | 59 |
| 2.2 Efeito do chumbo na ultraestrutura de <i>S. auriculata</i> .....   | 59 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3 Análise do acúmulo de chumbo .....                               | 59 |
| 2.4 Análise dos dados .....  | 60 |
| 3 Resultados e discussão .....                                       | 61 |
| 3.1 Crescimento clonal e alocação de biomassa .....                  | 61 |
| 3.2 Efeito do chumbo na ultraestrutura de <i>S. auriculata</i> ..... | 63 |
| 2.3 Acúmulo de chumbo por <i>S. auriculata</i> .....                 | 66 |
| 4 Conclusão .....  | 69 |
| 5 Referências bibliográficas .....                                   | 69 |

## RESUMO

ALMEIDA, Grazielle Wolff de. **Avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Salvinia auriculata* Aublet na presença de cádmio e chumbo.** 2009. 72 p. (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A contaminação do ecossistema aquático por metais pesados tem sido motivo de preocupação de pesquisadores e órgãos governamentais envolvidos no controle de poluição. Entre os metais de maior toxicidade encontram-se o cádmio e o chumbo, presentes em vários tipos de efluentes industriais. Visando minimizar o impacto gerado pelo lançamento desses efluentes em corpos d'água, a fitorremediação tem sido um instrumento de controle de áreas contaminadas por metais pesados. Por meio desta técnica podem-se recuperar grandes áreas a um baixo custo. Plantas aquáticas têm sido utilizadas em pesquisas ecológicas tanto como bioindicadores da qualidade de água quanto como extratoras de metais pesados, pois são capazes de absorver várias substâncias inorgânicas do corpo d'água, sendo então consideradas fitorremediadoras. Porém, a resposta apresentada por essas plantas, quando submetidas a ambientes contaminados, é muito variável, tornando-se necessário testar o comportamento de cada espécie frente à contaminação. Neste trabalho, objetivou-se estudar o comportamento da planta aquática *Salvinia auriculata*, medindo o crescimento e as características morfoanatômicas das plantas submetidas a diferentes concentrações de Cd e Pb, bem como o teor destes metais acumulados em seus tecidos, a fim de estabelecer parâmetros para a sua utilização no biomonitoramento e na remediação de águas contaminadas. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Universidade Federal de Lavras, onde as plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hogland-Arnon 20% e submetidas a diferentes concentrações dos metais, separadamente. Foram realizadas análises do acúmulo dos metais por meio de absorção atômica, análises anatômicas por microscopia eletrônica e de luz e avaliação do crescimento e da biomassa. Observou-se que *S. auriculata* apresentou danos morfoanatômicos e redução em sua biomassa e crescimento populacional quando exposta ao Cd, além de acumular concentrações consideráveis do metal em seus tecidos. Na presença do Pb, a planta também acumulou altas concentrações do metal, principalmente na parte submersa, porém, não apresentou danos visíveis, mostrando-se resistente a esse metal. Em relação ao Cd, essa espécie pode ser utilizada como indicador ecológico da

---

\* Comitê Orientador: Evaristo Mauro de Castro – UFLA (orientador), Janice Guedes de Carvalho – UFLA (coorientador), João José G. S. M. Marques - UFLA (coorientador)

presença desse metal, enquanto que exposta ao Pb possui potencial como espécie fitorremediadora.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Grazielle Wolff de. **Evaluation of the bioindicator and phytoremediator potential of *Salvinia auriculata* Aublet in the presence of cadmium and lead.** 2009. 72 p. (Master in Applied Ecology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Aquatic ecosystem's contamination by heavy metals has been motive of concern of researchers and government agencies involved in pollution control. Among the metals of greatest toxicity are the cadmium and lead, found in various types of industrial effluents. Aiming to minimize the impact generated by the release of effluents into water bodies, the phytoremediation has been a tool for control of areas contaminated by heavy metals. By this technique you may recover large areas at a low cost. Aquatic plants have been used in ecological research as much as bioindicators of water quality and as extraction of heavy metals, they are able to absorb various inorganic substances from the water body, then being considered phytoremediator. However, the response shown by these plants, when subjected to contaminated environments, is very variable, making it necessary to test the behavior of each species against contamination. This work aimed to study the behavior of the aquatic plant *Salvinia auriculata*, measuring the growth and morphological and anatomical characteristics of plants subjected to different concentrations of Cd and Pb, as well as the content of these metals accumulated in their tissues in order to establish parameters for their use in biomonitoring and remediation of contaminated water. The experiments were conducted in a greenhouse at the Federal University of Lavras, where the plants were grown in nutrient solution of Hogland & Arnon, 20% and separately subjected to different concentrations of the metals. We performed analyses of the accumulation of metals by atomic absorption, analyses by anatomical light and electron microscopy and assessment of growth and biomass. It was observed that *S. auriculata* showed morphological and anatomical damage and reduction in their biomass and population growth when exposed to Cd, besides accumulating considerable concentrations of metal in their tissues. In the presence of Pb the plants also accumulated high concentrations of metal, mainly in the underground, however,

---

\* Guidance Committee: Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Adviser), Janice Guedes de Carvalho – UFLA (Co-adviser), João José G. S. M. Marques - UFLA (Co-adviser)

showed no visible damage and it is resistant to this metal. Related to the Cd, this species can be used as an ecological indicator of the presence of metal, while exposed to Pb has potential as a phytoremediator species.

## **CAPÍTULO 1**

## 1 Introdução geral

Os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa devido a múltiplos impactos ambientais resultantes de atividades antrópicas (Goulart & Callisto, 2003). Entre essas atividades, o uso em larga escala de fertilizantes e o aumento das atividades industriais e de mineração têm promovido a contaminação do solo, de cursos d'água e do lençol freático por metais pesados (Malavolta, 1994). Alguns desses metais são o cádmio e o chumbo que, além de serem tóxicos em pequenas quantidades, são bioacumulativos, interferindo em toda a teia trófica, além de possuírem um longo tempo de residência no ambiente.

Visando obter uma tecnologia com baixo custo e eficiente, a recuperação de áreas contaminadas pela fitorremediação utilizando plantas aquáticas tem sido amplamente estudada no mundo inteiro (Gardea-Torresdey et al., 2005; Vardanyan & Ingole, 2006). Mas, para que a fitorremediação seja eficiente, é necessário testar o comportamento das espécies frente à contaminação. Pois, para que uma planta seja um bom fitorremediador é necessário que ela acumule concentrações relativamente elevadas do poluente em seus tecidos, sem sofrer efeitos de toxidez. Caso a planta seja susceptível ao poluente, apresentando sintomas, ela é considerada um indicador ecológico da poluição.

Considerando a escassez de informações sobre o comportamento de *Salvinia auriculata*, uma pteridófita aquática, em relação à contaminação por Cd e Pb, este trabalho foi realizado com o objetivo principal de realizar um bioensaio do potencial fitorremediador e bioindicador desta planta, utilizando-se os níveis ultraestruturais (morfoanatomia) e populacionais (biomassa e número de rametes) como abordagem para o estudo, bem como o teor de metal pesado acumulado nos tecidos da planta. Dessa maneira, busca-se fornecer subsídios

para a utilização efetiva da mesma como fitorremediadora e ou bioindicadora de águas contaminadas pelos metais avaliados.

Para alcançar tais objetivos, as seguintes hipóteses foram testadas: (1) *Salvinia auriculata*, em ambientes contaminados por Cd e/ou Pb, se comporta como indicador ecológico apresentando sintomas de toxidez e (2) *Salvinia auriculata* é um fitorremediador de Cd e ou Pb, sendo a concentração dos metais em seus tecidos dependente da concentração desses na solução.

## **2 Referencial teórico**

### **2.1 Contaminação por metais pesados**

A intensa utilização de fertilizantes e pesticidas de forma inadequada, juntamente com o aumento das atividades industriais e de mineração, é a principal causadora da contaminação do solo e corpos d'água por metais pesados (Malavolta, 1994).

Consideram-se metais pesados os elementos metálicos que possuem densidade maior que  $5 \text{ gcm}^{-3}$ , também conhecidos como elementos-traço, por serem naturalmente encontrados em concentrações muito baixas, na ordem de parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb) (Tan, 2000). Esses metais ocorrem naturalmente na crosta terrestre, sendo alguns essenciais para o desenvolvimento dos seres vivos, como zinco, cobre, níquel, cromo, ferro e manganês (Malavolta, 1994). Por processos de intemperismo da rocha ou por meio de atividades agrícolas e industriais, esses metais são lançados no ambiente, contaminando tanto o ecossistema terrestre como o aquático, acarretando em efeitos adversos para a biota e os aquíferos, inutilizando o meio para a produção de alimentos e impossibilitando a sobrevivência de organismos (Camargo et al., 2001).

Os metais pesados podem se apresentar sob a forma solúvel, como íons metálicos, estando presentes em sedimentos fluviais (Salomons & Forstner, 1980). Uma vez disponíveis, os íons metálicos são absorvidos pelas plantas e incorporados aos organismos, principalmente pela alimentação, acumulando-se ao longo da cadeia trófica. Os danos causados pela bioacumulação dos metais pesados são muitos, entre eles a morte de plânctons e a diminuição de populações de consumidores primários e secundários, como peixes e aves (Zhou et al., 2008).

As plantas, quando expostas à contaminação por metais pesados, podem apresentar danos morfológicos, anatômicos e fisiológicos, podendo sofrer mudanças em processos biológicos, como fotossíntese, respiração, atividade enzimática e crescimento (Kärenlampi et al., 2000).

### **2.1.1 Chumbo**

O Pb é relativamente abundante na crosta terrestre, tendo concentração média de 10 a 20 mgkg<sup>-1</sup>. Já em águas superficiais essa concentração é de, aproximadamente, 0,02 µgL<sup>-1</sup>.

As atividades de mineração e fundição são importantes fontes de emissão de Pb. Além disso, o Pb está presente em diversas formas de produtos e materiais, como cerâmicas, soldas, munições, equipamentos médicos (protetor de raios X), pilhas e baterias, encanamento e equipamentos elétricos, além de ser amplamente utilizado na fabricação de tintas (Paoliello & Chasin, 2001).

Embora os processos naturais e antropogênicos sejam responsáveis pela liberação do Pb no ambiente, a contaminação via atividade humana é predominante (Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR, 1993; Zhou et al., 2008). Uma vez liberado, o Pb possui longo tempo de residência, comparado à maioria dos poluentes (Alloway, 1993). O Pb é depositado em lagos, rios e oceanos, proveniente da atmosfera ou do escoamento

superficial do solo, sendo adsorvido aos sólidos suspensos e sedimentos (ATSDR, 1993). Em Minas Gerais, devido à grande presença de atividades de mineração, os cursos d'água próximo a essas atividades encontram-se contaminados por Pb, podendo apresentar concentração de até  $153 \mu\text{gL}^{-1}$ , como os rios de Ouro Branco (Jordão et al., 1999). Na região da bacia do rio das Mortes, também em MG, tanto o solo quanto a água dos rios apresentaram, em média, concentrações superiores à aceitável, de acordo com levantamento realizado por Zuliani (2006).

O Pb é venenoso e bioacumulativo, podendo entrar na teia alimentar por meio da absorção por plantas. Ele pode causar problemas gastrintestinais, hematológicos, com a inibição de algumas enzimas, renais e neurológicos, principalmente em crianças (Paoliello & Chasin, 2001).

É pouco provável que o Pb afete as plantas aquáticas nos níveis encontrados no ambiente em geral, existindo poucas evidências de efeitos desse metal em plantas aquáticas em concentrações abaixo de  $15 \text{mgL}^{-1}$  (World Health Organization - WHO, 1989). A toxidez acontece em concentrações superiores a  $30 \mu\text{gg}^{-1}$  de biomassa e, quando exposta a elevadas concentrações, as plantas apresentam diminuição no crescimento e na biomassa (Jordão et al., 1999).

### **2.1.2 Cádmio**

O metal Cd não é muito abundante na crosta terrestre, sendo encontrado associado ao zinco (Clemens, 2006). Sua concentração na crosta é de, aproximadamente,  $0,17 \text{mgkg}^{-1}$  e esses níveis naturais normalmente não causam toxidez aguda (Alloway, 1993). Dentre os metais pesados, o Cd é um dos principais contaminantes do ambiente e um dos mais tóxicos, ocupando a sétima posição na lista dos 20 compostos mais tóxicos existentes na natureza (Chen & Kao, 1995; Al-Kedhairi et al., 2001).

Várias atividades antropogênicas são responsáveis pela liberação do Cd no ambiente, destacando-se os processos industriais, mineração, queima de combustíveis fósseis, incineração do lixo, uso de fertilizantes fosfatados, produção de tintas e lubrificantes, entre outros (Lagriffoul et al., 1998; Jiang & Wang, 2007). Uma vez no ambiente, o Cd constitui um problema significativo, pois é tóxico em quantidades traço, além de ser móvel nas plantas, e de fácil incorporação em ciclos biológicos (Oliveira et al., 2001).

Nos corpos d'água, a concentração de Cd é menor que  $0,01\mu\text{gL}^{-1}$  (Devi et al., 1996), mas, devido à poluição das águas provocada pelos lançamentos de efluentes agroindustriais e o uso indiscriminado de agrotóxicos e fertilizantes, essa concentração tem aumentado (WHO, 1992). Nos ecossistemas aquáticos, o Cd possui alta mobilidade e pode afetar os animais e vegetais diretamente, por absorção, ou indiretamente pela transferência trófica (Devi et al., 1996). O maior risco à saúde humana que o Cd oferece provém da sua acumulação crônica nos rins, além de problemas neurológicos (WHO, 1992).

O Cd é um elemento não essencial às plantas, mas, devido à sua mobilidade, ele é facilmente absorvido pelo sistema radicular e translocado, via xilema, para a parte aérea (Benavides et al., 2005). A fitotoxicidade desse metal é da ordem de 3 a  $8\text{ mgkg}^{-1}$  (Malavolta, 1994) e sua presença no meio de crescimento das plantas pode inibir, diretamente ou indiretamente, processos fisiológicos como respiração, fotossíntese, troca gasosa e outros, podendo causar a redução da biomassa e a senescência das mesmas (Lagriffoul et al., 1998). O Cd provoca distúrbios nutricionais, interferindo no transporte e uso de Ca, Mg, P, K e água, sendo esta resposta muito variável entre as espécies (Benavides et al., 2005).

## **2.2 Fitorremediação**

Ambientes contaminados por metais pesados podem ser remediados por meio de técnicas químicas, físicas ou biológicas. Os tratamentos químicos e físicos podem afetar diversas propriedades do ambiente, com danos à diversidade de microrganismos e perda de nutrientes, além de serem muito custosos, enquanto as técnicas biológicas, como a fitorremediação, têm se mostrado eficientes e de baixo custo (Padmavathiamma & Li, 2007).

Muitas plantas são sensíveis aos metais pesados, mesmo em concentrações mínimas. Entretanto, certas espécies de plantas podem crescer em ambientes contaminados, graças às estratégias desenvolvidas contra a fitotoxicidade desses metais (Bovet et al., 2006). Ao crescer no meio contaminado, muitas plantas absorvem e acumulam concentrações consideráveis do metal em seus tecidos, possibilitando a remediação do meio. Com isso, surgiu o termo fitorremediação, que consiste na técnica que utiliza plantas e seus microrganismos associados para retirar poluentes orgânicos ou inorgânicos do ambiente, seja solo ou água (Salt, 1998). Poluentes inorgânicos não podem ser degradados, mas podem ser fitorremediados via estabilização ou sequestro nos tecidos vegetais (Pilon-Smits, 2005).

A fitorremediação consiste em uma das formas mais viáveis, tanto ecológica quanto economicamente, de remoção de metais pesados e recuperação de áreas degradadas. Esta técnica oferece várias vantagens, como o tratamento de grandes áreas, impacto ambiental e custos de implementação muito inferiores àqueles alcançados pelos métodos físico-químicos, com possibilidades de remediar água, solo e subsolo contaminados e, ao mesmo tempo, embelezar o ambiente (Dinardi et al., 2003). A fitorremediação é uma tecnologia que vem ganhando popularidade em diversas indústrias e agências governamentais na última década, devido à combinação do baixo custo e à alta eficiência que a mesma vem demonstrando (Pilon-Smits, 2005). Esta técnica é uma alternativa

de baixo custo, quando comparada aos tratamentos convencionais, como a remoção física de camada contaminada de solo ou o bombeamento e tratamento de águas (Oliveira et al., 2006).

A utilização da fitorremediação é baseada na seletividade, natural ou artificial, que algumas espécies exibem a determinados tipos de compostos ou mecanismos de ação (Pires et al., 2003). Essa técnica pode ser classificada em função do mecanismo que a planta utiliza para remediar a área. São eles 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 compostos podem imobilizar os metais pesados e rizorremediação, estimulação da biorremediação por fungos ou outros microrganismos localizados no sistema solo-raiz (Pilon-Smits, 2005).

A planta a ser utilizada na fitorremediação de metais pesados deve possuir alguns pré-requisitos para obter sucesso. São eles: ser tolerante à acumulação do poluente, de forma a manter as funções celulares mesmo na presença de grandes quantidades de metais; produzir grandes quantidades de biomassa e ser capaz de se adaptar às condições do ambiente impactado; ser de fácil colheita e aquisição ou multiplicação de propágulos e apresentar resistência a pragas e a doenças (Oliveira et al., 2006). Com isso, diversas plantas consideradas daninhas têm apresentado potencialidade como fitorremediadoras de áreas contaminadas (Pires et al., 2003).

Essa técnica apresenta algumas limitações, como: dificuldade na seleção da planta; o contaminante deve estar ao alcance do sistema radicular, no caso de descontaminação de solos; potencial contaminação da cadeia alimentar; restrição do crescimento da planta devido a fatores climáticos e ambientais; necessidade de retirada e disposição adequada da biomassa quando necessário e ser um processo de longo prazo (Oliveira et al., 2006). Mas, apesar das limitações, os

benefícios apresentados pela fitorremediação a tornam uma técnica promissora, embora sejam necessárias pesquisas de diversas áreas que identifiquem espécies com potencial fitorremediador e meios de se sobrepor às limitações existentes.

### **2.3 Indicador ecológico e biomonitoramento**

Na maioria das vezes, a avaliação da presença de poluentes no ambiente é feita por meio de metodologias que empregam recursos químicos, físicos ou físico-químicos, pelo uso de aparelhos, em muitos casos, bastante sofisticados e caros. Avaliar o comportamento do poluente no ambiente, ou seja, monitorar a sua ação através de organismos vivos é um tópico bastante discutido nas ciências ambientais, que tem sido chamado de biomonitoramento ou bioindicação (Esteves, 1998).

A utilização do biomonitoramento permite a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição. Além disso, o uso dos bioindicadores em ecossistemas aquáticos pode ser mais eficiente do que medidas instantâneas de parâmetros físicos e químicos (p.ex. temperatura, pH, oxigênio dissolvido, teores totais e dissolvidos de nutrientes, etc.) que são normalmente medidos no campo e utilizados para avaliar a qualidade das águas (Zhou et al., 2008).

Indicadores ecológicos, ou simplesmente bioindicadores, são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a magnitude de impactos ambientais em um ecossistema aquático e sua bacia de drenagem (Callisto & Gonçalves, 2002). Segundo Biandin (1986), apud Valle & Silveira (2001), bioindicação é a utilização das respostas de um sistema biológico qualquer a um agente estressante, como forma de se analisar sua ação e planejar formas de controle e monitoramento da recuperação da normalidade.

Os tipos de bioindicadores mais comuns são: (1) espécies “sentinelas”, introduzidas para indicar; (2) espécies “detectoras”, que ocorrem naturalmente e respondem ao estresse de forma mensurável; (3) espécies “exploradoras” que reagem positivamente ao distúrbio ou agentes estressores; (4) espécies “acumuladoras” que acumulam agentes estressores permitindo avaliar a bioacumulação e (5) espécies “bioensaio” que são usadas em experimentação (Niemi & McDonald, 2004).

Para o biomonitoramento de poluição aquática, incluindo metais pesados, o organismo deve apresentar várias respostas biológicas à exposição química, dentre elas: (1) ser capaz de acumular altos níveis do poluente sem causar sua morte; (2) apresentar distribuição abundante no local contaminado para permitir amostragem de repetições; (3) possuir um ciclo de vida suficientemente longo para permitir a comparação de várias idades; (4) apresentar danos em tecidos ou células como recurso para nível ultraestrutural; (5) ser de fácil amostragem e manipulação em laboratório; (6) ter como hábitat o meio aquático; (7) ocupar importante posição na teia alimentar e (8) apresentar relação dose-efeito de fácil observação.

Encontrar um candidato a bioindicador para o biomonitoramento que apresente todas essas respostas é praticamente impossível, devendo ser selecionado em função do objetivo do trabalho. Para avaliar a presença de metais pesados em ambientes aquáticos, o biomonitoramento tem se baseado, principalmente, em amostragens e análises de tecidos e ou fluidos de um organismo, ou seja, em um nível estrutural do indivíduo (Zhou et al., 2008).

#### **2.4 Plantas aquáticas**

Podem ser consideradas plantas aquáticas os vegetais visíveis a olho nu, com partes fotossinteticamente ativas permanentemente, ou por diversos meses, todos os anos, total ou parcialmente submersas em água doce ou salobra,

podendo ainda ser flutuantes (Pompêo & Moschini-Carlos, 2003). As plantas aquáticas estão distribuídas em diversos grupos taxonômicos, dentre eles as angiospermas, com 42 famílias de dicotiledôneas e 30 de monocotiledôneas e as briófitas, com 17 famílias e as pteridófitas com seis famílias. Elas também são classificadas quanto ao biótipo em cinco grandes grupos ecológicos. São eles (Esteves, 1998):

- plantas aquáticas emersas: enraizadas no sedimento com folhas fora da água. Ex: *Thypha dominguesis* (Taboa);
- plantas aquáticas flutuantes: flutuam livremente na superfície da água. Ex.: *Pistia stratiotes* (alface d'água);
- plantas aquáticas submersas enraizadas: enraizadas no sedimento que crescem totalmente submersas. Ex.: *Egeria densa* (elódea);
- plantas aquáticas submersas livres: permanecem livres, “mergulhadas” na coluna d'água. Ex.: *Utricularia* sp.;
- plantas aquáticas com folhas flutuantes: enraizadas no sedimento com folhas flutuando na superfície da água. Ex.: *Nymphaea elegans* (lírio d'água).

Essas plantas representam importante comunidade em ecossistemas límnicos por contribuírem para a diversidade biológica, atuarem como fonte de alimento e abrigo para diversos organismos e por apresentarem elevada biomassa e alta produtividade (Esteves, 1998).

Muitas espécies, por requererem altas concentrações de nutrientes, vêm sendo utilizadas com sucesso na recuperação de rios e lagos poluídos, pois suas raízes formam uma densa rede capaz de reter até as mais finas partículas em suspensão, além de absorverem substâncias tóxicas provenientes do despejo industrial e doméstico (Camargo et al., 2003).

As plantas são utilizadas em pesquisas ecológicas como bioindicadores da qualidade de água *in-situ*, tanto no âmbito estrutural de cada indivíduo

(morfoanatomia) como em nível de população (crescimento e biomassa) e de composição da comunidade (Zhou et al., 2008). Plantas aquáticas também são amplamente utilizadas em técnicas de fitorremediação devido à capacidade que apresentam para absorver, de modo seletivo, as substâncias inorgânicas do corpo d'água (Lewis, 1995). Vardanyan & Ingole (2006) estudaram 45 espécies de plantas aquáticas em dois lagos da Índia e identificaram que todas as plantas acumularam concentrações consideráveis de diversos metais em seus tecidos, entre eles Pb e Cd. Ressalta-se assim, a importância dessas plantas na remediação e na recuperação de ecossistemas aquáticos por meio da absorção e do acúmulo de metais pesados.

A fitorremediação em ecossistemas aquáticos também tem se mostrado eficiente com o uso das plantas aquáticas. Uma variedade de plantas emergentes, submersas e flutuantes tem sido estudada para a remediação de áreas contaminadas por compostos orgânicos e inorgânicos, como os metais pesados (Gardea-Torresdey et al., 2005).

### **2.3.1 *Salvinia auriculata* Aublet**

A família Salviniaceae (Pteridophyta) é representada por apenas um gênero, *Salvinia*, que ocorre amplamente distribuído em ambientes aquáticos de muitas regiões tropicais, sendo ausente em regiões muito frias, este gênero apresenta 10 espécies, identificadas até o momento, dentre elas a *Salvinia auriculata* Aublet (Sota, 1962; Cook, 1996).

*Salvinia auriculata*, também conhecida como murerê-carrapatinho, salvínia, erva-de-sapo e orelhinha-de-onça (Lorenzi, 1982), é uma planta aquática flutuante, ramificada, com rizomas horizontais e raízes ausentes. Apresenta grupo de três folhas para cada nó, sendo duas folhas verdes flutuantes medindo de 1 a 3 cm de largura, e outra submersa, que se assemelha a uma raiz, tanto na forma quanto na função, pois a mesma absorve água e nutrientes. A

reprodução de *S. auriculata* pode ser tanto via clonal como sexuada por meio de esporos que se localizam dentro de indúcio globoso, os esporocarpos, que se encontram na folha modificada submersa (Sota, 1962; Sculthorpe, 1967) (Figura 1).

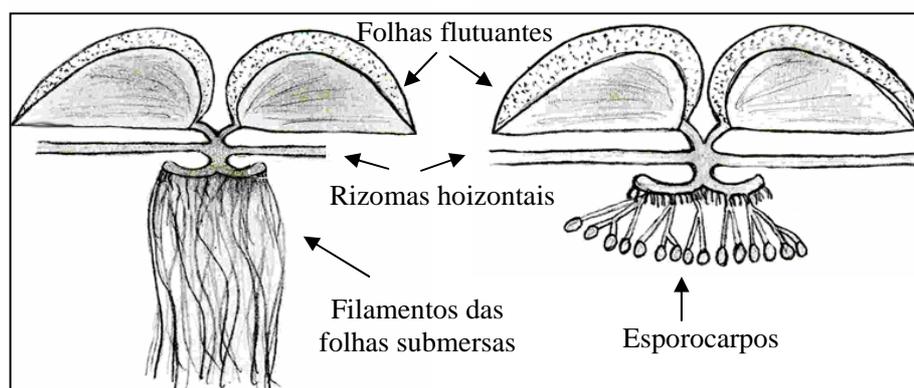


FIGURA 1 Desenho esquemático de *Salvinia auriculata* (modificado de United States Geological Survey, 2009).

Esta planta é uma herbácea perene, muitas vezes considerada daninha e bastante frequente em águas paradas. Ela forma grandes infestações que cobrem toda a superfície disponível da água e, sob condições ótimas, chega a produzir 650 g de biomassa seca por m<sup>2</sup> por ano (Lorenzi, 1982).

Em vários ambientes, *Salvinia* tem proliferado indesejadamente, causando prejuízos aos usos múltiplos do ecossistema. Essa macrófita flutuante, sob condições favoráveis, é rapidamente disseminada por propagação vegetativa, colonizando extensas superfícies de água em um curto intervalo de tempo (Boschilia et al., 2006).

Esta planta tem sido amplamente utilizada em programas de biomonitoramento como indicador ecológico. Seu uso é justificado pelas elevadas taxas de crescimento, a sensibilidade a diferentes agentes tóxicos e a facilidade de manipulação experimental (Gardner & Al-Hamdani, 1997).

### 3 Referências bibliográficas

- AL-KHEDHAIRY, A. A.; AL-ROKAYAN, S. A.; AL-MISNED, F. A. Cadmium toxicity and cells stress response. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 4, n. 8, p. 1046-1049, 2001.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New Delhi: Blackie Academic & Professional, 1993. 339 p.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for lead**. Atlanta, 1993. 307 p.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 21-34, Jan./Mar. 2005.
- BOSCHILIA, S. M.; THOMAZ, S. M.; PIANA, P. A. Plasticidade morfológica de *Salvinia herzogii* (de La Sota) em resposta à densidade populacional. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 35-39, jan./mar. 2006.
- BOVET, L.; KAMMER, P. M.; MEYLAN-BETTEX, M.; GUADAGNUOLO, R.; MATERA, V. Cadmium accumulation capacities of *Arabis alpine* under environmental conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 57, n. 1/2, p. 80-88, Aug. 2006.
- CALLISTO, M.; GONÇALVES, J. F. A vida nas águas das montanhas. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 182, p. 68-71, 2002.
- CAMARGO, A. F. M.; PEZZATO, M. M.; HENRY-SILVA, G. G. Fatores limitantes à produção primária de macrófitas aquáticas. In: THOMAZ, S. M.; BINI, M. (Ed.). **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**. Maringá: EDUEM, 2003. p. 59-84.
- CAMARGO, O. A.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; RAIJ, B.; ABREU, C. A. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: Legis Summa, 2001. p. 89-124.

CHEN, S. L.; KAO, C. H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, Slagelse, v. 16, n. 3, p. 249-252, May 1995.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1707-1719, Nov. 2006.

COOK, C. D. K. **Aquatic plant book**. Amsterdam: SPB Academic, 1996. 228 p.

DEVI, M.; THOMAS, D. A.; BARBER, J. T.; FINGERMAN, M. Accumulation and physiological and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic food chain. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 33, n. 1, p. 38-43, Feb. 1996.

DINARDI, A. L.; FORMAGI, V. M.; CONEGLIAN, C. M. R.; BRITO N. N.; SOBRINHO, G. D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. Fitorremediação. In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 3., 2003, Rio Claro. **Anais...** Rio Claro, SP: Faculdades Integradas Claretianas, 2003. CD ROM.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência/FINEP, 1998. 568 p.

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

GARDNER, J. L.; AL-HAMDANI, S. H. Interactive effects of aluminum and humic substances on salvinia. **Journal of Aquatic Plant Management**, Gainesville, v. 35, p. 30-34, Jan. 1997.

GOULART, M. D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, Pará, v. 2, n. 1, p. 156-164, 2003.

JIANG, X.; WANG, C. Cadmium distribution and its effects on molybdate-containing hydroxylases in *Phragmites australis*. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 353-360, May 2007.

JORDÃO, C. P.; PEREIRA J. L.; JHAM, G. N.; BELLATO, C. R. Distribution of heavy metals in environmental samples near smelters and mining areas in Brazil. **Environmental Technology**, London, v. 20, n. 5, p. 489-498, May 1999.

KÄRENLAMPI, S.; SCHAT, H.; VANGRONSVELD, J.; VERKLEIJ, J. A. C.; LELIE, D.; MERGEAY, M.; TERVAHAUTA, A. I. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. **Environmental Pollution**, Barking, v. 107, n. 2, p. 225-231, Feb. 2000.

LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; MENCH, M.; VANGRONSVELD, J. 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**, Amsterdam, v. 200, n. 2, p. 241-250, Mar. 1998.

LEWIS, M. A. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing : a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 87, n. 3, p. 319-336, 1995.

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

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos. São Paulo: ProduQuímica, 1994. 153 p.

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

OLIVEIRA, D. B.; CARA, D. V. C.; XAVIER, P. G.; SOBRAL, L. G. S.; LIMA, R. B.; ALMEIDA, A. L. **Fitorremediação**: o estado da arte. Rio de Janeiro: CETEM-MCT, 2006. 32 p. (Série Tecnologia Ambiental, 39).

- OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de Salvinia e aguapé. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.
- PADMAVATHIAMMA, P. K.; LI, L. Y. Phytoremediation technology : hyper-accumulation metals in plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 184, n. 1/4, p. 105-126, Sept. 2007.
- PAOLIELLO M. M. B.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos**. Salvador: CRA, 2001. v. 3, 144 p. (Série Caderno de Referência Ambiental, 1).
- PILON- SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 15-39, June 2005.
- PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 335-341, maio/ago. 2003.
- POMPÊO, M. L. M.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Macrófitas aquáticas e perifiton**. São Carlos: Rima, 2003. 134 p.
- SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 643-68, June 1998.
- SALOMONS, W.; FÖRSTNER, U. Trace metal analysis on polluted sediments. part II: evaluation of environmental impact. **Environment Technology Letters**, Michigan, v. 10, p. 506-517, 1980.
- SCULTHORPE, C. D. **The biology of aquatic vascular plants**. London: E. Arnold, 1967. p. 610.
- SOTA, E. R. del la. Contribución al conocimiento de las Salviniaceae neotropicales, II : *Salvinia auriculata* Aublet. **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 12, n. 3, p. 499-513, 1962.

TAN, K. H. **Environmental soil science**. 2. ed. New York: M. Dekker, 2000. 452 p.

UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY. **The *Salvinia* complex**. 2009. Disponível em: <[http://salvinia.er.usgs.gov/html/s\\_auriculata\\_complex.html](http://salvinia.er.usgs.gov/html/s_auriculata_complex.html)>. Acesso em: 19 jan. 2009.

VALLE, R. H. P.; SILVEIRA, I. A. Microrganismos indicadores. In: BOTELHO, C. G.; CAMPOS, C. M. **Recursos naturais renováveis e impacto ambiental**. Lavras: UFLA/FAEP, 2001. p. 166-170.

VARDANYAN, L. G.; INGOLE, B. S. Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. **Environment International**, New York, v. 32, n. 2, p. 208-218, Feb. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cadmium**. Geneva, 1992. (Environmental Health Criteria, 134).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria 85: lead -environmental aspects**. Geneva, 1989. 106 p. (United Nations Environment Program).

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

ZULIANI, D. Q. **Elementos-traço em águas, sedimentos e solos da bacia do Rio das Mortes, Minas Gerais**. 2006. 168 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

## **CAPÍTULO 2**

**Uso de *Salvinia auriculata* como bioindicador: crescimento clonal e respostas estruturais dependentes das concentrações de cádmio**

## Resumo

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do Cd em folhas de *Salvinia auriculata*, visando fornecer subsídios para o uso dessa espécie no monitoramento ambiental. Rametes de *S. auriculata* foram cultivados em solução nutritiva e foram submetidos aos tratamentos com Cd nas seguintes concentrações: 0; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Ao fim de dez dias de exposição ao Cd, os rametes por tratamento foram contados e a biomassa seca, aérea e submersa foi seca e pesada. Para observações anatômicas, as folhas de *S. auriculata* foram coletadas para análises em microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os resultados indicaram que houve decréscimo no surgimento de novos rametes e na alocação de biomassa por *S. auriculata*. Foi observado o surgimento de necrose e clorose, má formação dos estômatos e danos aos tricomas nas folhas flutuantes. Em âmbito ultraestrutural, as folhas expostas ao Cd apresentaram má formação dos cloroplastos e deterioração da parede celular. Todos os efeitos aumentaram com o aumento da concentração de Cd em solução. Como esses efeitos de toxidez em *S. auriculata* são de fácil detecção, elas podem ser utilizadas no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos contaminados por Cd.

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of the Cd in sheets of *Salvinia auriculata* aimed at providing subsidies for the use of this specie in environmental monitoring. Ramets of *S. auriculata* were grown in nutritive solution and subjected to treatment with Cd in the concentrations: 0; 1.0; 2.5; 5.0 and 10.0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . At the end of ten days of exposure to the Cd, the numbers of ramets for treatment were counted and dry biomass, aerial and submerged, were weighed. For anatomical observations, the leaves of salvinia were collected for analyses in scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. The results indicated that there was a decrease in growth rate of *S. auriculata* and dry biomass. The effects of toxicity observed on the leaves were the appearance of necrosis and chlorosis, poor formation of stomata and damage to trichomes. In structural level, the leaves exposed to the Cd had poor formation of chloroplasts and deterioration of the cell wall. All effects were pronounced proportionally with the concentration of Cd in solution. As these effects of toxicity in *S. auriculata* are easy to detect, they may be used for the biomonitoring of aquatic ecosystems contaminated by Cd.

## 1 Introdução

Os ecossistemas aquáticos e terrestres estão sendo alterados de maneira significativa devido a múltiplos impactos antrópicos (Jiang & Wang, 2007). Entre essas atividades, o uso em larga escala de fertilizantes e o aumento das atividades industriais e de mineração contaminam os cursos d'água e lençol freático por metais pesados (Malavolta, 1994).

O metal pesado Cd constitui um grande problema, pois é tóxico em quantidades traço, tem alta mobilidade nas plantas e é de fácil incorporação a ciclos biológicos (Oliveira et al., 2001). O Cd ocorre naturalmente em ambientes aquáticos, com concentrações inferiores a  $0,01 \mu\text{gL}^{-1}$  e em concentrações muito mais elevadas em águas poluídas (Devi et al., 1996). O Cd entra no ambiente por meio de processos industriais de beneficiamento do couro e de outros metais, como zinco e chumbo, e está presente em adubos fosfatados, na produção de tintas e lubrificantes (Jiang & Wang, 2007). Em ecossistemas aquáticos, o Cd pode afetar a biota indiretamente, pela transferência trófica ou diretamente, pela absorção, pois muitas plantas aquáticas possuem habilidade de acumular íons metálicos (Devi et al., 1996).

Os sintomas da toxidez de metais pesados são estudados em várias plantas sob diversas condições (Clemens, 2006). A presença de Cd no meio de crescimento das plantas inibe processos fisiológicos, como respiração, fotossíntese, troca gasosa e outros, causando a senescência precoce das mesmas (Lagriffoul et al., 1998; Clemens, 2006).

As plantas aquáticas são utilizadas para monitorar as concentrações de metais pesados e de outros poluentes no ambiente aquático (Sawidis et al., 1995). A utilização dessas plantas como bioindicadoras de contaminação por metais pesados apresenta algumas vantagens, como: (a) alta tolerância ao poluente, (b) facilidade amostral, (c) capacidade de absorção seletiva de

poluentes (elas são mais sensíveis que outros bioindicadores (p.e peixes) e (d) os indivíduos são relativamente grandes e de fácil manipulação em laboratório (Lewis, 1995, Zhou et al., 2008).

*Salvinia auriculata* é uma planta livre e flutuante muito comum em ambientes de água doce e, sob condições favoráveis, é rapidamente disseminada por propagação vegetativa, por isso coloniza extensas superfícies de água em um tempo reduzido (Henry-Silva & Camargo, 2006). As elevadas taxas de crescimento e a sensibilidade de *S. auriculata* a diferentes agentes tóxicos favorecem sua utilização como espécie bioindicadora de poluição em ecossistemas aquáticos (Gardner & Al-Hamdani, 1997; Lewis, 1995).

*Salvinia auriculata* tem sido utilizada como bioindicadora da presença e dos níveis de Cd em ambientes aquáticos (Outridge & Hutchinson, 1990). Entretanto, seu uso restringe-se ao nível populacional e morfológico de resposta bioindicadora que, muitas vezes, se manifesta somente em dosagens altas do poluente.

Métodos tradicionais para avaliar o agente estressor, tais como mudanças na taxa de crescimento da planta e composição de espécies na estrutura da comunidade, têm se mostrado inadequados como indicadores na avaliação de impactos recentes (Mendelssohn et al., 2001). Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de indicadores biológicos que possam descobrir, prever e quantificar o agente estressor antes de surgirem danos visíveis e perdas em grande escala (Mendelssohn & McKee, 1992).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar se *S. auriculata* é um indicador ecológico da presença de Cd, sendo as mudanças morfológicas, anatômicas e populacionais utilizadas como ferramentas de indicação biológica. Para alcançar tais objetivos, as seguintes hipóteses foram testadas: (1) *Salvinia auriculata* diminui seu número de rametes e alocação de biomassa quando

exposta ao Cd e (2) *Salvinia auriculata* apresenta danos morfoanatômicos, quando na presença de Cd.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Instalação do bioensaio

Os rametes de *S. auriculata* foram obtidos em local livre de suspeitas de contaminação por Cd, à margem direita do rio Grande (44° 55' W; 21° 05' S). Eles foram lavados em água destilada e selecionados quanto à uniformidade do tamanho. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por cinco dias em um recipiente de capacidade de 25 L contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com 1/5 da força iônica e com pH entre 6,5 e 7 (Figura 1). O valor de pH foi fixado com base no trabalho de Olguin et al. (2002), que estudaram o efeito do pH na absorção e acúmulo de Cd por *S. minima*.

Após o período de aclimação, as plantas foram transferidas para recipientes com capacidade de 1,0 L de solução, mantendo-se a solução de Hoagland & Arnon (1950) modificada (Figura 2). Depois, elas foram expostas às seguintes concentrações crescentes de Cd na forma de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ : 0 (controle); 1,0 (T1); 2,5 (T2); 5,0 (T3) e 10,0 (T4)  $\mu\text{molL}^{-1}$ . Foram realizados experimentos distintos para avaliar alocação de biomassa e para as análises anatômicas. O delineamento amostral, para ambos os experimentos, foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos com quatro repetições, contendo um ramete cada durante dez dias.



FIGURA 1 *Salvinia auriculata* após a coleta e em aclimatação em solução de Hoagland & Arnon (1950) 20%.



FIGURA 2 Experimento montado em casa de vegetação.

Os bioensaios são uma alternativa para a seleção de melhores indicadores. Vários organismos aquáticos, em diferentes níveis tróficos, têm sido

amplamente utilizados em avaliações ecotoxicológicas, pois os métodos biológicos podem fornecer uma descrição qualitativa da presença e do potencial toxicológico do poluente. Com o bioensaio, é possível submeter o organismo a diferentes testes de toxidez e, então, estimar o perigo potencial do poluente (Feiler et al., 2006).

## **2.2 Crescimento clonal**

Para determinar o crescimento clonal, foi realizada a contagem do número de rametes ao final do experimento, para cada tratamento. A biomassa seca foi determinada separadamente para parte aérea (folhas emersas) e parte submersa (rizoma e folhas submersas). As partes separadas foram secas em estufa, durante 72 horas, a 48°C e, então, foram pesadas.

## **2.3 Respostas morfológicas e anatômicas**

As alterações morfológicas nas folhas flutuantes foram observadas diariamente. Para verificar as modificações anatômicas, foram realizadas análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).

Para as análises de microscopia, duas folhas flutuantes por repetição foram coletadas, resultando em um total de oito folhas. Elas foram lavadas e imersas em solução fixativa (Karnoviskys modificado ph 7,2), por um período de 24 horas, depois lavadas em tampão cacodilato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio por 1 hora e, subsequentemente, desidratadas em série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por três vezes).

Para as análises em MEV, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico, depois montadas em *stubs* e deixadas em câmara seca por 24 horas. Em seguida, elas foram cobertas com ouro e levadas ao microscópio eletrônico de varredura (Leo Evo 40), para análises e documentação fotográfica.

Para as análises de MET, as amostras desidratadas foram emersas em gradientes crescentes de Spur/acetona (30% por 8 horas, 70% por 12 horas e 100%, duas vezes, por 24 horas cada) e então montadas em moldes. Os moldes foram cortados em secções semifinas (0,85  $\mu\text{m}$ ) e ultrafinas (<100 nm), por meio do ultramicrótopo Reichert-Jung (ultracut E), com o auxílio de lâmina de diamante. As secções pós-contrastadas foram observadas e documentadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80 kv.

#### **2.4 Análise estatística**

Para verificar a resposta da *S. auriculata* às diferentes concentrações de Cd, foi realizada regressão polinomial, em que o número de rametes e a biomassa foram considerados variáveis resposta e a concentração do poluente como variável determinante. A fim de verificar a diferença entre os tratamentos, foi feita uma análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5%.

### **3 Resultados e discussão**

#### **3.1 Crescimento clonal**

Não foi observada presença de estruturas reprodutivas em nenhum tratamento, incluindo o controle. A ausência de estruturas reprodutivas nas plantas pode ser explicada pela baixa densidade em que essas se encontraram no experimento. *Salvinia auriculata* tende a investir mais em reprodução clonal do que em reprodução sexuada nessas condições (Coelho et al., 2005).

O surgimento de novos rametes de *S. auriculata* não foi observado nos dois primeiros dias de experimento, mas surgiram nos terceiro e quarto dias no controle e apenas no quinto nos demais tratamentos. Ao fim do experimento, o controle apresentou maior número de rametes, quando comparado aos demais

tratamentos, tendo o número de rametes de *S. auriculata* decrescido significativamente em proporção ao aumento da concentração de Cd na solução ( $F = 14,333$ ;  $p = 0,0001$ ) (Figura 3A). Em maiores concentrações (T3 e T4), a planta gerou um ou nenhum novo ramete e o ramete gerado apresentou sintomas de toxidez, como cloroses e necroses. O tratamento de maior concentração ( $10 \mu\text{ML}^{-1}$ ) apresentou 74% dos rametes mortos ao fim do experimento. Oliveira et al. (2001), também observaram que *Salvinia auriculata* perde a capacidade de sobreviver e reproduzir em altas concentrações de Cd.

A biomassa seca da planta diminuiu com o aumento de Cd na solução. O tratamento T1 apresentou uma redução na biomassa de 49% em relação ao controle. O decréscimo foi mais acentuado na parte submersa, 72% de redução. (Figura 3B).

Vários estudos revelam que plantas expostas a grandes quantidades de Cd apresentam inibição no crescimento e cloroses nas folhas (Zhou et al., 2008; Clemens, 2006). Isso é causado por queda da taxa fotossintética e redução na absorção e no transporte de nutrientes (Larsson et al., 1998).

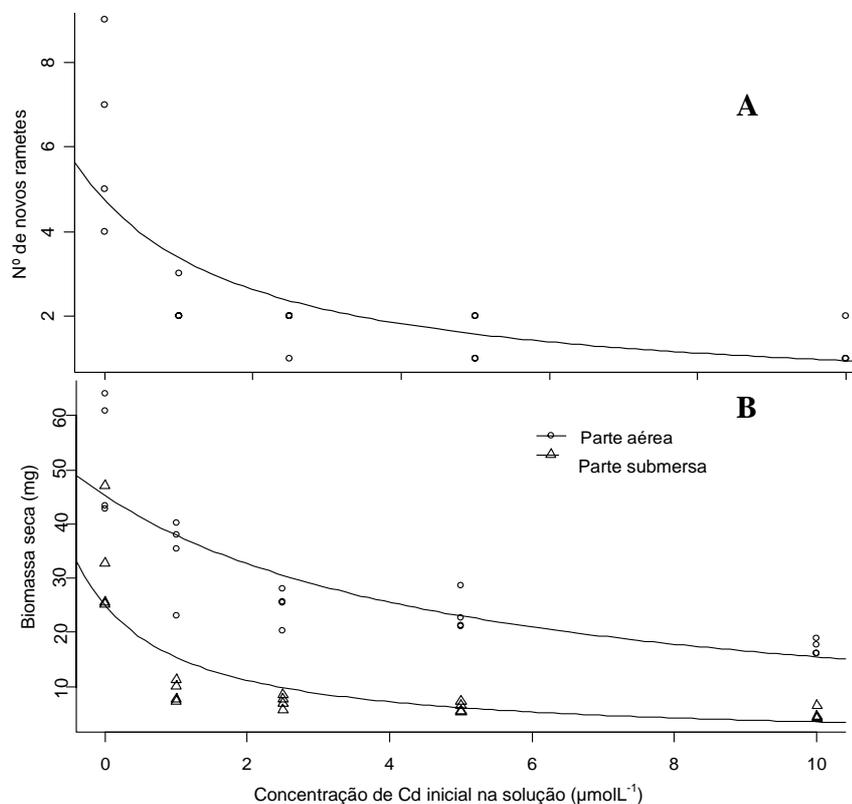


FIGURA 3 Crescimento clonal de *Salvinia auriculata*, em função da concentração inicial de Cd na solução em µmolL<sup>-1</sup>. **A:** número de rametes ( $R^2 = 0,52$ ;  $p = 0,0004$ ;  $y = 3,3636x^{(-0,5-66)}$ ). **B:** biomassa seca (g) da parte aérea ( $R^2 = 0,71$ ;  $p < 0,0001$ ;  $y = 0,0402x^{(-0,3793)}$ ) e submersa ( $R^2 = 0,41$ ;  $p = 0,0027$ ;  $y = 0,0252x^{(-0,8442)}$ ).

A biomassa da parte submersa foi a mais afetada pela exposição ao Cd em relação à biomassa aérea. Isto se deve à absorção de maior quantidade de Cd pela folha submersa em relação às folhas emersas (Oliveira et al., 2001), uma vez que as folhas submersas agem como raízes, absorvendo água e nutrientes (Sculthorpe, 1967) e, conseqüentemente, maior quantidade de Cd.

### 3.2 Respostas morfológicas e anatômicas

Plantas expostas a metais pesados apresentam sintomas, como necrose e clorose nas folhas, redução na biomassa e diminuição do rendimento (Lagriffoul et al., 1998; Vecchia et al., 2005). Outra resposta da macrófita à contaminação por metal pesado são as modificações estruturais que elas sofrem (Zhou et al., 2008).

Foi observado um gradiente de respostas de *S. auriculata* à contaminação por Cd. As alterações que a planta sofreu foram pronunciadas com o aumento da concentração do metal na solução (Figura 4).

A partir do quinto dia de exposição, as folhas dos rametes expostos a elevadas concentrações (T3 e T4) apresentavam sintomas de toxidez, como cloroses. Ao final dos dez dias, todos os tratamentos apresentaram danos morfológicos externos, como a ocorrência de áreas necróticas marginais com tonalidade marrom na superfície foliar (Figura 4A). Esse é um sintoma de toxidez comum e evidente em plantas quando expostas ao Cd, sejam terrestres, como plantas de cevada (Sridhar et al., 2007) ou aquáticas, como *Salvinia cucullata* (Siriwan et al., 2006).

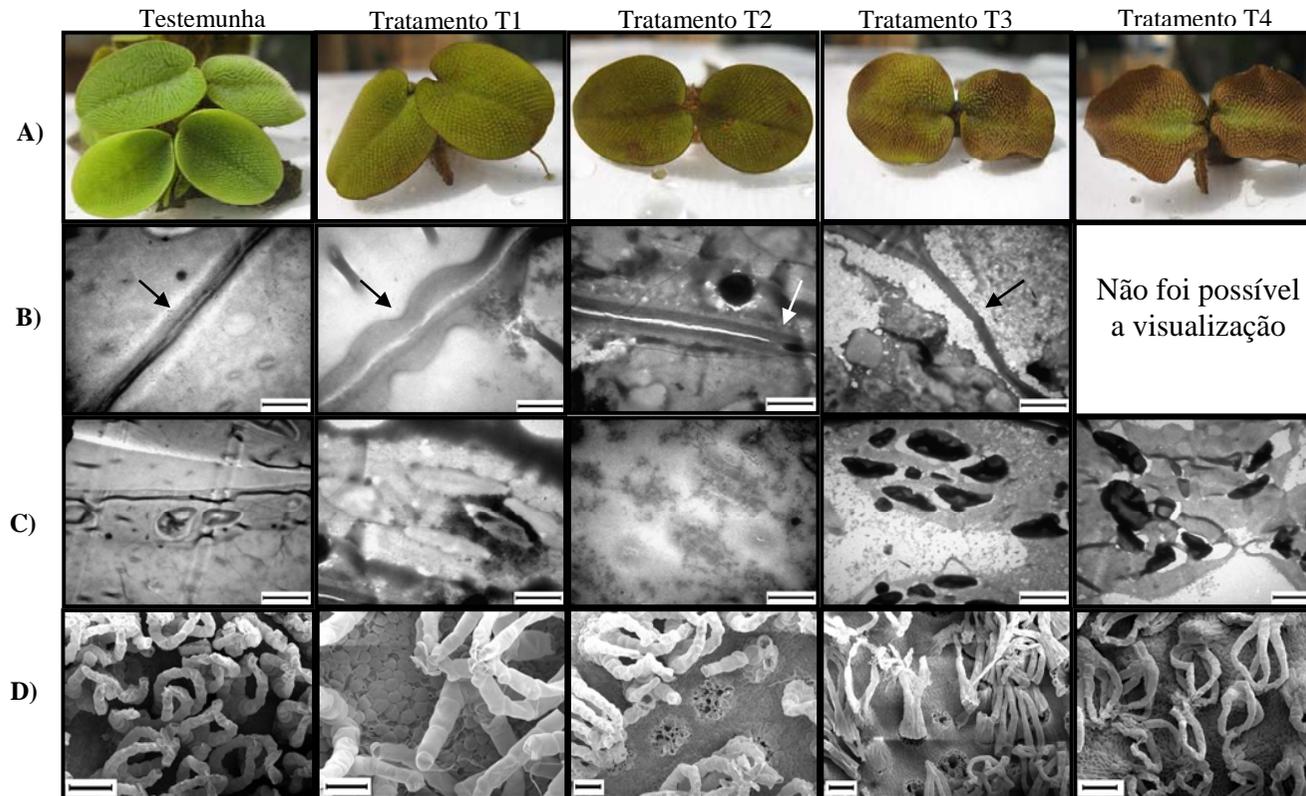


FIGURA 4 Respostas estruturais em folhas flutuantes de *Salvinia auriculata* à contaminação por cádmio. **A:** Danos morfológicos; **B:** Parede celular (Testemunha, T1 e T2 barra = 5µm; T3 barra = 10 µm); **C:** Cloroplastos (Testemunha, T1 e T2; barra = 5 µm; T3 e T4, barra = 10 µm); **D:** Tricomas e células epidérmicas (Testemunha, T3 e T4 barra = 200 µm; T1 e T2, barra = 100 µm ).

Um dos possíveis motivos da toxidez do cádmio é a sua semelhança química com o íon  $\text{Fe}^{+2}$ . A planta exposta ao Cd apresenta danos morfológicos porque tem o  $\text{Fe}^{+2}$  substituído pelo  $\text{Cd}^{+2}$  em muitos processos fisiológicos vitais (Stoys & Bagchi, 1995). Sendo assim, o Cd pode induzir a deficiência do  $\text{Fe}^{+2}$ , como observado por Yoshiara et al. (2006), estudando plantas de tabaco.

A partir do tratamento T2, foi observada a deterioração da parede celular devido à perda de elasticidade da mesma sendo que no T4 a parede celular não pode ser identificada na análise de MET. Já no tratamento T1, foi detectada deposição de material opaco ao longo da lamela média, ocasionando sinuosidade na mesma (Figura 4B). A deposição de substâncias nas paredes celulares de células das folhas deste tratamento pode ser um ajuste adaptativo contra a translocação de Cd célula-a-célula, impedindo o transporte do íon metálico para células adjacentes. Este mecanismo evita a degradação da membrana plasmática visto que esta estrutura é o primeiro alvo de fitotoxicidade do Cd (Gupta & Devi, 1992; Barceló & Poshevieder, 1990).

Os cloroplastos, a partir do tratamento T2, apresentaram alto grau de deterioração e má formação (Figura 4C). O Cd interferiu na expansão e na forma da organela, sendo que os cloroplastos do tratamento controle se apresentaram no formato discoide e os dos demais tratamentos, quando visualizados, não apresentavam formato distinto. Esse dano em cloroplastos de plantas expostas ao Cd também foi observado por Vecchia et al. (2005), em folhas da macrófita *Elodea canadensis*, em que também foi constatado que o Cd interfere na disposição dos tilacoides. O cloroplasto é uma organela vital no processo fotossintético e, com sua deterioração, há uma alteração na taxa fotossintética o que, por sua vez, também explica o decréscimo na biomassa da planta. Esse fato é corroborado pelo estudo realizado por Oliveira et al. (1994), em plantas de soja submetidas ao Cd, em que foi observado que o metal inibe a biossíntese de clorofila, afetando, assim, o processo fotossintético.

Por meio da MEV, foi observado que folhas de *S. auriculata* são epiestomáticas com estômatos anomocíticos e elas apresentam tricomas tectores pluricelulares em ambas as faces. Com a entrada do Cd nos tecidos foliares, várias estruturas dependentes do perfeito desenvolvimento da membrana plasmática exibiram deformações (Figura 4D). A partir de T1 foi observado o rompimento das células epidérmicas, o que ocasionou uma deficiência no sistema de revestimento e, conseqüentemente, na proteção dos órgãos. Outro fato que confirma esta afirmação é a desestruturação dos tricomas tectores na superfície adaxial da folha. Como estas estruturas são expansões das membranas das células epidérmicas, a desestruturação dessas membranas causa fragilidade aos tricomas. Assim, eles perdem suas características funcionais.

Nos tratamentos submetidos ao Cd, também foi observado que os estômatos apresentaram má formação e muitos estavam com o ostíolo aberto. Não foram observados danos nos aerênquimas. Isto permitiu a flutuação das plantas, mesmo em concentrações elevadas de Cd.

#### **4 Conclusões**

Por meio do bioensaio realizado, *Salvinia auriculata* exposta a diferentes concentrações de Cd apresentou alterações morfológicas, como cloroses marginais e necroses, além de alterações anatômicas, sendo a parede celular a estrutura mais afetada pela toxidez do metal. A diminuição no crescimento clonal e na biomassa também foi observada. Todas essas alterações foram diretamente proporcionais à concentração de Cd inicial aplicada.

Esse estudo confirma que *S. auriculata* é um indicador ecológico, pois é sensível ao Cd e apresenta danos de fácil visualização e quantificação que podem indicar a presença desse metal no meio.

## 5 Referências bibliográficas

BARCELÓ, J.; POSCHEVIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress : a review. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 13, n.1, p. 1-37, 1990.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1707-1719, Nov. 2006.

COELHO, F. F.; LOPES, F. S.; SPERBER, C. F. Persistence strategy of *Salvinia auriculata* Aublet in temporary ponds of southern Pantanal, Brazil. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 81, n. 4, p. 343-352, Apr. 2005.

DEVI, M.; THOMAS, D. A.; BARBER, J. T.; FINGERMAN, M. Accumulation and physiological and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic food chain. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 33, n. 1, p. 38-43, Feb.1996.

FEILER, U.; KREBS, F.; HEININGER, P. Aquatic plant bioassays used in the assessment of water quality in German rivers. **Hydrobiologia**, Amsterdam, v. 570, n. 1, p. 67-71, Oct. 2006.

GARDNER, J. L.; AL-HAMDANI, S. H. Interactive effects of aluminum and humic substances on salvinia. **Journal of Aquatic Plant Management**, Gainesville, v. 35, p. 30-34, Jan. 1997.

GUPTA, M.; DEVI, S. Cadmium sensitivity inducing structural responses in *Salvinia molesta* Mitchell. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 49, n. 3, p. 436-443, Sept. 1992.

HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Composição química de macrófitas aquáticas flutuantes utilizadas no tratamento de efluentes de aquíicultura. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 21-28, 2006.

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).

JIANG, X.; WANG, C. Cadmium distribution and its effects on molybdate-containing hydroxylases in *Phragmites australis*. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 353-360, May 2007.

LARSSON, E. L.; BORNMAN, J. F.; ASP, H. Influence of UV-B radiation and Cd<sup>2+</sup> on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 323, p. 1031-1039, June 1998.

LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT B.; MENCH, M.; VANGRONSVELD, J. 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**, Amsterdam, v. 200, n. 2, p. 241-250, Mar. 1998.

LEWIS, M. A. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing : a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 87, n. 3, p. 319-336, 1995.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental : micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos**. São Paulo: ProduQuímica, 1994. 153 p.

MENDELSSOHN, I. A.; MCKEE, K. L. Indicators of environmental stress in wetland plants. In: MCKENZIE, D. H.; HYATT, D. E.; MCDONALD, V. J. (Ed.). **Ecological indicators**. New York: Elsevier, 1992. p. 603-624.

MENDELSSOHN, I. A.; MCKEE, K. L.; KONG, T. A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wetland plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 263-275, June 2001.

OLGUÍN, E. J.; HERNÁNDEZ, E.; RAMOS, I. The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. **Acta Biotechnologica**, Berlim, v. 22, n. 1/2, p. 121-131, May 2002.

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

OLIVEIRA, J. A.; OLIVA, M. A.; CAMBRAIA, J. Effects of cadmium on chlorophyll contents and on peroxidase activity in soybean **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 97-101, 1994.

OUTRIDGE, P. M.; HUTCHINSON, T. C. Effects of cadmium on integration and resource allocation in the clonal fern *Salvinia molesta*. **Oecologia**, New York, v. 84, n. 2, p. 215-223, Sept. 1990.

SAWIDIS, T.; CHETTRI, M. K.; ZACHARIADIS, G. A.; STRATIS, J. A. Heavy metals in aquatic plants and sediments from water systems in Macedonia, Greece. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 32, n. 1, p. 73-80, Oct. 1995.

SCULTHORPE, C. D. **The biology of aquatic vascular plants**. London: E. Arnold, 1967. p. 610.

SIRIWAN, P.; MALEEYA, K.; PRAYAD, P.; SUCHART, U. Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in *Salvinia cucullata*. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 27, n. 4, p. 645-652, Oct. 2006.

SRIDHAR, B. B. M.; HAN, F. X.; MONT, D. L.; SU, Y. Effects of Zn and Cd accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 1, p. 15-22, Jan./Mar. 2007.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 18, n. 2, p. 321-336, Feb. 1995.

VECCHIA, F. D.; LA ROCCA, N.; MORO, I.; DE FAVERI, S.; ANDREOLI, C.; RASCIO, N. Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. **Plant Science**, Shannon, v. 168, n. 2, p. 329-338, Feb. 2005.

YOSHIHARA, T.; HODOSHIMA, H.; MIYANO, Y.; SHOJI, K.; SHIMADA, Y.; Goto, F. Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 4, p. 365-373, Apr. 2006.

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

### **CAPÍTULO 3**

**Efeitos da concentração de cádmio sobre a ultraestrutura de folhas  
submersas de *Salvinia auriculata* Aublet**

## Resumo

O cádmio é um dos metais pesados de maior periculosidade, sendo altamente tóxico para toda biota. Os efeitos da bioacumulação do Cd por plantas envolvem desde danos populacionais a danos ultraestruturais. Devido à sua direta exposição ao contaminante, a raiz é o órgão mais prejudicado pela exposição ao metal, tanto em plantas terrestres como em plantas aquáticas. Plantas aquáticas do gênero *Salvinia* têm sido amplamente estudadas como extratoras de metais pesados da água, porém, cada espécie responde de maneira específica a cada metal, sendo necessária a avaliação dos efeitos dos poluentes sobre as mesmas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de acúmulo de Cd por *Salvinia auriculata*, bem como o efeito da bioacumulação em suas folhas submersas, que possuem forma e função de raiz. Dessa forma, busca-se fornecer subsídios para o uso dessa espécie no monitoramento ambiental, além de entender o mecanismo de fitotoxicidade do Cd em nível ultra-estrutural. As plantas de *S. auriculata* foram cultivadas em solução nutritiva e, então, submetidas às crescentes concentrações de Cd: 0; 0,112; 0,28; 0,56 e 1,12 mgL<sup>-1</sup>. Ao fim de dez dias de exposição ao Cd, foi realizada a coleta de folhas submersas para as análises de microscopia eletrônica de transmissão. A análise do teor de Cd na parte aérea e submersa dos rametes de *S. auriculata* foi realizada através de espectrofotometria de absorção atômica. A planta concentrou teores consideráveis de Cd, principalmente na parte submersa, e essa concentração aumentou com o aumento do metal na solução. Da mesma forma, os danos observados nas folhas submersas foram proporcionais à concentração de Cd na solução. Entre as alterações, destacam-se a deterioração e o rompimento da parede celular, a má formação dos cloroplastos e a morte celular nas maiores concentrações. Esses resultados demonstram que, apesar de *S. auriculata* concentrar altos teores de Cd em seus tecidos, a mesma não é indicada para a remoção desse metal nas concentrações e no tempo estudado, mas como um indicador ecológico da presença do Cd.

## Abstract

The Cadmium (Cd) it is one of the heavy metals of larger danger. The effects of the Cd bioaccumulation for plants involve to ultra-structural damages. Due its direct exhibition to the pollutant, the root is the most prejudiced organ for the exhibition to the metal, in terrestrial plants and in aquatic plants. Aquatic plants of the genus *Salvinia*, has been studied thoroughly as cleaners of heavy metals of the water, however each species answers from a specific way to each metal, being necessary the evaluation of the effects of the pollutant ones on the

same ones. The objective of this work was to evaluate the potential of accumulation of Cd for *Salvinia auriculata*, and the effect of the bioaccumulation in their submerged leaves, seeking to supply subsidies for the use of that species in the environmental monitoring, besides understanding the phytotoxicity mechanism of the Cd at ultra-structural level. The plants of *S. auriculata* were cultivated in nutritious solution, and then submitted to growing concentrations of Cd in the form of  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ . At the end of ten days of exhibition to the Cd, was the collection of submerged leaves for the analyses of electronic microscopia of transmission. The analysis of accumulation of the aerial and submerged part of the ramets of *S. auriculata* was done through espectofotometria of atomic absorption. The plant accumulated concentrations of Cd in their tissues, mainly in the submerged part, the concentration increased with the increase of the metal in the solution. The damages observed in the submerged leaves were proportional to the concentration of Cd in the solution. Among the alterations, it stands out to deterioration and breaking of the cell wall, the deformation of the chloroplasts and cellular death in the largest concentrations. Those results demonstrate that *S. auriculata* isn't indicated for the removal of Cd, in the concentrations and time studied, but as an ecological indicator.

## 1 Introdução

A poluição de ecossistemas aquáticos por metais pesados tem sido um problema crescente, desde a Revolução Industrial e, dentre os poluentes, o cádmio tem se mostrado ser um problema significativo. Por meio do processo de lixiviação, lançamento de efluentes domésticos e agroindustriais, o Cd chega aos cursos d'água, onde possui alta mobilidade, podendo afetar os animais e os vegetais diretamente, por absorção ou indiretamente, por transferência trófica (Devi et al., 1996).

Métodos que utilizem plantas *in situ* para remover metais pesados da água têm se mostrado como uma alternativa de baixo custo, comparado às técnicas de remediação de áreas contaminadas (Suñe et al., 2007). Desde a década de 1970, vários trabalhos têm mostrado que plantas aquáticas podem ser usadas para a remoção parcial de metais do ecossistema aquático. Dentre as macrófitas aquáticas utilizadas em técnicas de fitorremediação, *Salvinia sp.* tem

apresentado potencial promissor para remover metais pesados em corpos d'água (Espinoza-Quiñones et al., 2005).

A família Salviniaceae (Pteridophyta) é representada por apenas um gênero, *Salvinia*, que ocorre amplamente distribuído em ambientes aquáticos de muitas regiões tropicais (Cook, 1996). Essas plantas são aquáticas de vida livre, flutuantes e sem raízes, com grupo de três folhas para cada nó, sendo duas folhas flutuantes e outra submersa, que se assemelha a uma raiz, tanto na forma quanto na função (Sculthorpe, 1967),

Essas plantas, sob condições favoráveis, são rapidamente disseminadas por propagação vegetativa, colonizando extensas superfícies de água em um curto intervalo de tempo (Boschilia et al., 2006). Esse aspecto justifica seu amplo uso em programas de biomonitoramento, como indicador ecológico, (Gardner & Al-Hamdani, 1997) ou como fitorremediador em corpos d'água (Outridge & Hutchinson, 1990).

Várias espécies do gênero já foram estudadas e relatadas como eficientes na remoção de metais pesados. Entre elas destacam-se *Salvinia herzogii*, na remoção de cromo (Maine et al., 2004) e *Salvinia mínima*, na remoção de chumbo e cádmio (Olguin et al., 2002).

*Salvinia auriculata* apresenta sensibilidade elevada na presença de alguns metais pesados (Outridge & Hutchinson, 1990), como arsênio (Guimarães et al., 2006) e tolerância frente à contaminação por outros, como o zinco (Wolff et al., 2009). Porém, em todos os trabalhos, *S. auriculata* foi capaz de acumular concentrações consideráveis dos metais em seus tecidos. Assim, o sucesso da remoção de metais pesados varia em função da espécie vegetal utilizada e do metal a ser removido, pois cada planta apresenta um determinado comportamento em relação à contaminação (Paiva et al., 2002). Para ser considerado um fitorremediador, a planta necessita ser tolerante ao metal e se desenvolver bem no ambiente contaminado (Suñe et al., 2007).

Poucos são os trabalhos que estudaram o comportamento de *S. auriculata* quando exposta ao Cd. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de concentração de Cd por *S. auriculata*, bem como as alterações sofridas em suas folhas submersas, quando expostas a diferentes doses desse metal. Para isso, as hipóteses testadas neste estudo foram: (1) *Salvinia auriculata* concentra Cd, sendo essa concentração maior nas folhas submersas, por essas apresentarem função de raiz e (2) Quanto maior o teor de Cd concentrado pelas folhas submersas de *S. auriculata*, maior o dano causado por este em sua estrutura.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Instalação do experimento

*Salvinia auriculata* foi obtida em local livre de suspeitas de contaminação por Cd, à margem direita do rio Grande (44°55' W; 21°05' S). Elas foram lavadas em água destilada e selecionadas quanto à uniformidade do tamanho. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por cinco dias, em um recipiente de capacidade de 25 L contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com 1/5 da força iônica e com pH entre 6,5 e 7. O valor de pH foi fixado com base no trabalho de Olguin et al. (2002), que estudaram o efeito do pH na absorção e no acúmulo de Cd por *S. minima*.

Após o período de aclimação, rametes individualizados foram transferidos para recipientes transparentes de polietileno com capacidade de 1,0 L de solução. Depois, foram expostas às seguintes concentrações crescentes de Cd na forma de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ : 0 (controle); 0,112 (T1); 0,28 (T2); 0,56 (T3) e 1,12 (T4)  $\text{mgL}^{-1}$ . Foram realizados experimentos distintos para avaliar o acúmulo de Cd pelas plantas e para as análises anatômicas. O delineamento amostral para ambos os experimentos foi inteiramente casualizado, composto por cinco

tratamentos com quatro repetições contendo um ramete por recipiente para as análises anatômicas e quatro para as análises de acúmulo. Os rametes foram expostos ao Cd durante dez dias.

## **2.2 Bioconcentração de cádmio**

Ao final dos dez dias de exposição, as plantas de *S. auriculata* foram separadas em parte submersa (rizoma e folha submersa) e parte aérea (folhas flutuantes) e, então, secas em estufa, durante 72 horas. Para a determinação das concentrações do Cd, cerca de 0,5 g de material vegetal seco e triturado foram digeridos em 10 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado e aquecido em forno de micro-ondas, durante 10 minutos, à pressão de 0,76 MPa. Após esta etapa, o material digerido foi filtrado e lavado em água tridestilada. Esse procedimento seguiu o método 3051<sup>a</sup> da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (United States Environmental Protection Agency - USEPA, 1998).

A determinação da concentração de Cd nas amostras foi realizada em de espectrofotômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, utilizando-se o equipamento AAnalyst 800 da Perkin Elmer.

Como controle de qualidade do método de extração e determinação de elemento traço, foi acrescentada, para cada grupo de cinco amostras de biomassa seca, uma amostra em “branco”. Para o “branco” do método de extração e determinação de elementos traço, foi utilizado o mesmo procedimento de digestão, porém, contendo apenas ácido nítrico, sem amostra alguma. O resultado obtido na leitura, o chamado branco do método, foi usado para calcular o limite de detecção do método (LDM) e, por meio do valor obtido, calculou-se o limite de quantificação do método (LQM).

### **2.3 Modificações estruturais nas folhas submersas**

Para verificar as modificações anatômicas, foram realizadas análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Folhas submersas de dois rametes foram coletadas por repetição. Essas foram lavadas e imersas em solução fixativa (Karnoviskys modificado ph 7,2) por um período de 24 horas, depois lavadas em tampão cacodilato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio, por 1 hora e, subsequentemente, desidratadas em série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por três vezes) e emersas em gradientes crescentes de Spur/acetona (30% por 8 horas, 70% por 12 horas e 100%, duas vezes, por 24 horas cada) e então montadas em moldes. Os moldes foram cortados em secções semifinas (0,85 µm) e ultrafinas (<100 nm), por meio do ultramicrótomato Reichert-Jung (ultracut E), com o auxílio de lâmina de diamante. As secções pós-contrastadas foram observadas e documentadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80 kV.

### **2.4 Análise estatística**

Para verificar o acúmulo de Cd por *S. auriculata* nas partes aérea e submersa, foram realizadas regressões, em que o acúmulo do metal foi considerado a variável resposta e a concentração inicial de Cd na solução como variável independente. Para verificar se houve diferença significativa entre os tratamentos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey.

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Bioconcentração de cádmio em *S. auriculata*

O limite de quantificação do método (LQM) calculado para o Cd foi de 15 ppm. Em todas as amostras dos tratamentos, a concentração encontrada foi superior ao LQM, sendo possível a quantificação.

Houve diferença significativa entre o teor de Cd concentrado na parte submersa e na parte aérea, dentro e entre tratamentos (ANOVA,  $p < 0,05$ ). A parte submersa concentrou teores de Cd superiores aos da parte aérea (Tabela 1).

TABELA 1 Média das concentrações de Cd em *S. auriculata*.

| Concentração inicial de Cd na solução ( $\text{mgL}^{-1}$ ) | Média da concentração de Cd na parte submersa ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) | Média da concentração de Cd na parte aérea ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) |
|---|--|---|
| 0   | 10 Ca  | 6 Ea  |
| 0,112   | 267 Cb   | 70 Da   |
| 0,28  | 805 Bb   | 227 Ca  |
| 0,56  | 1.831 Bb   | 478 Ba  |
| 1,12  | 3.632 Ab   | 996 Aa  |
| F   |  | 191,670   |
| p   |  | < 0,0001  |

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na mesma coluna, não diferem entre si. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na mesma linha, não diferem entre si.

Geralmente, em plantas, as maiores concentrações de metais pesados se encontram nos órgãos envolvidos na absorção (Grant et al., 1998). No caso da *S. auriculata*, é na parte submersa, devido à folha submersa que é responsável pela absorção de água e nutrientes (Sculthorpe, 1967).

Estudos com plantas terrestres revelam que o íon  $\text{Cd}^{+2}$  entra facilmente pela raiz (Yang et al., 1998), onde pode ser retido e mantido pela parede celular das células da endoderme (Nishizono et al., 1989; Benavides et al., 2005).

Apenas pequenas quantidades desse íon são translocadas para a parte aérea, ficando a maior parte no sistema radicular (Cataldo et al., 1983).

Em trabalhos realizados com plantas aquáticas expostas ao Cd também foi observado maior teor do metal nas raízes, independente do grupo ecológico em que elas se encontram, como é caso da macrófita enraizada *Thypha dominguensis* (Ye et al., 1998), a macrófita submersa *Myriophyllum spicatum* (Sivaci et al., 2004) e a macrófita flutuante *Eichhornia crassipes* (Oliveira et al., 2001). Também em macrófitas do gênero *Salvinia*, expostas a outros metais pesados, foi observado que essas concentram maiores teores dos metais em suas folhas submersas, quando comparadas às folhas flutuantes, como a *S. cucullata* exposta ao Pb e Cd (Siriwan et al., 2006) e *S. herzogii* exposta ao Cr (Maine et al., 2004).

A concentração de Cd em *S. auriculata*, tanto na parte submersa como na parte aérea, aumentou com o aumento da concentração inicial do metal na solução (Figura 1). Entretanto, com este experimento, não foi possível determinar o valor máximo de Cd concentrado na planta, sendo necessárias maiores quantidades deste em solução para que tal valor seja alcançado.

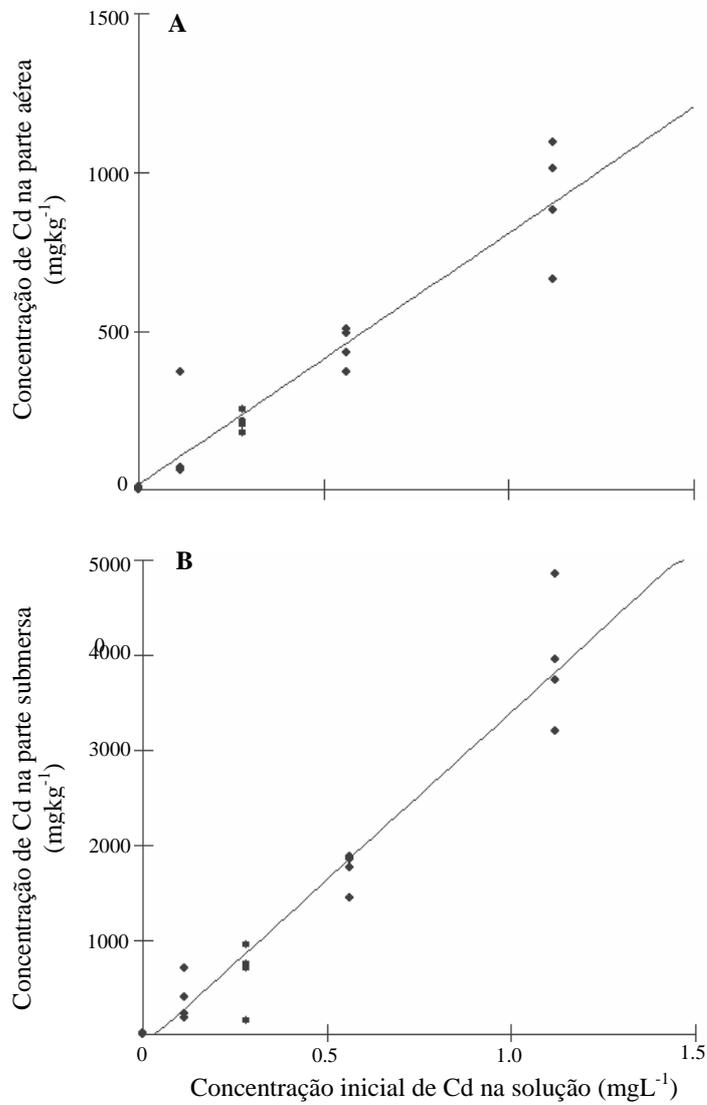


FIGURA 1 Regressão linear da concentração de Cd em *Salvinia auriculata*. **A:** concentração na parte aérea ( $R^2 = 0,9105$ ;  $y = 18,1195 + 792,4987x$ ;  $p < 0,0001$ ). **B:** concentração na parte submersa ( $R^2 = 0,9413$ ;  $y = -121,8564 + 395,3628x$ ;  $p < 0,0001$ ).

### 3.2 Efeito da bioconcentração de cádmio na morfologia e na ultraestrutura das folhas submersas de *Salvinia auriculata*

Todas as plantas submetidas ao Cd apresentaram alterações morfológicas e ultraestruturais em suas folhas submersas, sendo esses danos graduais com o aumento do acúmulo do metal em seus tecidos.

Ao terceiro dia de exposição ao Cd, foi possível observar o escurecimento das folhas submersas dos tratamentos de maior concentração (0,56 e 1,12 mgL<sup>-1</sup>) e, a partir do sétimo dia, a concentração de 0,28 mgL<sup>-1</sup> também apresentou os mesmos sintomas de toxidez (Figura 3).

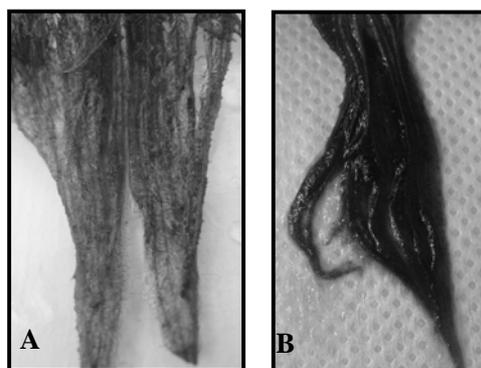


FIGURA 3 Folha submersa de *S. auriculata* ao terceiro dia de experimento. **A:** Controle; **B:** Tratamento com 1,12 mgL<sup>-1</sup> de Cd na solução.

As análises de microscopia mostraram danos qualitativos na estrutura das células (Figura 4). Tanto na concentração de 0,112 como na de 0,28 mgL<sup>-1</sup> a parede celular apresentou deformidades com grandes sinuosidades e, no tratamento submetido à concentração de 0,28 mgL<sup>-1</sup>, alguns pontos da parede e da membrana plasmática se romperam (Figura 4C).

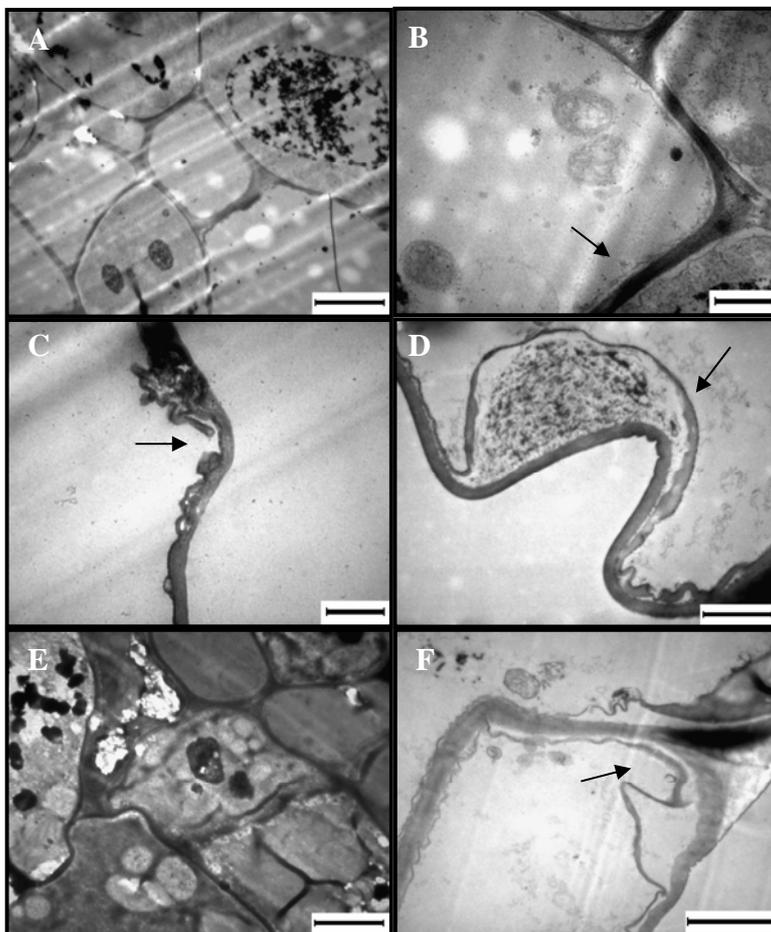


FIGURA 4 Fotomicrografia de secções de folhas submersas de *Salvinia auriculata*. **A:** Organização das células do controle (barra = 10 $\mu$ m); **B:** detalhe da parede celular do controle (ver seta) (barra = 2,5 $\mu$ m); **C:** parede celular de plantas submetidas à concentração de 0,28 mgL<sup>-1</sup> de Cd, apresentando rompimento da membrana plasmática (ver seta) (barra = 2,5 $\mu$ m); **D:** parede celular de plantas submetidas à concentração de 0,56 mgL<sup>-1</sup> de Cd, apresentando sinuosidade da parede e afastamento da membrana com deposição de material (ver seta) (barra = 5 $\mu$ m); **E:** células de plantas submetidas à concentração de 0,56 mgL<sup>-1</sup>, apresentando colapso da parede celular e morte celular (barra = 10 $\mu$ m); **F:** parede celular de plantas submetidas à concentração de 1,12 mgL<sup>-1</sup>, apresentando afastamento e rompimento da membrana celular (ver seta) (barra = 10 $\mu$ m).

Vários autores verificaram que a parede celular é um dos principais alvos da toxidez do Cd, sendo a perda de elasticidade (Barceló et al., 1988), a deformidade (Wojcik et al., 2005) e o rompimento (Sridhar et al., 2005), os danos mais comuns observados nesta estrutura, tanto em células de raiz como de folhas, em plantas expostas ao Cd.

Nas maiores concentrações (0,56 e 1,12 mgL<sup>-1</sup>) foi possível observar morte celular e retração do protoplasto em células epidérmicas (Figura 4E). Nesses tratamentos também foram observados rompimento e sinuosidade da parede celular em alguns pontos (Figura 4F). Houve deposição de material opaco entre a parede celular e a membrana plasmática, acarretando na invaginação da mesma (Figura 4D). O mesmo material opaco e escuro foi observado nos vacúolos na parte interna do tonoplasto. Esse material opaco pode ser acúmulo do próprio metal, uma vez que diversos estudos comprovaram que o Cd se deposita principalmente ao longo da parede celular e no interior de vacúolos (Sridhar et al., 2005; Wojcik et al., 2005).

#### 4 Conclusão

*Salvinia auriculata* concentrou teores consideráveis de Cd em seus tecidos, sendo essa concentração maior na parte submersa. Porém, quanto maior o teor de Cd concentrado pela planta, maior os danos em suas folhas submersas, como escurecimento e, em âmbito ultraestrutural, alterações principalmente na parede e membrana celular. Devida essa alta sensibilidade, *S. auriculata* pode ser um bioindicador da presença do Cd. Entretanto, a mesma possui potencial na remoção de Cd, sendo necessárias pesquisas baseadas na biotecnologia e no melhoramento genético, que visem aumentar a tolerância desta macrófita ao metal, podendo, então, ser utilizada como fitorremediador.

## 5 Referências bibliográficas

BARCELÓ, J.; VAZQUEZ, M. D.; POSCHENRIEDER, C. Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). **The New Phytologist**, Lancaster, v. 108, n. 1, p. 37-49, Jan. 1988.

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

BOSCHILIA, S. M.; THOMAZ, S. M.; PIANA, P. A. Plasticidade morfológica de *Salvinia herzogii* (de La Sota) em resposta à densidade populacional. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 35-39, jan./mar. 2006.

CATALDO, D. A.; GARLAND, T. R.; WILDUNG, R. E. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 73, n.3, p. 844-848, Nov. 1983.

COOK, C. D. K. **Aquatic plant book**. Amsterdam: SPB Academic, 1996. 228 p.

DEVI, M.; THOMAS, D. A.; BARBER, J. T.; FINGERMAN, M. Accumulation and physiological and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic food chain. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 33, n. 1, p. 38-43, Feb.1996.

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; ZACARKIM, C. E.; PALACIO, S. M.; OBREGÓN, C. L.; ZENATTI, D. C.; GALANTE, R. M.; ROSSI, N.; ROSSI, F. L.; PEREIRA, I. R. A.; WELTER, R. A. Removal of heavy metal from polluted river water using aquatic macrophytes *Salvinia sp.* **Brazilian Journal of Physics**, São Paulo, v. 35, n. 3B, p. 744-746, Sept. 2005.

GARDNER, J. L.; AL-HAMDANI, S. H. Interactive effects of aluminum and humic substances on salvinia. **Journal of Aquatic Plant Management**, Gainesville, v. 35, p. 30-34, Jan. 1997.

GRANT, C. A.; BUCKLEY, W. T.; BAILEY, L. D.; SELLES, F. Cadmium accumulation in crops. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 78, n.1, p. 1-17, Jan. 1998.

GUIMARÃES, F. P.; GOMES, C. Q.; MAGALHÃES, A. B. S.; FREITAS, T. V.; OLIVEIRA, J. A.; AGUIAR, R. Estudos laboratoriais de acúmulo e toxicidade de arsênio em *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 1, n. 2, p. 109-113, set. 2006.

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

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

NISHIZONO, H.; KUBOTA, K.; SUZUKI, S.; ISHII, F. Accumulation of heavy metals in cell walls of *Polygonum cuspidatum* roots from metalliferous habitats. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 30, n. 4, p. 595-598, June 1989.

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

OUTRIDGE, P. M.; HUTCHINSON, T. C. Effects of cadmium on integration and resource allocation in the clonal fern *Salvinia molesta*. **Oecologia**, New York, v. 84, n. 2, p. 215-223, Sept. 1990.

OLGUÍN, E. J.; HERNÁNDEZ, E.; RAMOS, I. The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. **Acta Biotechnologica**, Berlim, v. 22, n. 1/2, p. 121-131, May 2002.

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

SCULTHORPE, C. D. **The biology of aquatic vascular plants**. London: E. Arnold, 1967. p. 610.

SIVACI, E. R.; SIVACI, A.; SÖKMEN, M. Biosorption of cadmium by *Myriophyllum spicatum* L. and *Myriophyllum triphyllum* orchard. **Chemosphere**, Oxford, v. 56, n. 11, p. 1043-1048, Sept. 2004.

SIRIWAN, P.; MALEEYA, K.; PRAYAD, P.; SUCHART, U. Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in *Salvinia cucullata*. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 27, n. 4, p. 645-652, Oct. 2006.

SRIDHAR, B. B. M.; DIEHL, S. V.; HANC, F. X.; MONTS, D. L.; SU, Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, New York, v. 54, n. 2, p. 131-141 Sept. 2005.

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

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3051A: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: \_\_\_\_\_. **SW – 846**: test methods for evaluating solid waste, physical and chemical methods. Washington, 1998. 20 p.

WÓJCIK, M.; VANGRONSVELD, J.; D'HAENC, J.; TUKIENDORF, A. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* : II localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. **Environmental and Experimental Botany**, New York, v. 53, n. 2, p. 163-171, Apr. 2005.

WOLFF, G.; ASSIS, L. R.; CARVALHO, J. G.; PEREIRA, G. C.; CASTRO, E.; M. Efeitos da toxidez do zinco em folhas de *S. auriculata* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 01, p. 133-137, 2009.

YANG, M. G.; LIN, X. Y.; YANG, X. E. Impact of Cd on growth and nutrient accumulation of different plant species. **Chinese Journal of Applied Ecology**, Shenyang, v. 19, p. 89-94, 1998.

YE, Z.; BAKER, A. J. M.; WONG, M.; WILLIS, A. J. Zinc, lead and cadmium accumulation and tolerance in *Typha latifolia* as affected by iron plaque on the root surface. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 55-67, May 1998.

## **CAPÍTULO 4**

**Potencial fitorremediador de *Salvinia auriculata* na presença de chumbo**

## Resumo

O chumbo é um dos metais pesados mais utilizados pela humanidade, sendo a atividade antrópica a principal responsável pela poluição dos ecossistemas por este metal. O Pb, mesmo não sendo um elemento essencial, é facilmente absorvido pelas plantas, podendo causar diminuição em seu crescimento e biomassa, além de necroses nas folhas. Muitas plantas aquáticas são tolerantes à contaminação por Pb, podendo acumular altas concentrações do metal em seus tecidos, sendo, então, consideradas fitorremediadoras. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da bioacumulação do Pb por *Salvinia auriculata*, desde o nível ultraestrutural ao nível populacional, como a alocação de biomassa e o crescimento vegetativo, além de determinar o teor de Pb acumulado em seus tecidos, a fim de verificar o potencial fitorremediador dessa espécie. Para isso, plantas de *S. auriculata* foram cultivadas em solução nutritiva e submetidas a diferentes concentrações de Pb. Ao final de quinze dias de exposição procederam-se as análises. Os resultados indicaram um pequeno decréscimo na alocação de biomassa pela planta com o aumento da concentração de Pb na solução, porém, a capacidade de reprodução clonal não foi afetada. O número de novos ramos, ao final, não diferiu significativamente entre os tratamentos. *S. auriculata* acumulou concentrações consideráveis de Pb em seus tecidos, principalmente na parte submersa, sem apresentar danos morfológicos. Porém, alterações ultraestruturais foram detectadas em altas concentrações do metal, principalmente espessamento da parede celular. Essa alteração pode ser um mecanismo de plasticidade fenotípica dos indivíduos da espécie frente à contaminação por Pb, o que explica, em parte, a alta tolerância de *S. auriculata* a esse metal. Essa macrófita apresenta potencial promissor para ser utilizada como fitoextratora de Pb.

## Abstract

The Lead (Pb) it is one of the more metals used by the humanity, being the humans' activities the main responsible for the pollution of the ecosystems for this metal. Pb, same not being an essential element, it is absorbed easily by the plants could cause decrease in its growth, biomass besides necroses in the leaves. Many aquatic plants are tolerant to the contamination for Pb, could accumulate high concentrations of the metal in its tissues, being then considered phytoremediator. The objective of this work was to evaluate the effects of the bioaccumulation of Pb for *Salvinia auriculata* from the ultra-structural level at the population level, as the biomass allocation and vegetative growth, besides determining the accumulation of Pb in their tissues in order to verify the

potential phytoremediator of that species. Plants of *S. auriculata* were cultivated in nutrition solution and submitted to different concentrations of Pb. At the end of fifteen days of exhibition the analyses were preceded. The results indicated decrease in the biomass allocation for the plant with the increase of the concentration of Pb, however the capacity of clonal reproduction wasn't affected, and the number of new ramets didn't differ significantly among the treatments. To *S. auriculata* it was capable to accumulate considerable concentrations of Pb in their tissues, mainly in the part submerged, without presenting morphologic damages. However, ultra-structural alterations were detected in the high concentrations of the metal, mainly thickness of the cell wall. That alteration can be a mechanism of plasticity of the species front to the contamination for Pb, what explains, partly, the high tolerance of the *S. auriculata* to that metal. The macrophyte shows potential to be used as phytoremediator of Pb.

## 1 Introdução

O Pb é um metal utilizado em larga escala pela humanidade desde a antiguidade (Sharma & Dubey, 2005). Apesar de ser relativamente abundante na crosta terrestre e ocorrer naturalmente em águas superficiais, a contaminação dos ecossistemas por este metal pela atividade humana é predominante (ATSDR, 1993). Atividades de mineração e fundição são as principais fontes de Pb, além de fertilizantes, pesticidas e gasolina (Eick et al., 1999), poluindo os lagos, rios e oceanos pela deposição direta da atmosfera ou do escoamento superficial do solo (ATSDR, 1993). Uma vez liberado, o Pb possui longo tempo de residência comparado com a maioria dos poluentes (Alloway, 1993). Este metal é altamente tóxico aos homens, provocando problemas gastrintestinais, hematológicos, renais e neurológicos, principalmente em crianças (Paoliello & Chasin, 2001).

O Pb é um elemento não-essencial, porém, facilmente absorvido e acumulado pelas plantas. Com isso, são vários os estudos que têm demonstrado a capacidade dos vegetais de acumularem concentrações consideráveis deste metal em seus órgãos, principalmente na raiz (Sharma & Dubey, 2005).

Em relação às plantas aquáticas, é pouco provável que o Pb cause danos nos níveis encontrados no ambiente em geral (Paoliello & Chasin, 2001) e, devido a essa tolerância e potencial de acúmulo, as macrófitas aquáticas têm sido utilizadas como fitorremediadores promissores de Pb. Dentre elas, podem-se citar as macrófitas flutuantes *Pistia stratiotes* (Miretzky et al., 2004) e *Salvinia minima* (Olguin et al., 2002), entre outras. Porém, as plantas, quando expostas a elevadas concentrações deste metal, podem apresentar diminuição no crescimento e na biomassa (Paoliello & Chasin, 2001).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o potencial de acúmulo de Pb pela macrófita aquática flutuante *Salvinia auriculata* Aublet (Pteridophyta) e o efeito sobre seu crescimento clonal e ultraestrutura, a fim de verificar se esta planta pode ser utilizada como um fitorremediador em águas contaminadas por Pb.

Para alcançar tais objetivos, as seguintes hipóteses foram testadas: (1) *Salvinia auriculata* acumula altas concentrações de Pb em seus tecidos; (2) a capacidade de alocação de biomassa por *S. auriculata* não é afetada pela presença do Pb em seu meio de crescimento; (3) o Pb não afeta, de maneira significativa, o crescimento clonal de *S. auriculata* e (4) *Salvinia auriculata* não apresenta danos em sua morfoanatomia, quando exposta ao Cd.

## **2 Materiais e métodos**

### **2.1 Instalação dos experimentos**

Indivíduos de *Salvinia auriculata* foram obtidos em local livre de suspeitas de contaminação por Pb, à margem direita do rio Grande (44° 55' W; 21° 05' S) e, então, selecionados quanto à uniformidade do tamanho. Esses foram cultivadas em casa de vegetação por 5 dias em um recipiente com

capacidade de 25 L contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com 20% da força iônica e com pH entre 6,5 e 7.

Após o período de aclimação, os rametes foram separados e transferidos para recipientes transparentes de polietileno com capacidade de 1,0 L de solução contendo doses crescentes de Pb.

As concentrações de Pb na solução foram determinadas com base no valor máximo permitido (VMP) de Pb total para lançamento de efluentes em corpos d'água (Brasil, 2005), nesta legislação o VMP é de  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  (Tabela 1).

TABELA 1 Concentração, em  $\text{mgL}^{-1}$ , de Pb, na forma de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  na solução para obtenção dos tratamentos.

| <b>Tratamento</b> | <b>Concentração de Pb<br/>(<math>\text{mgL}^{-1}</math>)</b> | <b>Percentual do VMP<br/>(%)</b> |
|-------------------|--|----------------------------------|
| Controle          | 0  | 0                                |
| Tratamento 1      | 0,25   | 50                               |
| Tratamento 2      | 0,5  | 100                              |
| Tratamento 3      | 1,0  | 200                              |
| Tratamento 4      | 2,0  | 400                              |

Foram montados três experimentos distintos: um para avaliar o efeito do Pb no crescimento clonal e obtenção de biomassa, onde foi colocado um ramete por recipiente; outro para avaliar o efeito do Pb na ultraestrutura das folhas flutuantes e submersas de *S. auriculata*, onde foi colocado um ramete por recipiente e, por fim, um terceiro para análise de acúmulo de Pb pelas partes da planta, onde foram colocados quatro rametes por recipiente.

Em todos os experimentos, o delineamento amostral foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento, com tempo de duração de 15 dias cada, sendo a solução trocada a cada cinco dias, para evitar a proliferação de algas.

## **2.2 Crescimento clonal e alocação de biomassa**

Para determinar o crescimento clonal foi realizada a contagem do número de novos rametes ao final do experimento, para cada tratamento. A biomassa seca foi determinada separadamente para parte aérea (folhas flutuantes) e parte submersa (rizoma e folhas submersas), a fim de verificar diferença na alocação de biomassa nas plantas submetidas ao estresse do metal pesado.

As partes separadas foram secas em estufa, durante 72 horas, a 48°C e, então, pesadas para a determinação da matéria seca.

## **2.2 Efeito do chumbo na ultraestrutura de *S. auriculata***

Para verificar as modificações anatômicas foram realizadas análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Folhas submersas de dois rametes foram coletadas por repetição. Essas foram lavadas e imersas em solução fixativa (Karnoviskys modificado pH 7,2) por um período de 24 horas, depois lavadas em tampão cacodilato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio por 1 hora e, subsequentemente, desidratadas em série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por três vezes) e emersas em gradientes crescentes de Spur/acetona (30% por 8 horas, 70% por 12 horas e 100%, duas vezes, por 24 horas cada) e, então, montadas em moldes. Os moldes foram cortados em secções semifinas (0,85 µm) e ultrafinas (<100 nm), por meio do ultramicrótomato Reichert-Jung (ultracut E), com o auxílio de lâmina de diamante. As secções pós-contrastadas foram observadas e documentadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80 kV.

## **2.3 Análise do acúmulo de chumbo**

Ao fim de quinze dias de exposição, as plantas de *S. auriculata* foram separadas em parte submersa (rizoma e folha submersa) e parte aérea (folhas

flutuantes) e, então, secas em estufa, durante 72 horas. Para a determinação das concentrações do Pb, cerca de 0,5 g de material vegetal seco e triturado foram digeridos em 10 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado e aquecidos em forno de micro-ondas, durante 10 minutos, à pressão de 0,76 MPa. Após esta etapa, o material digerido foi filtrado e lavado em água tridestilada. Esse procedimento seguiu o método 3051<sup>a</sup> da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 1998).

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

Como controle de qualidade do método de extração e determinação de elemento traço, foi acrescentada, para cada grupo de cinco amostras de biomassa seca, uma amostra em “branco”. Para o “branco” do método de extração e determinação de elementos-traço, foi utilizado o mesmo procedimento de digestão, porém, contendo apenas ácido nítrico, sem amostra alguma. O resultado obtido na leitura, o chamado branco do método, foi utilizado para calcular o limite de detecção do método (LDM) e, por meio do valor obtido, calculou-se o limite de quantificação do método (LQM).

O acúmulo de Pb nos tecidos de *S. auriculata* foi calculado com base nas concentrações e produção de massa seca, sendo os valores obtidos em mg.kg<sup>-1</sup>.

#### **2.4 Análise dos dados**

Para verificar se houve diferença no crescimento clonal e alocação de biomassa por *S. auriculata* nos diferentes tratamentos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), com as médias sendo comparadas pelo teste de Tukey, a 5%.

Para verificar a concentração de Pb em *S. auriculata* nas partes aérea e submersa, foram realizadas regressões, em que o teor do metal foi considerado

variável dependente e a concentração Cd inicial na solução, variável independente. E, para verificar se houve diferença significativa entre os tratamentos, foi realizada análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey.

### **3 Resultados e discussão**

#### **3.1 Crescimento clonal e alocação de biomassa**

O efeito de toxidez mais pronunciado pelo Pb em *S. auriculata* foi a redução na biomassa (Figura 1).

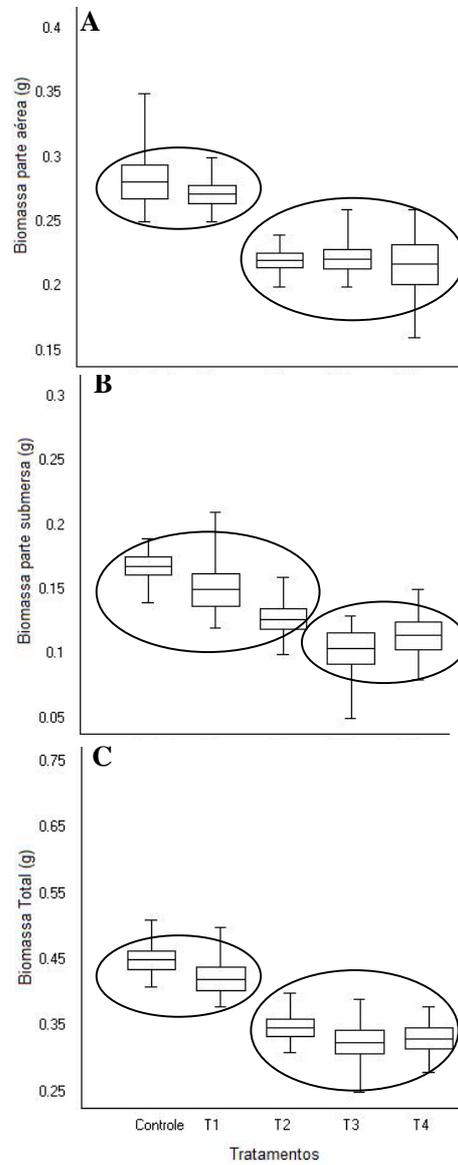


FIGURA 1 Box-plot da biomassa (g) de *S. auriculata* submetida a diferentes concentrações de Pb. **A**: biomassa aérea ( $F = 9,5399$ ;  $p = 0,0001$ ); **B**: biomassa submersa ( $F = 10,6910$ ;  $p < 0,0001$ ); **C**: biomassa total ( $F = 17,479$ ;  $p < 0,0001$ ).

O Pb diminui a alocação de biomassa de *S. auriculata* a partir da concentração de 0,5 mgL<sup>-1</sup>, sendo a biomassa submersa significativamente afetada a partir da concentração de 1,0 mgL<sup>-1</sup>. Diversas espécies de plantas terrestres apresentam reduções em sua biomassa quando expostas ao Pb, como é o caso de plantas de arroz, que reduziram até 20% da sua produção em concentrações altas de Pb (Andrade et al., 2008) e do cedro e do ipê, que tiveram 32% e 24% de redução, respectivamente (Paiva et al., 2000). Valores similares foram verificados para este trabalho, em que a máxima redução encontrada foi de 26% da biomassa total das plantas do tratamento de maior concentração, comparado ao controle. Este valor é alto quando comparado com *Salvinia rotundifolia*, que apresentou redução máxima de 10% em sua biomassa total, quando submetida à concentração de 1,021 mgL<sup>-1</sup>, porém, foram apenas 6 dias de exposição (Banerjee & Sarker, 1997). Redução no crescimento e de produção de biomassa são respostas gerais da toxicidade dos metais pesados em plantas (Malavolta, 1994).

Contudo, não houve diferença significativa entre tratamentos do número de novos ramos ao fim do experimento. Esse resultado mostra que, mesmo com a redução da biomassa, o Pb não afetou a capacidade de crescimento clonal de *S. auriculata*, sendo a mesma capaz de reproduzir assexuadamente nas concentrações estudadas.

### **3.2 Efeito do chumbo na ultraestrutura de *S. auriculata***

Não foram observados danos morfológicos, como cloroses, manchas e necroses, nas plantas de *S. auriculata*. Os tricomas em formato de coroa na superfície adaxial das folhas flutuantes, que são importantes estruturas na identificação dessa espécie e na sua capacidade de flutuação pelo fato de serem hidrofóbicos, permaneceram intactos em todos os tratamentos (Figura 2). Em estudo realizado com *S. minima* verificou-se que esta espécie só apresenta

injúrias externas a partir de concentrações de  $28,4 \text{ mgL}^{-1}$  na solução, sendo esses danos caracterizados por manchas marrons nas folhas e cloroses (Sánchez-Galván et al., 2008)

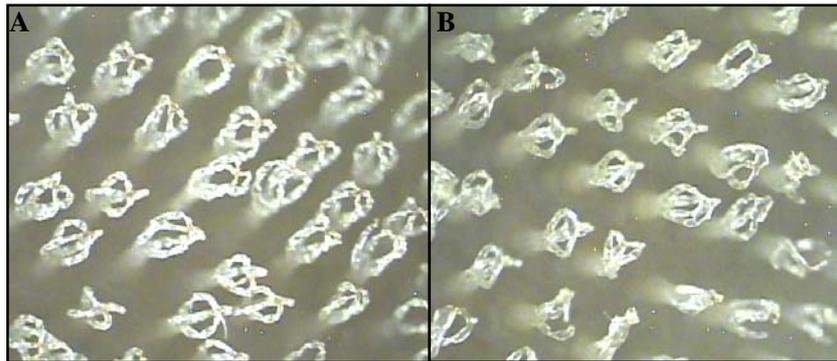


FIGURA 2 Tricomas em formato de coroa da face adaxial das folhas flutuantes de *S. auriculata*. **A:** controle; **B:** concentração de  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  de Pb na solução.

Nenhuma alteração ultraestrutural foi observada no tratamento de menor concentração ( $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ ). A partir do segundo tratamento, tanto nas folhas flutuantes como na folha submersa, foi observado um aumento na reserva de amido em relação ao controle (Figura 3C e 3D). O acúmulo de amido em plantas expostas a metais pesados também foi relatado por Samarakoon & Rauser (1979), em folhas de *Phaseolus vulgaris* submetidas a níquel, cobalto e cobre. Uma possível explicação para este fato é a deficiência de S na planta, que acarreta um maior acúmulo de carboidratos (Malavolta, 2006). Paiva et al. (2002) observaram que, com o aumento da concentração de Pb na solução, houve diminuição no teor de S em *Cedrela fissilis*.

Em todos os tratamentos, foi observado o aumento no tamanho dos vacúolos (Figura 3E) e, nas concentrações de  $1,0$  e  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ , a parede celular das células da epiderme e do mesofilo apresentaram sinuosidade e espessamento, além do afastamento da membrana plasmática em alguns pontos (Figura 3F e 3G).

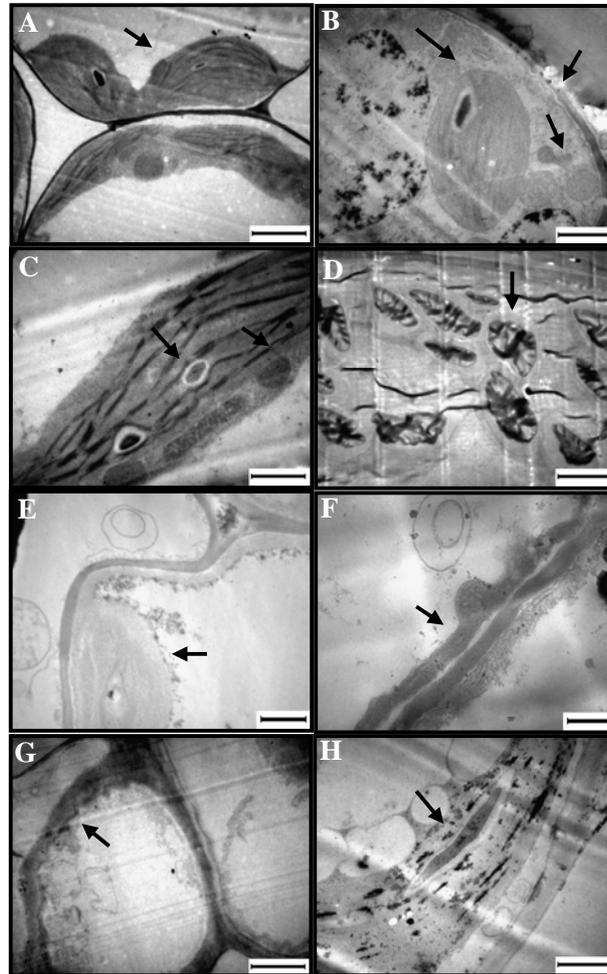


FIGURA 3 Fotomicrografia de transmissão de *S. auriculata* **A:** célula da folha flutuante no controle, apresentando parede celular e cloroplastos (ver seta) (barra =  $10\mu\text{m}$ ); **B:** célula da folha submersa no controle, apresentando parede celular e organelas (ver seta) (barra =  $5\mu\text{m}$ ); **C:** detalhe do cromossomo com reserva de amido e mitocôndrias de célula da folha flutuante do controle (ver seta) (barra =  $5\mu\text{m}$ ); **D:** Célula de folha submersa do T2, apresentando vacúolo com deposição de material na parte interna do tonoplasto (ver seta) (barra =  $10\mu\text{m}$ ); **E:** detalhe do cromossomo com grande reserva de amido na célula de folha flutuante do T2 (ver seta) (barra =  $2,5\mu\text{m}$ ); **F:** célula de folha submersa do T4, apresentando sinuosidade da parede celular (ver seta) (barra =  $2,5\mu\text{m}$ ); **G:** célula de folha flutuante de T4, apresentando espessamento da parede celular (ver seta) (barra =  $10\mu\text{m}$ ); **H:** detalhe do cromossomo de folha flutuante de T4, apresentando má formação (ver seta) (barra =  $5\mu\text{m}$ ).

Tanto o aumento dos vacúolos como as alterações na parede celular podem ser explicados pelo acúmulo do metal nessas estruturas. Os íons de Pb se acumulam preferencialmente nos espaços intercelulares, na parede celular e no vacúolo (Sharma & Dubey, 2005). Já foi relatado que 96% do Pb acumulado por raízes de plantas terrestres encontram-se na parede celular e no vacúolo (Wierzbicka & Antosiewicz, 1993). Em *Lemma minor*, foi observada deposição de Pb significativa nos vacúolos durante a primeira hora de exposição, tendo, a partir da sexta hora, altas concentrações de Pb sido depositadas na parede celular, causando a invaginação da membrana plasmática (Smardakiewicz & Wozny, 2000).

A alteração na parede celular pode ser vista como plasticidade adaptativa que a *S. auriculata* apresenta frente ao estresse da contaminação. Isso ocorre porque a tolerância ao Pb, em muitas plantas, está relacionada a propriedades da parede celular, com o aumento da rigidez e do espessamento da mesma (Kabata-Pendias & Pendias, 1992).

Na maior concentração de Pb, algumas organelas apresentaram deformações, como mitocôndrias e, principalmente, cloroplastos com distúrbios nos tilacoides (Figura 3H). Esses danos podem ser em função de acúmulo de pequenas concentrações de Pb por essas organelas (Sharma & Dubey, 2005).

### **2.3 Acúmulo de chumbo por *S. auriculata***

Em todos os tratamentos, exceto o controle, foi possível a quantificação das concentrações de Pb nas partes aérea e submersa da planta. *S. auriculata* demonstrou potencial promissor na remoção do Pb na solução nutritiva, concentrando quantidades consideráveis do metal em seus tecidos, principalmente na parte submersa (Figura 4).

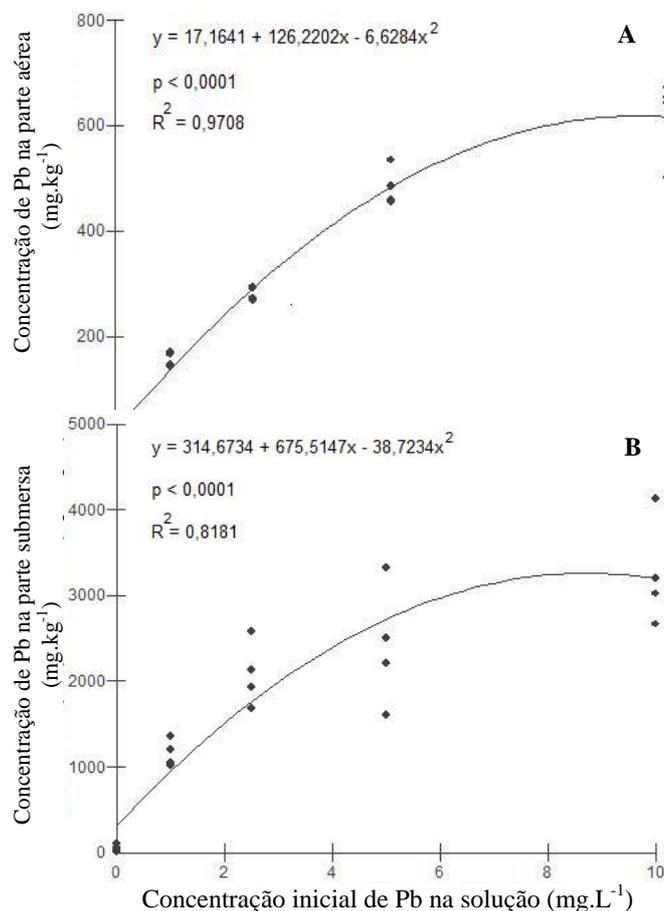


FIGURA 4 Regressão não-linear da bioacumulação de Pb por *S. auriculata*. **A:** acúmulo pela parte aérea; **B:** acúmulo pela parte submersa.

Em todos os tratamentos submetidos ao Pb, a parte submersa foi responsável por mais de 77% da concentração do metal. Devido ao fato de folhas submersas apresentarem função de raiz, absorvendo água e nutrientes (Sculthorpe, 1967), essas também absorvem e concentram teores consideráveis de íons em seus tecidos, como as raízes verdadeiras. A absorção do Pb se dá pela membrana plasmática e se move da raiz via apoplasto (Sharma & Dubey, 2005), porém, barreiras, como a endoderme, evitam grande parte da translocação desse

metal para a parte aérea das plantas, sendo esse um possível motivo para explicar os altos acúmulos de Pb pelas raízes das plantas (Verma & Dubey, 2003).

Em trabalhos realizados com *S. minima* verificou-se que esta espécie concentrou  $7.705 \text{ mgkg}^{-1}$  quando exposta a uma solução contendo  $3 \text{ mgL}^{-1}$  durante cinco dias (Olguin et al., 2002) e  $2.000 \text{ mgkg}^{-1}$  em solução com  $2,7 \text{ mgL}^{-1}$  em 24 horas (Sánchez-Galván et al., 2008).

O Pb acumulado por *S. auriculata* foi maior na concentração de  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  do metal em solução (Tabela 2).

TABELA 2 Média de Pb acumulado por *S. auriculata*, valor calculado em função da produção de massa seca.

| <b>Biomassa seca total produzida por tratamento (g)</b> | <b>Média do Pb acumulado na parte submersa (<math>\text{mgkg}^{-1}</math>)</b> | <b>Média do Pb acumulado na parte aérea (<math>\text{mgkg}^{-1}</math>)</b> |
|---|--|---|
| 0,45 A  | 4,82 C   | 2,28 D  |
| 0,40 A  | 168,55 B   | 39,63 C   |
| 0,35 B  | 261,74 B   | 62,70 C   |
| 0,30 B  | 216,99 B   | 96,40 B   |
| 0,33 B  | 463,40 A   | 124,46 A  |
| F = 17,479  | F = 13,9024  | F = 79,1921   |
| P < 0,0001  | p = 0,0002   | p < 0,0001  |

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na mesma coluna, não diferem entre si.

Estudos de acúmulo de Pb por plantas aquáticas demonstraram que a maior concentração desse metal encontra-se nas raízes das plantas, decrescendo na ordem rizoma>folha>flor>caule>semente (Sawidis et al., 1995). Em plantas terrestres, o maior acúmulo de Pb também se dá nas raízes seguindo a ordem: raiz>folhas>caule>inflorescência>sementes (Sharma & Dubey, 2005).

As altas concentrações de Pb acumuladas por *S. auriculata* sugerem que esta espécie é um excelente removedor desse poluente em meios contaminados.

#### 4 Conclusão

*Salvinia auriculata* acumulou concentrações consideráveis de Pb em seus tecidos, principalmente na parte submersa. Houve um decréscimo na biomassa da planta, porém, a mesma não perdeu sua capacidade de reprodução clonal e sobrevivência, visto que nenhum ramete morreu durante os experimentos. *S. auriculata* não apresentou danos morfológicos e as alterações ultraestruturais só foram observadas a partir das concentrações de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. Essa alteração é uma plasticidade anatômica que a planta apresenta com a finalidade de aumentar seu grau de tolerância à contaminação. Sendo assim, *S. auriculata* pode ser utilizada como um fitorremediador potencial em áreas contaminadas por Pb.

#### 5 Referências bibliográficas

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

ANDRADE, A. F. M.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAGALHÃES, M. O. L.; NASCIMENTO, V. S.; MAZUR, N. Zinco, chumbo e cádmio em plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) cultivadas em solo após adição de resíduo siderúrgico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1877-1885, out. 2008.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for lead**. Atlanta: ATSDR, 1993. 307 p.

BANERJEE, G.; SARKER, S. The role of *Salvinia rotundifolia* in scavenging aquatic Pb (II) pollution: a case study. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 17, n. 5, p. 295-300, Oct. 1997.

BRASIL. 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. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 mar. 2005.

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

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

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 2. ed. Boca Raton: CRC, 1992. 365 p.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental : micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos**. São Paulo: ProduQuímica, 1994. 153 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

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

OLGUÍN, E. J.; HERNÁNDEZ, E.; RAMOS, I. The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 22, n. 1/2, p. 121-131, May 2002.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O. Efeito de Cd, Ni, Pb e Zn sobre mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standley) em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 369-378, 2000.

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

PAOLIELLO M. M. B.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos**. Salvador: CRA, 2001. v. 3, 144 p. (Série Caderno de Referência Ambiental,1).

SAMARAKOON, A. B.; RAUSER, W. E. Carbohydrate levels and photoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess Cobalt, Nickel, and Zinc. **Plant Physiology**, Washington, v. 63, n. 6, p. 1165-1169, June 1979.

SAMARDAKIEWICZ, S.; WOZNY, A. The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. **Plant Soil**, Amsterdam, v. 226, n. 1, p. 107-111, Sept. 2000.

SÁNCHEZ-GALVÁN, G.; MONROY, O.; GÓMEZ, J.; OLGUÍN, E. J. Assessment of the hyperaccumulating lead capacity of *Salvinia minima* using bioadsorption and intracellular accumulation factors. **Water, Air and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 194, n.1/4, p.77-90, Oct. 2008.

SAWIDIS, T.; CHETTRI, M. K.; ZACHARIADIS, G. A.; STRATIS, J. A. Heavy metals in aquatic plants and sediments from water systems in Macedonia, Greece. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 32, n. 1, p. 73-80, Oct. 1995.

SCULTHORPE, C. D. **The biology of aquatic vascular plants**. London: E. Arnold, 1967. p. 610.

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

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3051A : microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: \_\_\_\_\_. **SW – 846**: test methods for evaluating solid waste, physical and chemical methods. Washington, 1998. 20 p.

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

WIERZBICKA, M.; ANTOSIEWICZ, D. How lead can easily enter the food chain. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 1, p. 423-429, 1993.