

BIOACUMULAÇÃO DE ARSÊNIO POR *Eichhornia crassipes* (Mart.)  
Solms E SUAS IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS

**ANNALIZA CARVALHO MENEGUELLI DE SOUZA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY REIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
AGOSTO 2013



BIOACUMULAÇÃO DE ARSÊNIO POR *Eichhornia crassipes* (Mart.)  
Solms E SUAS IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS

**ANNALIZA CARVALHO MENEGUELLI DE SOUZA**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte das exigências para a  
obtenção do título de mestre em Ecologia e  
Recursos Naturais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Maria Magalhães de Souza  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Angela Pierre Vitória

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
AGOSTO – 2013

BIOACUMULAÇÃO DE ARSÊNIO POR *Eichhornia crassipes* (Mart.)  
Solms E SUAS IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS

**ANNALIZA CARVALHO MENEGUELLI DE SOUZA**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte das exigências para a  
obtenção do título de mestre em Ecologia e  
Recursos Naturais.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Comissão Examinadora:

---

Profº. Renato Crespo Pereira (Dr. em Química de Produtos Naturais) – UFF

---

Profº. Eliemar Campostrini (Dr. em Produção Vegetal) – UENF

---

Profº. Álvaro Ramon Coelho Ovalle (Dr. em Ecologia e Recursos Naturais) – UENF

---

Profª. Angela Pierre Vitória (Drª. em Biologia Vegetal) – UENF (Co-orientadora)

---

Profª. Cristina Maria Magalhães de Souza (Drª. em Biofísica) – UENF (Orientadora)

“Paga-se mal a um mestre  
aquele que permanece aluno”.  
*(Friedrich Nietzsche)*

Aos meus amados pais,  
Maria Aparecida e João Batista e  
minha querida irmã Lara.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por mais esta conquista.

Agradeço a meus pais, por acreditarem no meu futuro e por todo apoio que deram durante o mestrado. A vocês todo meu amor e carinho.

Agradeço a minha querida irmã e eterna companheira de república por todos os momentos de compreensão, apoio, carinho e risadas.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Cristina Maria Magalhães de Souza pela orientação, paciência, amizade e, sobretudo, por todos os ensinamentos passados durante o mestrado, principalmente por me ajudar a desenvolver o senso crítico perante a pesquisa científica. O meu sincero obrigada por acreditar e confiar em mim.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Angela Pierre Vitória pela disposição em ajudar no desenvolvimento do trabalho, pelo auxílio na interpretação dos dados de ecofisiologia, por ótimas sugestões e por contribuir em minha formação profissional.

Agradeço a todos os colegas e amigos do LCA, em especial a Clara, Layra, Inácio, Tatiane, Maria Stela, Thais, Maria Angélica, Adélia, Jorge, Anna e Marcela, seja pela ajuda na parte experimental e na análise de dados em meu trabalho como por tornar os dias no laboratório mais agradáveis.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Marina Satika Suzuki e a Pós Doc. Aline Chaves Intorne pela criteriosa revisão e colaboração nesse trabalho.

Agradeço ao Dr. Marcelo Almeida pelos ensinamentos na utilização de equipamentos do LCA e pela inquestionável ajuda e paciência no desenvolvimento de metodologias essenciais a essa pesquisa.

Agradeço aos técnicos Helmo e Gerson pelo auxílio nas coletas de campo e ao técnico Alcemir pela ajuda em laboratório.

Agradeço a Arleide Ferreira e Kathelyn Cordeiro pela amizade, por me “acolherem” em Campos sempre que necessário e por todos os momentos divertidos que passamos juntas.

Agradeço a Ildfonso Alvarenga Cordeiro Jr. por não medir esforços em ajudar, pela paciência, companheirismo, estímulo e pelo carinho sempre presente.

Agradeço a UENF e ao Laboratório de Ciências Ambientais, pelo suporte logístico.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa.

## SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Anexos.....	xv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xviii
Introdução Geral.....	19
Referências Bibliográficas.....	23

### Capítulo 1

Bioacumulação e Alterações Ecofisiológicas em <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms submetida a estresse por Arsênio.....	29
Resumo.....	29
Abstract.....	30
1.1 Introdução.....	31
1.2 Objetivo.....	32
1.3 Hipótese.....	32
1.4 Material e Métodos.....	33
1.4.1 Material vegetal e tratamentos.....	33
1.4.2 Sintomatologia visual das plantas.....	35
1.4.3 Monitoramento da solução nutritiva.....	35
1.4.4 Determinação do As.....	35
1.4.5 Determinação do fator de bioacumulação (FBA) e do fator de translocação (FT).....	36
1.4.6 Medidas de trocas gasosas.....	36
1.4.7 Medidas de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	37
1.4.8 Pigmentos fotossintéticos.....	37
1.4.9 Análise estatística.....	38
1.5 Resultados.....	38
1.5.1 Aspectos visuais.....	38
1.5.2 Quantificação de As.....	39

1.5.3 Trocas gasosas.....	41
1.5.4 Parâmetros da Fluorescência da Clorofila a e Pigmentos Fotossintéticos.....	45
1.5.5 Parâmetros Físico-Químicos.....	44
1.6 Discussão.....	48
1.7 Conclusão.....	56
1.8. Referências Bibliográficas.....	57
Anexos.....	69

## Capítulo 2

Efeitos do Arsênio na Absorção de Nitrato e Fosfato por <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.....	73
Resumo.....	73
Abstract.....	74
2.1 Introdução.....	75
2.2 Objetivo.....	78
2.3 Hipótese.....	78
2.4 Material e Métodos.....	79
2.4.1. Coleta das amostras.....	79
2.4.2 Desenho Experimental.....	80
2.4.3 Monitoramento da solução nutritiva.....	82
2.4.4 Dinâmica de coleta da solução nutritiva.....	82
2.4.5 Determinação do As, PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> e NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	83
2.5 Resultados.....	83
2.5.1 Teor de As, PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> e NO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> na solução nutritiva.....	83
2.5.2 Parâmetros Físico-químicos.....	86
2.6 Discussão.....	88
2.7 Conclusão.....	94
2.8 Referências Bibliográficas.....	95
Conclusão Geral.....	106
Considerações Finais.....	107

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

$A$  = Taxa fotossintética líquida

$As$  = Arsênio

$As^{5+}$  = Arsenato

$AsO_4^{3-}$  = Arsenato

$As^{3+}$  = Arsenito

$AsO_2^{1-}$  = Arsenito

ATP = Adenosina trifosfato

$C_i$  = Concentração subestomática de  $CO_2$

Caro = Carotenoides

CCCP = Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrozona

Cd = Cádmi

Clo  $a$  = Clorofila  $a$

Clo  $b$  = Clorofila  $b$

Co = Cobalto

Cr = Cromo

Cu = Cobre

DMAA = Ácido dimetilarsínico

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = Ácido desoxirribonucleico

$E$  = Transpiração

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs = Radicais livres de oxigênio

$F_0$  = Fluorescência mínima

FBA = Fator de Bioacumulação

Fe = Ferro

$FeCl_3$  = Cloreto férrico

$F_m$  = Fluorescência máxima

FT = Fator de Translocação

$F_v$  = Fluorescência variável

$F_v/F_m$  = Rendimento quântico máximo

$F_v/F_0$  = Taxa variável de rendimento

GOGAT = Glutamato sintetase  
g<sub>s</sub> = Condutância estomática  
GS = Glutamina sintetase  
GSH = Glutathione  
HCl = Ácido clorídrico  
Hg = Mercúrio  
HNO<sub>3</sub> = Ácido nítrico  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peróxido de hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = Ácido sulfúrico  
ICP-AES = Espectrofotômetro de Emissão Atômica por Plasma Acoplado  
Indutivamente  
MMAA = Ácido monometilarsônico  
Mn = Manganês  
N = Nitrogênio  
Na<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub> = Arsenato de sódio  
NADP = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato  
NaOH = Hidróxido de sódio  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Amônio  
Ni = Níquel  
NiR = Nitrito redutase  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito  
NR = Nitrato redutase  
Pb = Chumbo  
PC = Fitoquelatina  
PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Fosfato  
qNP = Quenching não fotoquímico  
qP = Quenching fotoquímico  
RNA = Ácido ribonucleico  
SOD = Superóxido dismutase  
USEPA = Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos  
Zn = Zinco

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Concentração de As em diferentes matrizes no Brasil..... 20

### Capítulo 1

Tabela 1.1: Média dos valores dos parâmetros de fluorescência da clorofila a em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$  .....44

Tabela 1.2. Média nos valores de pigmentos fotossintetizantes em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$  .....44

### Capítulo 2

Tabela 2.1: Reagentes, seus respectivos pesos e diluições utilizadas para a preparação da solução estoque de micronutrientes..... 81

Tabela 2.2: Reagentes, seus respectivos pesos e diluições utilizadas para a preparação da solução estoque de macronutrientes e Fe + EDTA..... 81

Tabela 2.3: Dinâmica da coleta de amostras da solução nutritiva para análise do teor de As,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  ..... 82

Tabela 2.4: Intervalo da variação nos parâmetros físico-químicos na Lagoa do Campelo..... 94

## Lista de Figuras

### Capítulo 1

- Figura 1.1: Lagoa do Campelo (A); *Eichhornia crassipes* acondicionada em recipientes plásticos (B); Triagem (C); Pesagem (D).....34
- Figura 1.2: Experimento conduzido em casa de vegetação com *Eichhornia crassipes*..... 35
- Figura 1.3: Aspectos visuais de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$  .....38
- Figura 1.4: Média do teor de As em folhas (A) e raízes (B) de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$  .....39
- Figura 1.5: Média do Fator de translocação (FT) de As em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$  .....40
- Figura 1.6: Média do Fator de bioacumulação (FBA) em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$  .....41
- Figura 1.7: Média dos valores da taxa fotossintética líquida (A), concentração subestomática de  $\text{CO}_2$  (B), condutância estomática (C) e transpiração (D) em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$  .....42
- Figura 1.8: Média dos valores de pH (A)  $\text{O}_2$  dissolvido (B) e condutividade elétrica (C) monitorados ao longo do experimento.....47
- Figura 1.9: Representação esquemática da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas..... 54

## Capítulo 2

Figura 2.1: Absorção de arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) e arsenito ( $\text{AsO}_2^{1-}$ ) e o metabolismo em raízes de plantas.....76

Figura 2.2: Absorção e assimilação de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) na célula vegetal.....78

Figura 2.3: Coleta e preparo das amostras: Lagoa do Campelo (A); *Eichhornia crassipes* acondicionada em recipientes plásticos (B); Triagem (C); Pesagem (D).. 80

Figura 2.4: Experimento conduzido em casa de vegetação.....81

Figura 2.5: Média do teor de As (A),  $\text{PO}_4^{3-}$  (B) e  $\text{NO}_3^-$  (C) na solução nutritiva ao longo do experimento.....85

Figura 2.6: Média dos valores de pH (A)  $\text{O}_2$  dissolvido (B) e condutividade elétrica (C) monitorados ao longo do experimento.....87

## Lista de Anexos

### Capítulo 1

Anexo I: Peso seco dos indivíduos de <i>Eichhornia crassipes</i> (n=36).....	69
Anexo II: Variação da intensidade luminosa na casa de vegetação.....	70
Anexo III: Teor de As (%) na raiz e folhas de indivíduos de <i>Eichhornia crassipes</i> .....	70
Anexo IV: Teor de As em indivíduos de <i>Eichhornia crassipes</i> (raiz + folha).....	71
Anexo V: Teor de As na solução nutritiva.....	71
Anexo VI: Média do Fator de bioacumulação (FBA) em folhas (A) e raízes (B) de <i>Eichhornia crassipes</i> expostas a diferentes tempos e tratamentos de $AsO_4^{3-}$ .....	72

## RESUMO

Dois experimentos hidropônicos independentes foram realizados com plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*) a fim de avaliar sua capacidade de acumulação e tolerância a arsênio (As) (1), bem como a influência do As na absorção de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) pela planta (2). Em ambos os experimentos As foi adicionado na solução nutritiva na forma de arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) nas concentrações 0,0; 0,2; 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ . No primeiro experimento (1) as plantas foram submetidas a três tempos de exposição ao metaloide, 0, 48 e 96h, sendo retiradas amostras vegetais e da solução nutritiva, e medidos os parâmetros ecofisiológicos (trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e teor de pigmentos fotossintetizantes) em cada tempo. Em geral, o teor de As na planta aumentou com o incremento desse elemento na solução nutritiva, sendo retido preferencialmente na raiz, o que é confirmado pelo baixo fator de translocação de As encontrado nas plantas. Diminuição significativa na taxa fotossintética líquida, condutância estomática, clorofilas *a* e *b* e as razões  $F_v/F_m$  e  $F_v/F_0$  ocorreu a partir de 48h para os tratamentos de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ . Os indivíduos expostos ao tratamento de 0,2  $\text{mg.L}^{-1}$  não apresentaram comprometimento de suas funções ecofisiológicas, além de possuírem elevado fator de bioacumulação indicando que as plantas foram mais eficientes na remoção de As do meio quando submetidas a baixas concentrações. No segundo experimento (2) foram analisadas somente amostras da solução nutritiva, coletadas durante quatro dias em intervalos que variaram entre minutos e horas. Valores decrescentes na concentração do metaloide e de ambos os nutrientes foram observados no primeiro dia, seguido por valores crescentes até o final do experimento, destacando-se o tratamento de 20  $\text{mg.L}^{-1}$ . O As diminuiu a absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  por *E. crassipes* nas concentrações de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ , provavelmente devido a diminuição da taxa fotossintética, observada no primeiro experimento. No tratamento de 0,2  $\text{mg.L}^{-1}$  a variação dos nutrientes na solução nutritiva manteve um padrão semelhante ao tratamento controle, sugerindo que nesta concentração As não prejudicou a absorção de nutrientes pela planta. A partir dos resultados do presente estudo é possível inferir que sob as condições experimentais impostas As acarreta comprometimento metabólico e prejuízo na assimilação de nutrientes em *E.*

*crassipes* a partir de 48 horas de exposição ao metaloide, para os tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: Arsênio, *Eichhornia crassipes*, tolerância.

## ABSTRACT

Two independent hydroponic experiments were performed with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in order to assess their ability to accumulation and tolerance arsenic (As) (1), as well as the influence of the uptake of phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) and ( $\text{NO}_3^-$ ) for the plant (2). In both experiments As was added in the form of arsenate ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) in nutrient solution at concentrations 0,0; 0,2; 2,0 and 20  $\text{mg L}^{-1}$ . In the first experiment (1) plants were submitted to three times of exposure to the metalloid, 0, 48 and 96h, being removed samples from plants and nutrient solution and measured ecophysiological parameters (gas exchange, fluorescence of chlorophyll *a* and content photosynthetic pigments) at each time. Overall the content from As in plants increased with the increment of this element in the nutrient solution, being retained preferentially in the roots over the leaves, which is confirmed by the low translocation factor As found in plants. Significant decrease in net photosynthetic rate, stomatal conductance, chlorophyll *a* and *b* and the  $F_v/F_m$  and  $F_v/F_0$  ratio occurred from 48h to treatments 20, and 20  $\text{mg.L}^{-1}$ . Individuals exposed to treatment of 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  showed no impairment of its ecophysiological functions, besides their high bioaccumulation factor indicating that under the conditions of this study, the plants were more efficient in removing As of the middle when exposed to low concentrations. In the second experiment (2) was analyzed only samples of the nutrient solution, which were collected for four days at intervals ranging from minutes to hours. The concentration of metalloid and both nutrients exhibited decreasing values on day one, followed by increasing values until the end of the experiment, mostly for the treatment of 20  $\text{mg.L}^{-1}$ . As decreased the absorption of  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{NO}_3^-$  by *E. crassipes* in concentrations of 2,0 and 20  $\text{mg.L}^{-1}$ , probably due to decreased photosynthetic rate observed in the first experiment. In the treatment of 0,2  $\text{mg.L}^{-1}$  variation of nutrients in nutrient solution remained similar standard to control, suggesting that this concentration As not damaged uptake the nutrients by the plant. From the results of this study is possible infer that under the experimental conditions imposed As causes metabolic impairment and injury nutrient assimilation in *E. crassipes* from 48 hours of exposure to the metalloid, to treatments 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Keywords: Arsenic, *Eichhornia crassipes*, tolerance.

## INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da utilização de recursos naturais pelo homem devido às inovações tecnológicas e ao crescimento da população tem levado à introdução e ao acúmulo de elementos traço no ambiente, limitando a disponibilidade de água de qualidade tanto para irrigação quanto para o abastecimento da população (Mukherjee *et al.*, 2008). No ambiente, os elementos traço atuarão de acordo com seu estado físico-químico e as condições químicas do meio, podendo degradar o solo, destruir ecossistemas e reduzir a diversidade biológica (Hao, *et al.*, 2004).

O As é um elemento com caráter tóxico para organismos em geral, sendo cancerígeno para humanos (Smith *et al.*, 2002). Do ponto de vista químico é um metaloide, isto é, um elemento com propriedades intermédias entre as dos metais e as dos não-metals (Csuros e Csuros, 2000), ocorrendo naturalmente no ambiente em diferentes estado de oxidação, -3, 0, +3, +5 (Guimarães, 2006). Seu estado de oxidação determina o potencial de contaminação (Jain e Ali 2000), sendo que a ordem crescente de toxicidade desse elemento é: compostos de  $As^{5+}$  orgânico < compostos de  $As^{3+}$  orgânico < compostos de  $As^{5+}$  inorgânico < compostos de  $As^{3+}$  inorgânico (USEPA, 2000). O  $As^{3+}$  inorgânico é 60 vezes mais tóxico que o  $As^{5+}$  inorgânico (Mabuchi *et al.*, 1979).

A contaminação dos ambientes por As ocorre em escala global e é relatada em vários países, como Argentina (Nicolli *et al.*, 2011), Chile (Díaz, *et al.*, 2011), Bangladesh (Khan *et al.*, 2010), Canadá (Dushenko *et al.*, 1995), Estados Unidos (Durant *et al.*, 2004), Espanha (Taggart, *et al.*, 2009), Alemanha (Mkandawire e Dudel, 2005) e Portugal (Marques *et al.*, 2009).

No Brasil áreas com elevadas concentrações de As tem sido observadas (Tab. 1) no Quadrilátero Ferrífero, MG, devido a oxidação natural da arsenopirita presente nas rochas auríferas sulfetadas (Borba *et al.*, 2003; Varejão *et al.*, 2011; Borba *et al.*, 2004 e Gonçalves *et al.*, 2007); no rio São Francisco, MG, devido ao uso de fertilizantes no seu entorno e liberação de resíduos domésticos e industriais sem tratamento (Rezende *et al.*, 2011); Lagoa dos Patos, RS, devido a presença de um Porto e de uma fábrica de fertilizantes próximo ao ambiente lagunar (Mirlean *et al.* 2003); Baía de Sepetiba, RJ, devido a descarga de resíduos proveniente de uma

usina metalúrgica (Magalhães *et al.*, 2001) e Santana, AP, devido a minérios de manganês (Mn) extraídos nos últimos 50 anos (Figueiredo *et al.*, 2007).

Tabela 1: Concentração de As em diferentes matrizes no Brasil.

Matriz	Intervalo	Unidade	Local	Referência
Sedimento	161-4709	mg/Kg	Quadrilátero Ferrífero	Borba <i>et al.</i> (2002)
Sedimento	$2,34 \times 10^{-2}$ - 0,3	mg/Kg	Quadrilátero Ferrífero	Varejão <i>et al.</i> (2010)
Sedimento	1,86-309	mg/Kg	Rio São Francisco	Rezende <i>et al.</i> (2011)
Sedimento	6-697	mg/Kg	Baía de Sepetiba	Magalhães <i>et al.</i> (2000)
MPS	21,7-51,5	mg/Kg	Lagoa dos Patos	Mirlean <i>et al.</i> (2003)
Água	$2 \times 10^{-3}$ - 3	mg/L	Quadrilátero Ferrífero	Borba <i>et al.</i> (2004)
Água	$< 5 \times 10^{-3}$ - 0,2	mg/L	Quadrilátero Ferrífero	Gonçalves <i>et al.</i> (2007)
Água	$5 \times 10^{-3}$ - 0,2	mg/L	Santana	Figueiredo <i>et al.</i> (2007)

A resolução nº 357 de 17 de março (Conama, 2005) estabelece limites máximos de As na água de acordo com sua utilização. Nos corpos d'água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo o limite máximo permissível de As é  $1,4 \times 10^{-4}$  mg.L<sup>-1</sup>; em águas destinadas ao consumo humano, irrigação de frutíferas e hortaliças, aquicultura, recreação com contato primário e a proteção de comunidades aquáticas o limite máximo é de 0,01 mg.L<sup>-1</sup> e, em águas onde ocorra lançamento de efluentes, o limite permitido é de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>.

A mobilidade do As no ambiente ocorre devido a uma combinação de processos naturais como emissões vulcânicas, atividades biológicas, oxidação da arsenopirita presente em rochas auríferas sulfetadas e dissolução de óxidos de ferro em ambientes reduzidos (Smedley e Kinniburgh 2005), bem como uma série de atividades antrópicas incluindo uso de inseticidas e herbicidas, resíduos de mineração e indústrias e conservantes de madeira (Azcue e Nriagu, 1994). O As é encontrado na maioria das rochas, com concentrações variando entre 0,5 e 2,5 mg/kg, embora em sedimentos argilosos a sua concentração possa alcançar 13 mg/kg. O seu elevado teor em solos superficiais e em sedimentos argilosos, comparado com suas rochas originárias, pode refletir fontes externas do elemento provenientes de erupções vulcânicas e contaminação (Adriano, 1986).

Macrófitas aquáticas têm demonstrado sua capacidade de capturar elementos tóxicos, atuando como barreiras biogeoquímicas no processo de remoção do As, que ocorre por meio da absorção ou adsorção do material particulado que adsorve

esse elemento, e posteriormente é capturado pelas raízes das macrófitas ou por meio da absorção direta de As pelas células radiculares. Segundo Rahman e Hasegawa (2011) são propostos três mecanismos para explicar a absorção de espécies de As por macrófitas aquáticas, que variam de acordo com a espécie química do metaloide - (a) absorção ativa por meio de transportadores de absorção de fosfato, (b) absorção passiva por meio de canais de aquagliceroporinas e (c) adsorção físico-química na superfície da raiz.

Devido à similaridade estrutural entre arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), o  $\text{AsO}_4^{3-}$  é absorvido por meio dos transportadores de captação do  $\text{PO}_4^{3-}$  (Zhao *et al.*, 2009). Porém, esta espécie de As também pode ser absorvida por meio de processos físico-químicos de adsorção em óxidos de ferro presentes na superfície radicular de *E. crassipes* (Robinson *et al.*, 2006). O arsenito e as espécies metiladas de As, ácido dimetilarsínico (DMAA) e ácido monometilarsônico (MMAA) são absorvidas pelas plantas pelo mecanismo passivo, por meio dos canais de aquagliceroporinas (Zhao *et al.*, 2009), que são canais de proteínas transmembrana que transportam água, glicerol e pequenos solutos por meio da membrana celular. Os diferentes mecanismos de absorção de As pelas plantas determinarão a natureza da interação entre o As e os elementos necessários a seu metabolismo.

Devido a isso macrófitas aquáticas podem ser utilizadas na descontaminação de ambientes poluídos por meio da remoção, imobilização ou tornando menos tóxicos os elementos traço que estejam presentes no ecossistema (Accioly e Siqueira, 2000). Vários estudos comprovam o potencial de macrófitas aquáticas como fitorremediadoras de ambientes contaminados com As, tais como *Oryza sativa* (Khan *et al.*, 2010), *Hydrilla verticillata* (Xue e Yan, 2011), *Brassica carinata* (Irtelli e Navari-Izzo, 2008), *Typha latifolia* (Dushenko *et al.*, 1995), *Rorippa nasturtium-aquaticum* (Robinson *et al.*, 2006) e *Spirodela polyrhiza* (Zhang *et al.*, 2011).

As macrófitas possuem algumas características que propiciam sua utilização como remediadoras, tais como rápido crescimento, elevada produção de biomassa, propagação fácil e rápida, ampla distribuição e um sistema radicular fasciculado, facilitando maior área de contato com o poluente (Guimarães, 2006). *Eichhornia crassipes*, conhecida popularmente como aguapé, apresenta estas características, sendo relatada como hiperacumuladora de As (Snyder, 2006).

Esta espécie, nativa da Bacia Amazônica, é flutuante livre e devido a isso possui uma mobilidade que promove maior contato com o poluente. Além disso, sua reprodução é predominantemente vegetativa, o que facilita sua dispersão. Diversos estudos reportam que *E. crassipes* é eficiente na remoção de diferentes elementos traço, como Cromo (Cr) (Paiva *et al.*, 2009), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) (Soltan e Rashed, 2003), Cádmio (Cd) (Toppi *et al.*, 2007), Mercúrio (Hg) (Mendes *et al.*, 2009) e As (Alvarado *et al.*, 2008). Porém, são necessárias mais informações sobre a influência de diferentes concentrações e tempos de exposição a As na capacidade de absorção e tolerância dessa espécie e qual a relação entre esses fatores e a absorção dos nutrientes, especialmente fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), essenciais para o crescimento vegetal.

Desta forma, neste trabalho foram realizados dois experimentos conduzidos separadamente e cada um correspondeu a um capítulo. No primeiro capítulo intitulado “Bioacumulação e Alterações Ecofisiológicas em *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms submetida a estresse por Arsênio”, analisou-se o acúmulo e a tolerância de *Eichhornia crassipes* quando submetida a concentrações e tempos de exposição crescentes de  $\text{AsO}_4^{3-}$ . O segundo capítulo intitulado “Efeitos do Arsênio na absorção de nitrato e fosfato por *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms” analisou a influência do As na absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  por meio das suas determinações na solução nutritiva onde as macrófitas foram acondicionadas.

Assim, o objetivo geral desse estudo foi avaliar a capacidade de acúmulo e tolerância de *Eichhornia crassipes* submetida a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$  por meio das suas respostas ecofisiológicas, bem como avaliar a influência do As na absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  pela espécie em questão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A.M.A., SIQUEIRA, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V.; V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. v. 1. p. 299-352, 2000.

ADRIANO, D.C. Trace elements in the terrestrial environment. Springer Verlag, New York, USA, 1986.

ALVARADO, S., LUE-MERU, M.P., GUEDEZ, M., NELSON, G., ALVARO, A., JESES, A.C., GYULA, Z. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). Bioresource Technology 99, 8436–8440, 2008.

AZCUE, J.M., NRIAGU, J.O. Journal of Geochemical Exploration 52, 81, 1994.

BORBA, R.P., FIGUEIREDO, B.R., CAVALCANTI, J. A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). REM: R. Esc. Minas, Ouro Preto, 57(1): 45-51, jan. mar, 2004.

BORBA, R.P., FIGUEIREDO, B.R., MATSCHULLAT, J. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. Environmental Geology 44:39–52, 2003.

CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Publicada no DOU nº 53, de 18 de março de 2005, Seção 1, páginas 58-63.

CSUROS, M., CSUROS, C. Environmental sampling and analysis for metals. Lewis Publishers, USA, 372 p, 2000.

DÍAZ, O., TAPIA, Y., PASTENE, R., MONTES, S., NÚÑEZ, N., VÉLEZ, D., MONTORO, R. Total and Bioavailable Arsenic Concentration in Arid Soils and its

Uptake by Native Plants from the Pre-Andean Zones in Chile. *Bull Environ Contam Toxicol*, 86:666–669, 2011.

DURANT, J.L., IVUSHKINA, T., MACLAUGHLIN K., LUKACS H., GAWEL, J., SENN D., HEMOND, H.F. Elevated levels of arsenic in the sediments of an urban pond sources, distribution and water quality impacts. *Water Research* 38, 2989–3000, 2004.

DUSHENKO, W.T., BRIGHT, D.A., REIMER, K.J. Arsenic bioaccumulation and toxicity in aquatic macrophytes exposed to gold-mine effluent: relationships with environmental partitioning, metal uptake and nutrients. *Aquatic Botany* 50, 141-158, 1995.

FIGUEIREDO, B.R., BORBA, R.P., ANGÉLICA, R.S. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ Geochem Health*, 29:109–118, 2007.

GONÇALVES, J.A.C., LENA, J.C., PAIVA, J.F., NALINI, H.A.J., PEREIRA, J.C. Arsenic in the groundwater of Ouro Preto (Brazil): its temporal behavior as influenced by the hydric regime and hydrogeology. *Environ Geol*, 53:785–793, 2007.

GUIMARÃES, F.P. Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa. Dissertação de mestrado. Voçosa, UFV. 87 p, 2006.

HAO, X.Z., ZHOU, D.M., SI, Y.B. Revegetation of copper mine tailings with ryegrass and willow, *Pedosphere* 14, 283–288, 2004.

IRTELLI, B., NAVARI-IZZO, F. Uptake kinetics of different arsenic species by *Brassica carinata*. *Plant Soil*, 303:105–113, 2008.

JAIN, C.K., ALI, I. Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research* 34:4304-4312, 2000.

KHAN, M.A., STROUD, J.L., ZHU, Y.G., McGRATH, S.P., ZHAO, F.J. Arsenic bioavailability to rice is elevated in Bangladeshi paddy soils. *Environmental Science e Technology*. Vol. 44, 8515 - 8521, 2010.

MABUCHI, K., LILIENFELD, A.M., SNELL, L.M. Lung-cancer among pesticide workers exposed to inorganic arsenicals. *Arch Environ Health* 34:312–320, 1979.

MAGALHÃES, V.F., CARVALHO, C.E.V., PFEIFFER W.C. Arsenic Contamination and Dispersion in the Engenho Inlet, Sepetiba Bay, SE, Brazil. *Water, Air, and Soil Pollution* 129: 83–90, 2001.

MARQUES, A.P.G.C., MOREIRA, H.A. RANGEL, O.S.S., CASTRO, P.M.L. Arsenic, lead and nickel accumulation in *Rubus ulmifolius* growing in contaminated soil in Portugal. *Journal of Hazardous Materials* 165, 174–179, 2009.

MATHEWS, S., MA, L.Q., RATHINASABAPATHI, B., NATARAJAN, S., SAHA, U.K. Arsenic transformation in the growth media and biomass of hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresource Technology* 10, 8024–8030, 2010.

MENDES, P.L.A., MEYER, S.T., NORONHA, I.A.S., GOMES, S.M.A., SANTOS, M.H. *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente*, Curitiba, v. 19, p. 29-38, jan./dez, 2009.

MIRLEAN, N., ANDRUS, V.E., BAISCH, P., GRIEP, G., CASARTELLI, M.R. Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 46, 1480–1484, 2003.

MKANDAWIRE, M., DUDEL, E.G. Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Science of the Total Environment* 336, 81– 89, 2005.

MUKHERJEE A., BHATTACHARYA, P., SAVAGE, K., FOSTER, A., BUNSCHUH, J. Distribution of geogenic arsenic in hydrologic systems: Controls and challenges. *Journal of Contaminant Hydrology*, 99:1-7, 2008.

NICOLLI, H.B., GARCÍA, J.W., FALCÓN, C.M., SMEDLEY, P.L. Mobilization of arsenic and other trace elements of health concern in groundwater from the SaltRiver Basin, Tucuma Province, Argentina. *Environ Geochem Health*, 34:251–262, 2011.

PAIVA L.B., OLIVEIRA, J.G., AZEVEDO, R.A., RIBEIRO, D.R., SILVA, M.G., VITÓRIA, A.P. Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$ . *Environmental and Experimental Botany* 65, p. 403–409, 2009.

RAHMAN, M.A., HASEGAWA, H. Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophytes. *Chemosphere* 83, 633–646, 2011.

REZENDE, P.S., MOURA, P.A.S., DURÃO, W.A.J., NASCENTES, C.C., WINDMÖLLER, C.C., COSTA, L.M. Arsenic and Mercury Mobility in Brazilian Sediments from the São Francisco River Basin. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 22, No. 5, 910-918, 2011.

ROBINSON, B., KIM, N., MARCHETTI, M., MONI, C., SCHROETER, L., DIJSSEL, C., MILNE, G., CLOTHIER, B. Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in The Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Environmental and Experimental Botany* 58, 206–215, 2006.

SMEDLEY, P.L., KINNIBURGH, D.G. Sources and behavior of arsenic in natural water, Chapter 1 in United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water, 2005.

SMITH. E., NAIDU, R., ALSTON, A.M. Chemistry of arsenic in soils: II. Effect of phosphorus, sodium and calcium on arsenic sorption. *Journal of Environmental Quality*, 31: 557–563, 2002.

SNYDER, K.V.W. Removal of arsenic from drinking water by water Hyacinths (*Eichhornia crassipes*). S. J. W. P., v. 1, p. 41-58, 2006.

SOLTAN, M.E., RASHED, M.N. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. Advances in Environmental Research 7, 321–334, 2003.

TAGGART, M.A., MATEO, R., CHARNOCK, J.M., BAHRAMI, F., GREEN, A.J., MEHARG, A.A. Arsenic rich iron plaque on macrophyte roots – an ecotoxicological risk? Environmental Pollution 157 (2009) 946–954, 2009.

TOPPI, L.S., VURRO, E., ROSSI, L., MARABOTINNI, R., MUSETTI, R., CARERI, M., MAFFINI, M., MUCCHINO, C., CORRADINI, C., BADIANI, M. Different compensatory mechanisms in two metal-accumulating aquatic macrophytes exposed to acute cadmium stress in outdoor artificial lakes. Chemosphere 68, 769–780, 2007.

USEPA. National Primary Drinking Water Regulations; Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Proposed Rule. Federal Register, Vol. 65, N° 121, June 22, 2000; p.38888-38983, 2000.

VAREJÃO, E.V.V., BELLATO, C.R., FONTES, M.P.F., MELLO, J.W.V. Arsenic and trace metals in river water and sediments from the southeast portion of the Iron Quadrangle, Brazil. Environ Monit Assess, 172:631–642, 2011.

XUE, P.Y., YAN, C.Z. Arsenic accumulation and translocation in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. Chemosphere 85, 1176–1181, 2011.

ZHANG, X., HU, Y., LIU, Y., CHEN, B. Arsenic uptake, accumulation and phytofiltration by duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.). Journal of Environmental Sciences, 23(4) 601–606, 2011.

ZHAO, F.J., MA, J.F., MAHARG, A.A., MCGRATH, S.P. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* 181, 777–794, 2009.

## CAPÍTULO 1

### **Bioacumulação e Alterações Ecofisiológicas em *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms submetida a estresse por Arsênio**

#### **Resumo**

Arsênio (As) é um contaminante crítico para o ambiente, sendo liberado para natureza por meio de processos geoquímicos e ações antrópicas. Nesse trabalho a eficiência da acumulação de As pela macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (aguapé) foi analisada, bem como suas respostas ecofisiológicas. Exemplares de *E. crassipes* foram expostos as concentrações 0,0; 0,2; 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup> de arsenato (AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), por 0, 48 e 96h, em um sistema hidropônico. O acúmulo do As nas plantas foi diretamente proporcional ao incremento desse metaloide na solução nutritiva. Análise da absorção de As indicou que a maior parte do metaloide acumulou-se nas raízes, apesar de ter sido observada translocação para as folhas em todos os tratamentos a partir de 48h. A bioacumulação do As foi maior nos indivíduos submetidos ao tratamento de 0,2 mg.L<sup>-1</sup>. Efeitos deletérios nas trocas gasosas (taxa fotossintética líquida, condutância estomática, transpiração e concentração de CO<sub>2</sub>) e fluorescência da clorofila *a* (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> e F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>) acompanharam a concentração do metaloide nas plantas para os indivíduos expostos aos tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup>, a partir de 48h. Foi observada diminuição na taxa fotossintética líquida, sendo relacionada à diminuição na condutância estomática e transpiração, e redução nas razões F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> e F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>. Os resultados indicam que a razão F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> foi mais eficiente para indicar estresse a As pela macrófita. Alterações no teor dos pigmentos fotossintetizantes foram observados nas clorofilas *a* e *b* nos indivíduos expostos aos tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup> a partir de 48h. Observou-se que as plantas submetidas ao tratamento de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> não mostraram comprometimento de suas funções fisiológicas sugerindo que, sob as condições experimentais desse estudo, *E. crassipes* foi mais eficiente em remover As do meio quando presente em baixas concentrações.

Palavras-chave: *Eichhornia crassipes*, parâmetros ecofisiológicos, bioacumulação.

## Abstract

Arsenic (As) is a critical pollutant to the environment, being released to nature through geochemical processes and anthropogenic. In this study the efficiency of accumulation by the aquatic macrophytes *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) was analyzed, and their ecophysiological responses. Specimens of *E. crassipes* were exposed to concentrations 0,0; 0,2; 2,0 and 20 mg L<sup>-1</sup> arsenate (AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), for 0, 48 and 96h, in a hydroponic system. The accumulation of As by plants was directly proportional to the increase of this metalloid in nutrient solution. Analysis of As uptake indicated that most of the metalloid is accumulated in roots, although translocation for leaves has been observed all treatments of 0,2; 2,0 and 20 mg.L<sup>-1</sup> from 48h. Bioaccumulation As was higher in individuals treated with 0,2 mg.L<sup>-1</sup>. Deleterious effects on gas exchange (carbon assimilation, stomatal conductance, transpiration and internal carbon) and chlorophyll a fluorescence ( $F_v/F_m$  e  $F_v/F_0$ ) accompanied the metalloid concentration in plants for the individuals exposed to treatment 2,0 and 20 mg.L<sup>-1</sup> from 48h. It was observed to decrease in carbon assimilation, being related to the decrease in stomatal conductance and transpiration, and reduction in  $F_v/F_m$  and  $F_v/F_0$  ratio. This result indicated that the  $F_v/F_0$  ratio was more effective than the  $F_v/F_m$  ratio in monitoring stress of As. Changes in the photosynthetic pigments contents were observed at the chlorophyll *a* and *b*, in individuals exposed to treatments 2,0 and 20 mg.L<sup>-1</sup> from 48h. It was observed plants under treatment of 0,2 mg.L<sup>-1</sup> showed no impairment of their physiological functions indicating that, under the experimental conditions of this study, *E. crassipes* is more efficient to remove As in low concentrations.

Keywords: *Eichhornia crassipes*, ecophysiological parameters, bioaccumulation.

## 1.1 Introdução

O As é um elemento ubíquo encontrado na atmosfera, solos, rochas, águas naturais e organismos, sendo um dos contaminantes mais tóxicos a saúde humana (Smedley e Kinniburgh, 2005). As ocorre em vários estados de oxidação, mas em águas naturais ele está presente, em geral, na forma inorgânica como arsenito ( $\text{AsO}_2^{1-}$ ) e arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) sendo o  $\text{As}^{3+}$  a forma predominante em ambientes anaeróbicos e  $\text{As}^{5+}$  predominante em ambientes aeróbicos (Gonçalves *et al.*, 2007). Exposição prolongada a compostos inorgânicos desse metaloide pode levar a enfermidades tais como distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, conjuntivite e câncer de pele (Barra *et al.*, 2000). Formas orgânicas de As podem ser produzidas pela atividade biológica, principalmente em águas de superfície, mas raramente são importantes quantitativamente (Smedley e Kinniburgh, 2005).

Problemas ambientais relacionados ao As são resultado da sua mobilização em condições naturais, mas ações antrópicas têm causado um incremento da concentração desse elemento no meio (Smedley e Kinniburgh, 2005). Os corpos d'água são os principais alvos de escoamento dos contaminantes, pois eles são os receptores finais de resíduos pluviais, residenciais e comerciais (Dhote e Dixit, 2009). A contaminação por As é um dos maiores problemas do mundo moderno, visto que este não é degradado por processos naturais, sendo necessária sua remoção do ambiente (Lasat, 2002).

Em locais com ocorrência natural de As sua concentração em plantas raramente excede  $1\text{mg.Kg}^{-1}$  (Adriano, 2001), sendo relatado que concentrações muito baixas podem ser benéficas para o crescimento vegetal (Gulz *et al.*, 2005). Porém, concentrações elevadas de As podem desencadear uma sequência de reações que conduzem à inibição do crescimento, disfunção dos sistemas fotossintético e respiratório, diminuição nos teores de pigmentos e alteração no balanço de nutrientes (Reis, 2011; Garg e Singla, 2011).

Algumas espécies de plantas, conhecidas como hiperacumuladoras, têm a capacidade de acumular elementos não essenciais em seu organismo, não apresentando danos aparentes (Paiva *et al.*, 2009), como as espécies *Eichhornia crassipes*, *Salvinia herzogii* e *Pistia stratiotes* (Souza *et al.*, 2009a). As plantas hiperacumuladoras conseguem acumular mais de  $1000\text{mg.kg}^{-1}$  de Ni, Pb, Cu e As,

100 mg.kg<sup>-1</sup> de Cd e 10.000 mg.kg<sup>-1</sup> de Zn e Mn na matéria seca (Marques *et al.*, 2009). Estudos realizados com *Eichhornia crassipes* submetida a elementos tóxicos relataram diminuição no teor de clorofilas *a* e *b* e carotenoides, diminuição da taxa fotossintética e alteração nos parâmetros fotoquímicos (Reis, 2011; Paiva *et al.*, 2009).

As macrófitas aquáticas, ao absorverem As, utilizam diferentes estratégias para tolerar a ação tóxica desse contaminante, seja por meio da sua compartimentalização em vacúolos a nível celular (Vögeli-Lange e Wagner, 1990), produção de fitoquelatinas (Rüegsegger e Brunold, 1992), ligação dos metais às paredes celulares (Krämer *et al.*, 2000) e biotransformação para formas menos tóxicas (Zhang *et al.*, 2011a). Além disso, em condições de estresse as macrófitas podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) (Stoeva e Bineva, 2003). É bem reportado que a geração de EROs ocorre por meio da conversão de As<sup>5+</sup> a As<sup>3+</sup> no meio intracelular (Mascher *et al.*, 2002). A fim de minimizar os efeitos prejudiciais das EROs as macrófitas produzem várias enzimas e compostos que funcionam como antioxidantes (Fornazier *et al.*, 2002), tais como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), ácido ascórbico, glutatona e carotenoides (Scandalios, 1993).

A fitotoxicidade a As depende de vários fatores, como sua concentração no meio, forma química, via de absorção e biodisponibilidade (Martínez-Sánchez *et al.*, 2011). O As é absorvido pelas macrófitas principalmente na forma de As<sup>3+</sup> e As<sup>5+</sup> (Gunes *et al.*, 2008). A principal ação tóxica do As<sup>3+</sup> está relacionada à reação com compostos sulfidrílicos de enzimas e proteínas (Zhang *et al.*, 2011a) e a do As<sup>5+</sup> por competir com o fosfato em processos celulares (Mishra e Dubey, 2007). Porém, o principal mecanismo responsável pelo dano celular causado por esses íons é o estresse oxidativo devido às reações de oxidação e redução que ocorrem a nível celular (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002).

A realização de experimentos com cultura hidropônica tem sido sugerida para averiguar a absorção e tolerância das plantas a elementos tóxicos, bem como sua eficiência na utilização de nutrientes (Giri e Patel, 2012). Apesar de muitos estudos com hidroponia serem realizados a fim de entender melhor a interação entre os organismos e os contaminantes, são escassos trabalhos em que as concentrações de elementos tóxicos utilizadas reflitam os diferentes graus de contaminação que

podem ser encontradas no ambiente. Por isso, no presente estudo buscou-se simular a fitotoxicidade a As abrangendo as diferentes condições de estresse que podem ser encontradas no meio, sendo adicionado na solução experimental concentrações de As que se assemelham aos teores permissíveis pela legislação, as encontradas no ambiente quando a fonte de As é natural e quando a fonte é oriunda de atividades antrópicas.

## **1.2 Objetivo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de absorção e tolerância de *Eichhornia crassipes* a concentrações crescentes de As em diferentes tempos de exposição, usando como parâmetro as respostas ecofisiológicas (trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e teor dos pigmentos fotossintetizantes) e os fatores de bioacumulação e translocação.

## **1.3 Hipótese**

Visto que esta espécie é relatada como hiperacumuladora, espera-se que *E. crassipes* utilize seus mecanismos fisiológicos para manter suas funções metabólicas semelhantes a do tratamento controle, mesmo quando submetida a diferentes concentrações de As.

## **1.4 Material e Métodos**

### **1.4.1 Material vegetal e tratamentos**

Exemplares de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms foram coletados na Lagoa do Campelo (fig. 1.1A), localizada a 21°39'01"S e 41°11'W, entre os municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco de Itabapoana, RJ. Os indivíduos que aparentavam ser jovens e saudáveis e com ausência de estolões foram selecionados. Após a coleta, as plantas foram acondicionadas em recipientes plásticos (fig. 1.1B) e levadas para o Laboratório de Ciências Ambientais (Centro de Biociências e Biotecnologia – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro). No laboratório as plantas foram lavadas com água corrente para retirada da

epifauna e do material adsorvido e pesadas (fig. 1.1C e D). O tamanho da raiz foi padronizado em 10 cm.

Em casa de vegetação as plantas foram acondicionadas em recipientes com 8L de solução nutritiva (Fig. 1.2) contendo micronutrientes segundo Hoagland e Arnon (1950) ( $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e macronutrientes segundo Smart e Barko (1985) ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Além de uma solução de Ferro + EDTA preparada com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). Anterior à adição do metaloide na solução nutritiva, as macrófitas aclimataram durante cinco dias e a solução foi renovada no mesmo dia da adição do As. O As foi adicionado na forma de arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) diluído em meio ácido (ácido clorídrico,  $\text{HCl}$  – 0,5M) a partir da solução padrão Tritisol, Merck. Quatro tratamentos, incluindo o controle, foram utilizados sempre em triplicata e em três tempos de exposição, totalizando 36 indivíduos no experimento. As concentrações utilizadas foram 0,2; 2,0 e 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  e os tempos de retirada das amostras vegetais e da solução nutritiva foram de 0, 48 e 96 horas após adição do metaloide. Foram retiradas doze amostras do material vegetal (raiz e folhas) e vinte e quatro amostras da solução nutritiva (duplicata) por tempo, para determinação de As (item 1.4.4).

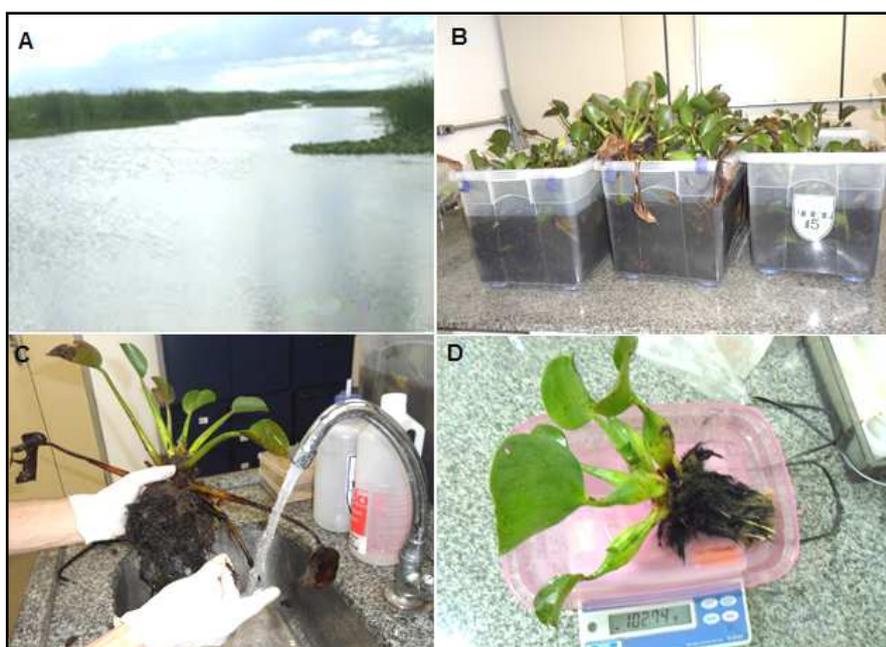


Figura 1.1: Lagoa do Campelo (A); *Eichhornia crassipes* acondicionada em recipientes plásticos (B); Triagem (C); Pesagem (D).



Figura 1.2: Experimento realizado em casa de vegetação com *Eichhornia crassipes*.

#### 1.4.2 Sintomatologia visual das plantas

O registro fotográfico da sintomatologia das plantas foi realizado utilizando-se uma câmera digital (Samsung ST64), nos tempos de 0, 48 e 96 horas de exposição e nos tratamentos controle, 0,2; 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup> de AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

#### 1.4.3 Monitoramento da solução nutritiva

Os parâmetros pH, condutividade elétrica e O<sub>2</sub> dissolvido foram monitorados na solução nutritiva durante todo o experimento, entre 8h00 e 12h00, em dias alternados, utilizando-se três potenciômetros da marca WTW: pH 3110, condutividade 3110 e O<sub>2</sub> dissolvido 3110.

#### 1.4.4 Determinação do As

Para a determinação do As no tecido vegetal, as plantas foram separadas em raiz e parte aérea (folhas) e posteriormente armazenadas em estufa a 60°C durante 1 semana. Após secagem do material, este foi macerado com a utilização do gral, pistilo e nitrogênio líquido até a obtenção do material em pó. No passo seguinte uma massa de 0,2g de amostras de folha e raiz foram pesadas em duplicata e colocadas em recipientes fechados de teflon para digestão ácida. O meio reacional consistiu

de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e uma mistura de 1:1 de ácido sulfúrico e ácido nítrico ( $H_2SO_4:HNO_3$ ). O procedimento de digestão foi realizado sob pressão em micro-ondas modelo Mars Xpress (CEM).

Um volume fixo de 20 mL da solução nutritiva foi coletado em duplicada e armazenado em tubo de ensaio com dedo frio para determinação do As. As amostras foram acidificadas com 6 mL de HCl – 37% e aquecidas em bloco digestor por 3 horas, a temperatura de 80°C.

Após a digestão, as amostras do material vegetal e da solução nutritiva foram filtradas em provetas utilizando-se papéis de filtro quantitativo (Framex). A determinação do As foi realizada por meio de Espectrofotometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES), utilizando-se o equipamento Varian Liberty Series II. O limite de detecção para As foi de 0,05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### **1.4.5 Determinação do fator de bioacumulação (FBA) e do fator de translocação (FT)**

O fator de bioacumulação (FBA) foi calculado pela equação (Zayed *et al.*, 1998a):  $FBA = C_{PL}/C_{SOLUÇÃO}$ , em que,  $C_{PL}$  = concentração de As na planta em  $\text{mg.kg}^{-1}$  de MS;  $C_{SOLUÇÃO}$  = concentração de As na solução, em  $\text{mg.L}^{-1}$ .

O fator de translocação (FT) foi calculado pela seguinte equação (Zayed *et al.*, 1998b):  $FT = C_{PA}/C_R$ , em que,  $C_{PA}$  = concentração de As na parte aérea, em  $\text{mg.kg}^{-1}$  de MS;  $C_R$  = concentração de As na raiz, em  $\text{mg.Kg}^{-1}$  de MS.

#### **1.4.6 Medidas de trocas gasosas**

As características medidas foram taxa fotossintética líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração de  $CO_2$  subestomática ( $C_i$ ) e transpiração ( $E$ ). Esses parâmetros foram medidos nos tempos de 0, 48 e 96 horas, entre 8h00 e 11h00. Em cada planta foram medidas duas folhas, sempre saudáveis e intactas. A medição foi realizada com um analisador de gás no infravermelho (IRGA), marca PP Systems, UK, modelo CIRAS 2 e a intensidade luminosa utilizada foi de 2000  $\mu\text{mol}$  de fótons.  $\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

#### 1.4.7 Medidas de fluorescência da clorofila *a*

As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram realizados entre 12h00 e 13h00 utilizando-se um fluorímetro modulado portátil, modelo FMS2 (Hansatech, UK). Essa medida foi feita nas mesmas folhas utilizadas para as medidas de trocas gasosas. O protocolo adotado foi adaptado de Genty e colaboradores (1989) e Van Kooten e Snel (1990). As folhas foram mantidas no escuro durante 30 minutos com o auxílio de uma pinça e, em seguida, expostas a uma luz de medição (aproximadamente  $6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a 660 nm), seguida pela exposição à luz branca actínica de alta intensidade ( $10.000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), aplicada por 0,8 s.

Os seguintes parâmetros da emissão de fluorescência foram registrados e analisados: fluorescência mínima ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), fluorescência variável ( $F_v$ ) e coeficientes de extinção: qP (quenching fotoquímico) e qN (quenching não fotoquímico). As variáveis rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) e taxa variável de rendimento ( $F_v/F_0$ ) foram calculadas de acordo com Van Kooten e Snel (1990)

#### 1.4.8 Pigmentos fotossintéticos

Vinte e quatro discos foliares (duplicata) foram retirados nos tempos de 0, 48 e 96 horas para quantificar as clorofilas *a* e *b* e carotenoides, utilizando as folhas em que foram medidas as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a*. Os discos foram cortados e colocados em tubos de plástico com tampa contendo 5 mL do reagente dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente orgânico e armazenados no escuro. A leitura das amostras foi realizada após cinco dias, em espectrofotômetro (UV-160<sup>a</sup>; UV - Visible Recording Spectrophotometer - Shimadzu) nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm. Os cálculos para a determinação das concentrações dos pigmentos foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Wellburn (1994). O teor de clorofila total (*a* + *b*) e a razão clorofila *a* + clorofila *b*/ carotenoides foram calculados. Todo o procedimento de laboratório realizou-se em ambiente com baixa luminosidade para evitar possível degradação dos pigmentos. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol cm}^{-2}$ .

### 1.4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio da análise de variância two-way (ANOVA) utilizando o programa STATISTICA e as médias foram comparadas usando teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 1.5 Resultados

### 1.5.1 Aspectos visuais

Os aspectos visuais observados em indivíduos de *E. crassipes* submetidos a diferentes concentrações e tempos de exposição a  $\text{AsO}_4^{3-}$  são mostrados na fig. 1.4. Plantas expostas aos tratamentos controle (Fig. 1.3A, E e I) e  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  (Fig. 1.3B, F e J) não mostraram sintomas visuais de toxicidade ao longo do experimento. Os indivíduos submetidos aos tratamentos de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  (Fig. 1.3C, G e K) e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  (Fig. 1.3D, H e L) mostraram sinais de toxicidade em 48 horas de exposição e, em 96 horas, entraram em senescência.

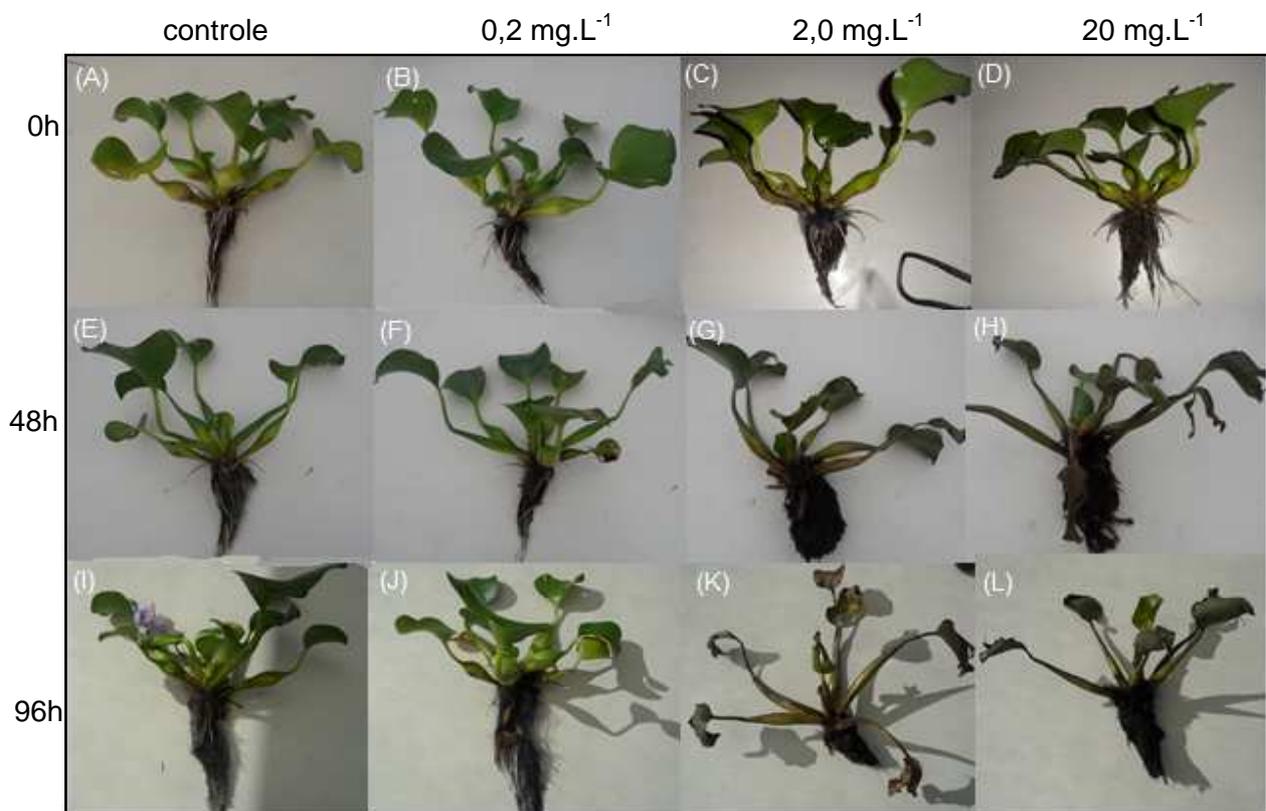


Figura 1.3: Aspectos visuais de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$ .

### 1.5.2 Quantificação de As

A concentração de As na raiz e folha dos indivíduos de *E. crassipes* é mostrada na figura 1.4. Observou-se incremento nos teores de As nas folhas à medida que aumentava o tempo de exposição e a concentração do metaloide na solução, acumulando até 1842 mg.kg<sup>-1</sup> na presença de 20 mg.L<sup>-1</sup> de As, por 96 horas (Fig. 1.4A). Por outro lado, na raiz esse padrão de absorção ocorreu somente para a concentração de 20 mg.L<sup>-1</sup>, sendo encontrado nesse tratamento, e em 96 horas de exposição, o maior teor de As (2915 mg.Kg<sup>-1</sup>) do experimento. (Fig. 1.4B). Nos tratamentos de 0,2 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> a concentração do As na raiz foi maior em 48 horas de exposição ao metaloide, diminuindo em 96 horas. Verificou-se ainda, no tempo de 96 horas, que o teor de As foi maior nas folhas em relação às raízes no tratamento de 2,0 mg.L<sup>-1</sup>.

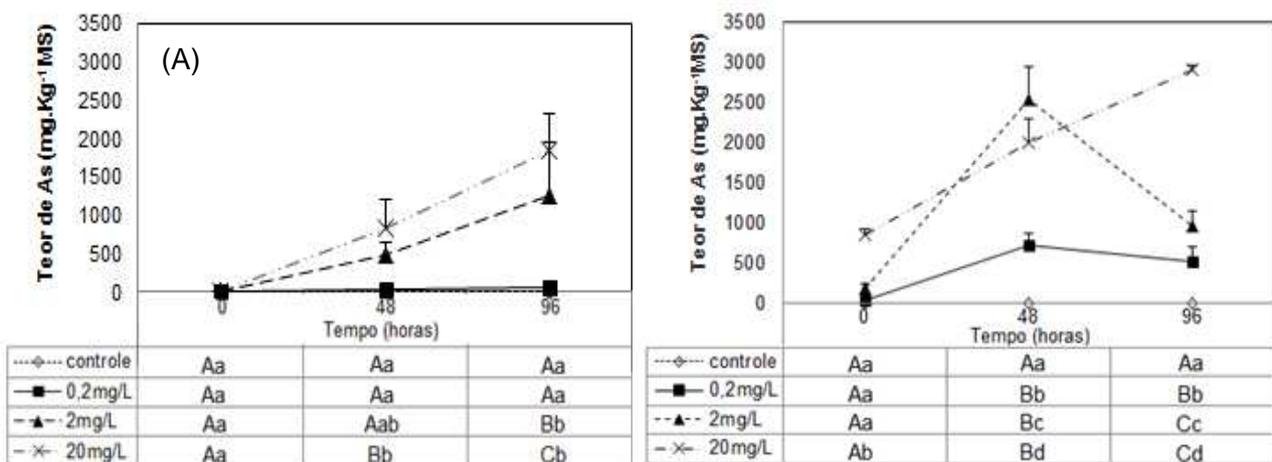


Figura 1.4: Média do teor de As em folhas (A) e raízes (B) de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $AsO_4^{3-}$ . Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição. As barras representam desvio padrão da média.

A redução nos teores de As nas raízes e o aumento deste nas folhas sugere que à medida que se aumentava a concentração do metaloide na solução nutritiva, há maior absorção desse elemento por *E. crassipes*, o que pode estar associado a maior translocação para a parte aérea. Nesse experimento, esse fato foi mais evidente no tratamento de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de As, com o aumento do fator de translocação em 96 horas (1,44) (Fig. 1.5)

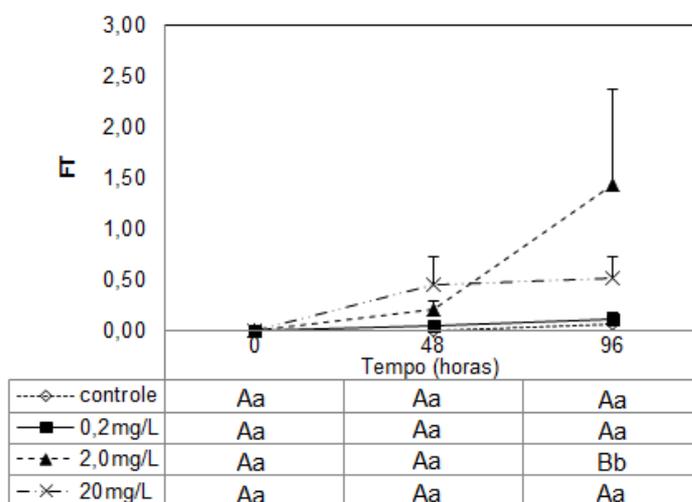


Figura 1.5: Média do Fator de translocação (FT) de As em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição. As barras representam o desvio padrão da média.

O teor de As na solução nutritiva foi expresso por meio do fator de bioacumulação (FBA), que é um índice que demonstra a relação entre o teor de As na planta e na água (Fig. 1.6). Observou-se que a planta foi mais eficiente em remover As da solução nutritiva na menor concentração utilizada ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sendo seu  $\text{FBA} = 7825$  em 96 horas de experimento. Observou-se redução desse fator à medida que aumentou a concentração desse elemento em solução, sendo o  $\text{FBA} = 305$  nas plantas expostas ao tratamento de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  por 96 horas. Embora tenha ocorrido diminuição na remoção do As em concentrações mais elevadas ( $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ) verifica-se que mesmo nesses tratamentos as plantas foram capazes de absorver As da solução, acumulando grandes quantidades desse elemento em seu tecido vegetal.

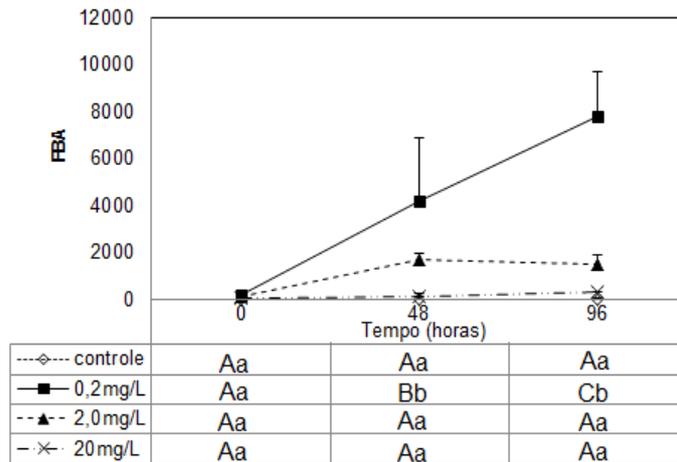


Figura 1.6: Média do Fator de bioacumulação (FBA) em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição. As barras representam o desvio padrão da média.

### 1.5.3. Trocas gasosas

As respostas da taxa fotossintética líquida ( $A$ ), concentração subestomática de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração ( $E$ ) em plantas de *E. crassipes* submetidas a  $\text{AsO}_4^{3-}$  são mostrados na figura 1.7.

Em geral, à medida que se aumentou a concentração e o tempo de exposição das plantas ao metaloide a  $A$  diminuiu, sendo que, no tempo de 48 horas já foi observada a redução máxima desse parâmetro nos indivíduos expostos aos tratamentos de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $1,6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $2,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) (Fig. 1.7A). No tratamento de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  houve redução da  $A$  nas plantas somente quando expostas por 96 horas ao As ( $22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e, os indivíduos isentos de contaminação mantiveram a  $A$  elevada ao longo do experimento, apresentando valores entre 35 e  $39 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Em relação ao  $C_i$  o padrão inverso foi observado, sendo os menores valores encontrados nas plantas controle e expostas a  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de As (Fig. 1.7B). O  $C_i$  nos indivíduos controle variaram entre 268 e  $270 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ , enquanto no tratamento de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  os valores variaram entre 267 e  $289 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ . As plantas submetidas aos tratamentos de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  por 48 horas e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  por 96 horas apresentaram os maiores valores de  $C_i$  do experimento sendo de, respectivamente, 360 e  $350 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ .

Nas plantas controle observou-se um aumento na  $g_s$  no decorrer do experimento, enquanto que nos demais tratamentos houve a redução da  $g_s$  com o aumento do tempo de exposição das plantas ao metaloide (Fig. 1.7C). O valor mais elevado da  $g_s$  foi observado nas plantas controle, no tempo de 96 horas ( $2102 \text{ mol.m}^{-2}\text{s}^{-2}$ ) e o menor valor da  $g_s$  foi observado em plantas submetidas a  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{AsO}_4^{3-}$  por 96 horas ( $170 \text{ mol.m}^{-2}\text{s}^{-2}$ ). A variação na  $E$  das plantas nos diferentes tempos de exposição e concentrações de As ocorreu no mesmo padrão da variação da  $g_s$  (Fig. 1.7D), sendo maior e menor valores encontrados em 96 horas de experimento sendo de, respectivamente,  $12,29 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  no tratamento controle e  $2,7 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  no tratamento de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ .

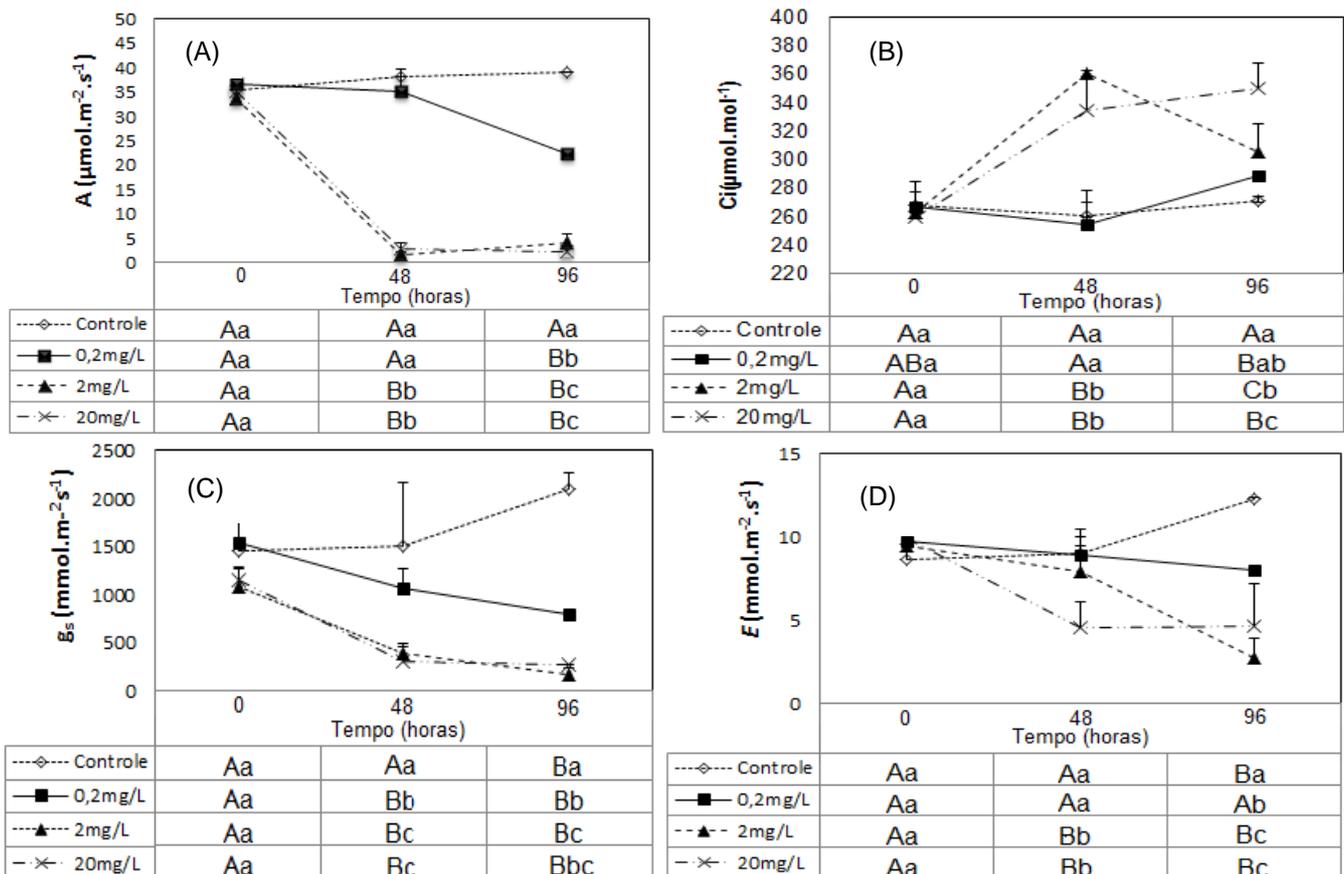


Figura 1.7: Média dos valores de taxa fotossintética líquida (A), concentração subestomática de  $\text{CO}_2$  (B), condutância estomática (C) e transpiração (D) em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição. As barras representam o desvio padrão da média.

#### 1.5.4. Parâmetros da Fluorescência da Clorofila a e Pigmentos

##### Fotossintéticos

Os valores referentes ao rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ), taxa variável de rendimento ( $F_v/F_0$ ), quenching fotoquímico (qP) e quenching não fotoquímico (qNP) obtidos ao longo do experimento nos diferentes tratamentos de  $AsO_4^{3-}$  são mostrados na tabela 1.1.

Os parâmetros  $F_v/F_m$ ,  $F_v/F_0$  e qP tiveram o mesmo padrão de variação, sendo observada a redução significativa em seus valores a partir de 48 horas para as plantas expostas aos tratamentos de 2,0 e 20  $mg.L^{-1}$ . Para razão  $F_v/F_m$  os menores valores foram encontrados após 96 horas da adição do metaloide em plantas submetidas aos tratamentos de 2,0  $mg.L^{-1}$  (0,5) e 20 $mg.L^{-1}$  (0,34). Na razão  $F_v/F_0$  os menores valores foram observados nas plantas expostas aos tratamentos de 2,0  $mg.L^{-1}$  (0,99) e 20  $mg.L^{-1}$  (0,51) no tempo de 96 horas. A redução máxima da razão  $F_v/F_0$  foi de 91% em relação aos indivíduos controle, enquanto a redução máxima de  $F_v/F_m$  foi de 61%. Os menores valores do qP foram observados para os indivíduos expostos aos tratamentos de 2,0  $mg.L^{-1}$  (0,76) e 20  $mg.L^{-1}$  (0,86) em 96 horas de experimento.

Em relação ao qNP observou-se aumento significativo nos seus valores no tempo de 48 horas, para os indivíduos expostos aos tratamentos de 2,0 e 20  $mg.L^{-1}$  de As, com posterior redução para os indivíduos expostos a esses mesmos tratamentos, mas no tempo de 96 horas. O maior valor de qNP foi encontrado em plantas expostas ao tratamento de 20  $mg.L^{-1}$  por 48 horas (0,29) e o menor valor foi nos indivíduos submetidos aos tratamentos de 2,0 e 20  $mg.L^{-1}$  por 96 horas (0). As plantas controle e submetidas ao tratamento de 0,2  $mg.L^{-1}$  apresentaram os maiores valores para todos os parâmetros de fluorescência da clorofila a analisados, a exceção do qNP, que se mantiveram estáveis durante todo o experimento.

Tabela 1.1: Média dos valores dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ), taxa variável de rendimento ( $F_v/F_0$ ), quenching fotoquímico (qP) e quenching não fotoquímicos (qNP). Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição.

Tempo (h)	Tratamento	$F_v/F_m$	$F_v/F_0$	qP	qNP
0	controle	0,84 ± 0,01 Aa	5,43 ± 0,48 Aa	0,98 ± 0,018 Aa	0,09 ± 0,013 Aa
	0,2 mg/L	0,86 ± 0,008 Aa	5,96 ± 0,41 Aa	0,94 ± 0,037 Aa	0,1 ± 0,041 Aa
	2,0 mg/L	0,86 ± 0,008 Aa	6,21 ± 0,41 Aa	0,95 ± 0,040 Aa	0,09 ± 0,036 Aa
	20 mg/L	0,85 ± 0,008 Aa	5,79 ± 0,41 Aa	0,94 ± 0,049 Aa	0,12 ± 0,065 Aa
48	controle	0,87 ± 0,01 Aa	6,55 ± 0,38 Aa	0,97 ± 0,01 Aa	0,06 ± 0,03 Aa
	0,2 mg/L	0,86 ± 0,01 Aa	6,23 ± 0,35 Aa	0,97 ± 0,01 Aa	0,08 ± 0,02 Aa
	2,0 mg/L	0,72 ± 0,09 Bb	2,94 ± 1,59 Bb	0,84 ± 0,05 Bb	0,26 ± 0,09 Bb
	20 mg/L	0,68 ± 0,13 Bb	2,56 ± 1,24 Bb	0,86 ± 0,01 Bb	0,34 ± 0,04 Bb
96	controle	0,85 ± 0,01 Aa	5,79 ± 0,22 Aa	0,98 ± 0,02 Aa	0,13 ± 0,06 Aa
	0,2 mg/L	0,84 ± 0,01 Aa	5,12 ± 0,53 Aa	0,98 ± 0,01 Aa	0,06 ± 0,04 Aa
	2,0 mg/L	0,5 ± 0,05 Cb	0,99 ± 0,18 Bb	0,76 ± 0,08 Bb	0,01 ± 0,04 Aa
	20 mg/L	0,34 ± 0,01 Cb	0,51 ± 0,03 Bb	0,86 ± 0,01 ABb	0,02 ± 0,18 Aa

A variação no teor dos pigmentos fotossintéticos ao longo do experimento e nos diferentes tratamentos é mostrada na tabela 1.2. O teor das clorofilas *a* e *b* e clorofila total apresentaram redução significativa a partir de 48 horas, para as plantas submetidas aos tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup>. Os menores valores foram de, respectivamente, 21  $\mu\text{mol cm}^{-2}$ , 8  $\mu\text{mol cm}^{-2}$  e 29,63  $\mu\text{mol.cm}^{-2}$ , registrados para o tratamento de 20 mg.L<sup>-1</sup> no tempo de 96 horas. A redução máxima no teor de clorofila *a* foi de 54% em relação às plantas controle, de clorofila *b* foi de 46% e clorofila total de 52%. O teor de carotenoides, apesar de não apresentar diferença significativa, aumentou nos indivíduos expostos ao tratamento de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> (10  $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ) por 96 horas. O valor da razão clorofila total/carotenoides reduziu significativamente nos indivíduos expostos ao tratamento de 20 mg.L<sup>-1</sup> por 48 horas (5,21) e 96 horas (3,61).

Tabela 1.2: Média nos valores de pigmentos fotossintetizantes em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição.

Tempo (h)	Tratamento	[Clo a]		[Clo b]		[Caro]		[Clo totais]		Clo (a + b)	
		$\mu\text{mol.cm}^{-2}$		$\mu\text{mol.cm}^{-2}$		$\mu\text{mol.cm}^{-2}$		$\mu\text{mol.cm}^{-2}$		(Caro)	
0	Controle	34,98 ± 1,16	Aa	11,32 ± 0,46	Aa	7,95 ± 0,44	Aa	46,30 ± 1,43	Aa	5,82 ± 0,45	Aa
	0,2 mg/L	39,48 ± 5,46	Aa	11,94 ± 1,92	Aa	8,37 ± 0,53	Aa	51,42 ± 7,35	Aa	6,14 ± 0,51	Aa
	2,0mg/L	41,71 ± 2,26	Aa	12,87 ± 0,75	Aa	8,93 ± 0,44	Aa	54,58 ± 3,01	Aa	6,11 ± 0,14	Aa
	20mg/L	36,89 ± 4,40	Aa	11,64 ± 0,21	Aa	7,89 ± 0,75	Aa	48,53 ± 5,55	Aa	6,15 ± 0,24	Aa
48	Controle	52,34 ± 1,08	Ba	16,02 ± 0,25	Ba	9,48 ± 1,81	Aa	68,36 ± 1,33	Ba	7,21 ± 0,18	Aa
	0,2 mg/L	46,46 ± 1,10	Aa	13,79 ± 0,09	Aab	9,54 ± 0,09	Aa	60,25 ± 1,2	Aab	6,31 ± 0,07	Aab
	2,0mg/L	33,57 ± 3,21	Ab	11,25 ± 1,49	Ab	6,85 ± 0,14	Aa	44,82 ± 4,69	Ab	6,54 ± 0,56	Aab
	20mg/L	36,54 ± 3,08	Ab	11,08 ± 0,24	Ab	9,14 ± 0,17	Aa	47,62 ± 3,32	Ab	5,21 ± 0,46	Ab
96	Controle	45,91 ± 0,33	ABa	15,57 ± 0,58	Ba	8,87 ± 0,90	Aa	61,48 ± 0,25	Ba	6,93 ± 0,31	Aa
	0,2 mg/L	42,98 ± 1,47	Aa	14,44 ± 1,22	Ba	10,30 ± 0,09	Aa	57,42 ± 0,25	Aa	5,57 ± 5,03	Aa
	2,0mg/L	36,62 ± 0,07	Ab	10,95 ± 0,09	Ab	8,10 ± 0,04	Aa	47,57 ± 0,02	Ab	5,87 ± 0,02	Aa
	20mg/L	21,22 ± 5,79	Bb	8,41 ± 1,30	Ab	8,19 ± 0,31	Aa	29,63 ± 7,02	Bc	3,61 ± 0,19	Bb

### 1.5.5 Parâmetros Físico-Químicos

A figura 1.8 mostra a variação dos parâmetros físico-químicos medidos na solução nutritiva durante a aclimação e durante o experimento. O  $\text{AsO}_4^{3-}$  foi adicionado no final da aclimação (120 horas) porém os parâmetros físico-químicos neste dia foram medidos antes da adição, exceto para o pH, que foi medido antes e depois a fim de ser mantido na faixa de variação na qual *E. crassipes* se desenvolve em condições naturais (6,5 – 7,5) (Lage-Pinto, 2008). Após a adição do  $\text{AsO}_4^{3-}$  o pH tornou-se ácido nos tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup>, sendo ajustado entre 7,0 e 7,2 por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH).

Em relação ao pH da solução durante a aclimação observou-se queda em seus valores até o dia da adição do  $\text{AsO}_4^{3-}$  (Fig. 1.8A). Após a adição do metaloide observou-se aumento do pH, exceto para o tratamento controle, que se manteve estável (Fig.1.8B). Observou-se menor valor de pH durante o experimento no tratamento de 20 mg.L<sup>-1</sup> no primeiro dia de experimento (tempo 0) (7,10), e o maior valor no último dia de experimento (96 horas) para os tratamentos de 2 e 20 mg.L<sup>-1</sup> (7,37). Em geral, a diferença significativa nos valores de pH foram observadas para o tratamento de 20 mg.L<sup>-1</sup> entre o tempo 0 e os demais tempos. Todos os valores de

pH foram maiores do que 7, mostrando que as soluções nutritivas estavam levemente alcalinas.

Em geral, os valores de  $O_2$  dissolvido durante a aclimação apresentaram uma leve diminuição até o dia da adição do  $AsO_4^{3-}$  (Fig. 1.8C). Após a adição do metaloide os valores de  $O_2$  dissolvido apresentaram queda acentuada até o final do experimento (Fig. 1.8D). O menor valor de  $O_2$  dissolvido durante o experimento foi  $4,32 \text{ mg.L}^{-1}$  no último dia de experimento (96 horas) para a concentração de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , enquanto o maior valor foi  $5,07 \text{ mg.L}^{-1}$  no segundo dia de experimento (48 horas) para a concentração de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ . Não houve diferença significativa entre tempos e tratamentos para esse parâmetro.

Em relação à condutividade elétrica observou-se queda durante a aclimação (Fig. 1.8E). Após a adição do metaloide observou-se aumento na condutividade elétrica para os tratamentos de  $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  (Fig. 1.8F). Os valores menor ( $280 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ) e maior ( $1333 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ) foram encontrados no último dia de experimento (96 horas) nos tratamentos, respectivamente, controle e de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ . Diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos de  $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  e entre estes tratamentos e os tratamentos controle e de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  nos tempos de 48 e 96 horas.

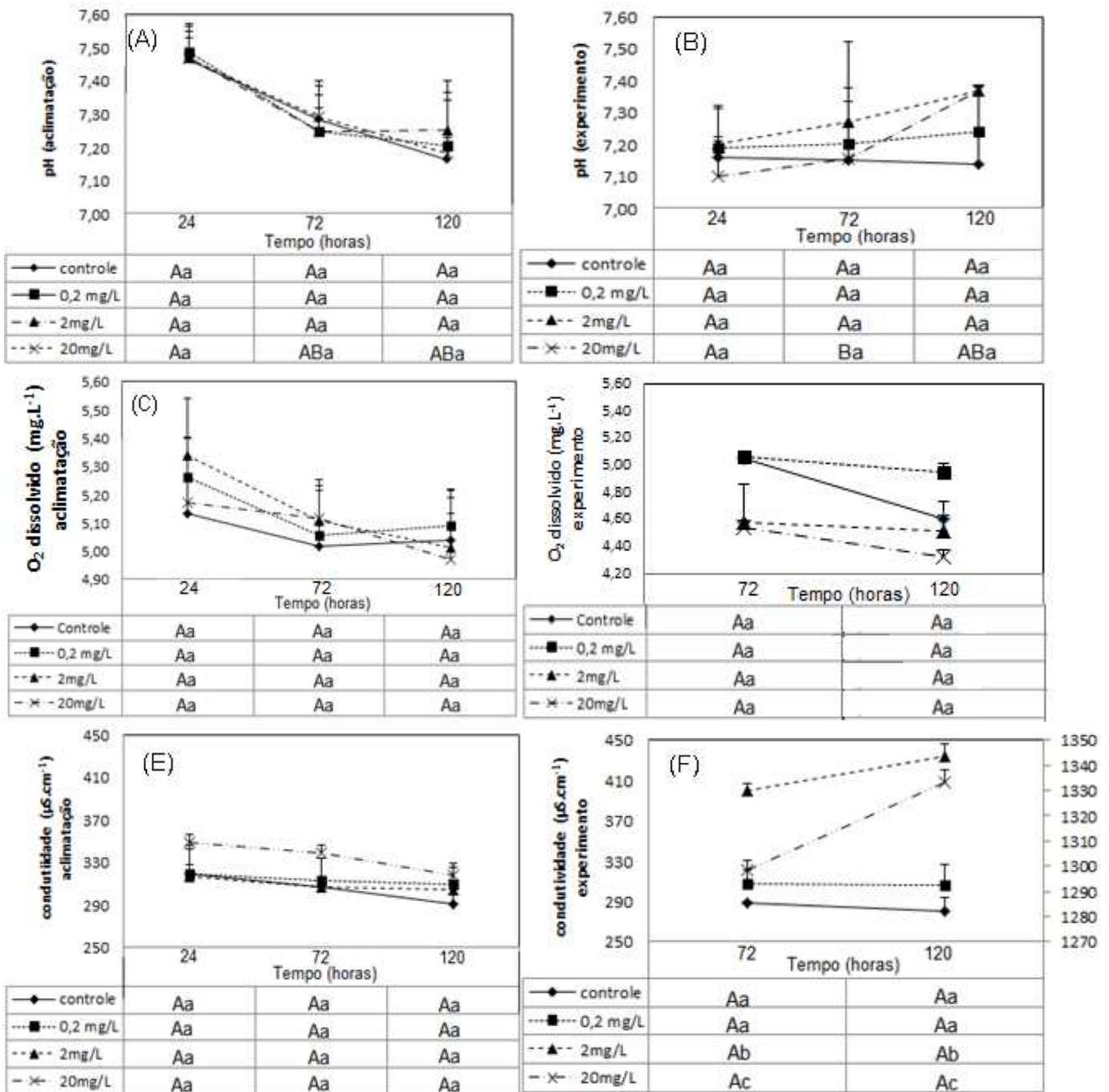


Figura 1.8: Média dos valores de pH (A e B), O<sub>2</sub> dissolvido (C e D) e condutividade elétrica (E e F) monitorados durante a aclimatação e o experimento. Gráfico F eixo secundário para o tratamento de 20 mg.L<sup>-1</sup>. Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição. As barras representam o desvio padrão da média.

## 1.6 Discussão

Um dos sintomas visuais da toxicidade de plantas a elementos traço é o aparecimento de clorose em suas folhas, como reportado por vários autores (Pestana, 2013; Paiva *et al.*, 2009; Soltan e Rashed, 2003). No estudo realizado por Soltan e Rashed (2003) com *E. crassipes* submetida a estresse por Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn variando entre 1 e 100 mg.L<sup>-1</sup> observou-se que nas concentrações de 5 e 7 mg.L<sup>-1</sup> as plantas apresentaram folhas amareladas após 72 horas de experimento e, em 168 horas, quase todas as folhas estavam mortas, com senescência total das plantas em 192 horas de experimento.

Em um estudo realizado com *E. crassipes* submetida a estresse por Hg, com concentrações variando entre 0,5 e 10 mg.L<sup>-1</sup>, observou-se que os indivíduos de todos os tratamentos apresentaram sintomas visuais de toxidez. As injúrias nas margens das lâminas foliares dessas plantas foram caracterizadas como clorose e necrose, sendo que à medida que a concentração de Hg em solução aumentou, registrou-se maior proporção de injúrias nas plantas (Mendes *et al.*, 2009). Já no estudo realizado com Cu (30 mg.L<sup>-1</sup>) sinais de toxicidade como folhas amareladas e murchas foram observados em *Pontederia parviflora* no 7º dia de experimento, apesar de ainda apresentar capacidade de absorção do metal (Souza *et al.*, 2009b). Segundo Sing *et al.* (2005) e Souza *et al.* (2009b) a mudança na coloração das folhas quando submetidas a estresse por elementos traço é sinal de redução na absorção de nutrientes, e a persistência da exposição a tais elementos leva a morte das plantas.

De acordo com o resultado obtido nesse estudo, referente ao acúmulo de As no tecido vegetal, notou-se que a absorção do metaloide pela planta aumentou com o incremento deste elemento na solução nutritiva, assim como a translocação para as folhas. Resultados semelhantes foram obtidos em *Lemna gibba* (Mkandawire e Dudel, 2004), *Spirodela polyrhiza* (Zhang *et al.*, 2011b) e *Lepidium sativum* (Robinson *et al.*, 2003) cujas plantas apresentaram aumento no teor de As em seus tecidos, a medida que se aumentava a concentração desse elemento no meio externo. Segundo Martinez e Shu-Nyamboli (2011) a correlação positiva encontrada entre as concentrações de elementos tóxicos nas plantas e no meio indica que as macrófitas são boas indicadoras da concentração de elementos traço no ambiente

Em geral, no presente estudo, a concentração do metaloide foi maior na raiz em detrimento das folhas, como observado para as concentrações de Ferro (Fe), Mn, Cu, Zn, Ni, Cr e Pb em estudo realizado por Campaneli e colaboradores (2010) com a mesma espécie. Estudos sugerem a importância das raízes como órgão preferencial de acúmulo de metais, o que tem implicação direta na manutenção do processo fotossintético, crucial para ganho de biomassa (Soltan e Rashed, 2003). Aliado a isso a raiz fasciculada, característica dessa espécie, possibilita elevada adsorção de As em sua superfície de contato. Porém, em alguns casos, tem sido verificado que espécies tolerantes acumulam maiores concentrações de As na parte aérea, como *Pteris vittata* (Ma *et al.*, 2001) e *Pisum sativum* (Päivöke e Simola, 2001), indicando a existência de um mecanismo de compartimentalização de As diferente do encontrado nesse estudo.

O As possui baixa mobilidade nas plantas e, conseqüentemente, reduzida translocação das raízes para as folhas, exceto para as plantas hiperacumuladoras (Zhao *et al.*, 2009). Em geral, plantas hiperacumuladoras possuem fator de translocação maior que 1 (Zhao *et al.*, 2010). No presente estudo o fator de translocação para a maioria dos indivíduos foi menor que 1, o que indica que as plantas não translocaram As de forma eficiente para as folhas. Em diversas espécies ocorre baixa eficiência de translocação de As das raízes para a parte aérea, como observado para *Crotalaria spectabilis* e *Cajanus cajan* com retenção de, respectivamente, 97% e 75% do As absorvido em suas raízes (Arantes *et al.*, 2009).

É possível que elevadas concentrações de As nas raízes ocorra devido a capacidade de ligação do As a compostos da parede celular da raiz (Salt *et al.*, 1998) e redução na sua condução via fluxo de água pelo xilema (Stoeva *et al.*, 2005). Além disso, especula-se que o acúmulo de As em raízes esteja relacionado à complexação desse elemento a grupos tióis. É bem documentado que o arsenato, ao entrar nas células, é prontamente reduzido a arsenito (Pickering *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2007; Mathews *et al.*, 2010), adquirindo alta afinidade por grupo tióis que, por sua vez, são responsáveis pelo sequestro do arsenito em vacúolos na raiz (Araújo, 2011). O sequestro de elementos tóxicos em vacúolos reduz sua concentração no citoplasma, evitando os danos causados nos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas (Prasad, 1995).

Por outro lado, as plantas expostas ao tratamento de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  no tempo de 96 horas apresentaram o teor de As mais elevado nas folhas em relação a raiz, sendo seu fator de translocação maior que 1. É possível que a absorção e acúmulo do metaloide nesse tempo e tratamento tenha sido muito elevado na raiz, excedendo a capacidade de retenção nesse órgão, o que levou a translocação para a parte aérea. Da mesma forma Sundberg-Jones e Hassan (2007) verificaram que o acúmulo de As em *Typha angustifolia* foi maior na parte aérea, acumulando mais que 64% do metaloide nas folhas e sementes. Neste estudo foi sugerido que a tolerância a As por *T. angustifolia* foi devido a mecanismos de desintoxicação interna, como o aumento da síntese de tióis, tais como fitoquelatinas e por meio da atividade de enzimas antioxidantes (Srivastava, 2007). Amostras de plantas do presente estudo foram utilizadas por Alencar (2013) para determinação de enzimas antioxidantes, sendo observado aumento da atividade de superóxido dismutase (SOD) nos indivíduos submetidos aos tratamentos de  $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  por 48 horas. Esta enzima converte os radicais superóxidos ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que é menos tóxico (Resende *et al.*, 2003).

Valores elevados do fator de bioacumulação em macrófitas podem sugerir eficiência na bioindicação e remoção de ambientes aquáticos contaminados com As, sendo que valores desse fator maior que 1000 indicam que a espécie é hiperacumuladora (Zayed *et al.*, 1998a). De modo geral *E. crassipes* tem demonstrando grande capacidade de tolerar elementos tóxicos em seu organismo, tais como As, Cr, Hg, Cu, Pb, podendo ser utilizada na remoção desses poluentes em áreas contaminadas (Reis, 2011; Paiva *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2003; Axtell *et al.*, 2003).

Baseado no fator de bioacumulação para definir espécies hiperacumuladoras, no presente estudo *E. crassipes* demonstrou ser hiperacumuladora de As para os tratamentos de  $0,2$  e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , sugerindo que essa espécie não é eficiente na remoção de elevadas concentrações de elementos tóxicos, pois, quando exposta a  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  seu fator de bioacumulação foi menor que 400. Esses resultados estão de acordo com o encontrado por Sundberg-Jones e Hassan (2007), em que teores reduzidos de As nos tecidos de *S. californicus* (1,7 e

7,6 mg.Kg<sup>-1</sup>) foram relacionados com elevados valores do fator de bioacumulação (1206 e 4927).

A exposição a concentrações e tempos crescentes ao AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> resultou em decréscimos significativos na taxa fotossintética líquida (*A*), como observado por outros autores (Stoeva *et al.*, 2005), o que pode estar relacionado à desorganização da estrutura dos cloroplastos (Miteva e Merakchiysca, 2002), diminuição no teor de pigmentos fotossintéticos (Lidon e Henriques 1991) e fechamento estomático (Parys *et al.*, 1998). Em plantas de milho observou-se a redução de 23% da *A* em relação aos indivíduos controle, quando expostas a 5 mg.dm<sup>-3</sup> de arsenato de sódio (Na<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub>) (Stoeva e colaboradores 2003/4). Segundo estes autores uma das razões para redução da *A* é a limitação estomática promovida por alterações nas células radiculares que, nesse estudo, foi relacionada à diminuição da transpiração (*E*) (41 e 50%) e condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) (33 e 50%). No presente estudo também foi observada queda acentuada nos valores de *E* e *g<sub>s</sub>* a partir dos tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup> no tempo de 48 horas. É provável que o As tenha influenciado a absorção de íons e de água devido a sua ação inibitória sobre a H<sup>+</sup>-ATPase mitocondrial (Mylona *et al.*, 1998), que atua no transporte unidirecional de íons.

Em relação a concentração subestomática de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*) observou-se o padrão inverso, com seus valores aumentando a partir de 48 horas de experimento, para os tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes foram observados por Paiva e colaboradores (2009) em *E. crassipes* submetida a estresse por Cr<sup>3+</sup> e Cr<sup>6+</sup>. Pode ser estabelecida uma relação entre a *g<sub>s</sub>* e o *C<sub>i</sub>*, pois, valores decrescentes da *g<sub>s</sub>* implicam no fechamento dos estômatos da planta, o que levaria ao aumento da concentração do *C<sub>i</sub>* na sua câmara subestomática. Além disso, é provável que tenha ocorrido alterações na via bioquímica da fotossíntese, uma vez que esse acúmulo de *C<sub>i</sub>* também indica que ele não está sendo reduzido a carboidratos.

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* também são responsáveis por limitar a *A*. Os valores de rendimento quântico máximo (*F<sub>v</sub>*/*F<sub>m</sub>*) e taxa variável de rendimento (*F<sub>v</sub>*/*F<sub>0</sub>*) expressam a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II (Baker, 1991), indicando a eficiência fotoquímica do fotossistema II (Rubin, 2006) e a atividade fotoquímica dos cloroplastos (Oliveira *et al.*, 2009). Os resultados encontrados nesse estudo mostram

diminuição considerável nas razões  $F_v/F_m$  e  $F_v/F_0$  no mesmo padrão da diminuição da  $A$ , o que indica que a atividade funcional do fotossistema II foi reduzida (Georgieva e Yordanov, 1993). Segundo Bolhar-Nordenkampf e colaboradores (1989) valores de  $F_v/F_m$  entre 0,75 e 0,85 indicam que o aparelho fotossintético está eficiente e, em relação a razão  $F_v/F_0$ , seu valor pode variar entre 4 e 6 em plantas saudáveis (Roháček, 2002). *E. crassipes* também apresentou redução nos valores de  $F_v/F_m$  e  $F_v/F_0$  quando submetida a Cr (Paiva *et al.*, 2009) assim como plantas de milho, quando submetidas a As (Stoeva *et al.*, 2003/4).

Oliveira e colaboradores (2002) sugerem que a razão  $F_v/F_0$ , em relação a razão  $F_v/F_m$ , é melhor para discriminar pequenas diferenças no rendimento quântico do fotossistema II, o que vai ao encontro ao que foi observado no presente estudo, para os tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup> a partir de 48 horas. Além disso, alguns estudos não reportam diferença na razão  $F_v/F_m$  em plantas submetidas a elementos tóxicos (Souza *et al.*, 2009b; Araújo, 2011; Nascimento, 2007).

O quenching fotoquímico (qP) denota a proporção de elétrons capturados pelos centros de reação do fotossistema II e convertidos em energia química. Essa energia será utilizada nos processos fotoquímicos da fotossíntese, reduzindo o NADP (Krause e Weis, 1991). Nesse estudo observou-se queda nos seus valores a partir de 48 horas para os tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup>, o que indica que menos energia está sendo disponibilizada para a fotossíntese. Segundo Genty e colaboradores (1989) há uma relação positiva entre qP e  $F_v/F_m$ , o que também foi observado nesse estudo.

O quenching não fotoquímico (qNP) está relacionado à dissipação não fotoquímica do excesso de energia de excitação no fotossistema II (Krause e Weis, 1991). No presente estudo observou-se aumento do qNP somente nos indivíduos expostos aos tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup> por 48 horas, diminuindo em 96 horas para ambos os tratamentos. É possível que inicialmente a planta tenha aumentado o qNP para dissipação de energia, a fim de proteger seu aparelho fotossintético, porém seu estado senescente observado em 96 horas não permitiu que esse processo se mantivesse.

Correlação positiva entre qNP e o teor de carotenoides é relatado para *E. crassipes* (Lage-Pinto, 2008) indicando que a dissipação de energia pelas plantas

nesse estudo é um provável mecanismo para redução da energia sobre a cadeia transportadora de elétrons. No presente estudo o teor de carotenoides não se alterou ao longo do experimento. Vitória e colaboradores (2010) observaram que menos de 50% da variação no qNP estava relacionada ao teor de carotenoides em *E. crassipes*, sendo provável que outros mecanismos estejam envolvidos na dissipação de energia. É possível que o teor de carotenoides no presente estudo não tenha sido alterado devido às condições experimentais, não havendo tempo suficiente para o aparelho fotossintético de *E. crassipes* se proteger do estresse. Vitória e colaboradores (2010) sugerem que para esta espécie o mecanismo de dissipação de energia seja uma adaptação vegetal em longo prazo.

A redução do teor de pigmentos fotossintéticos é um dos fatores internos mais importantes que, em alguns casos, são capazes de limitar a *A* (Stoeva e Bineva, 2003). Segundo Lindon e Henriques (1991) o passo limitante no efeito de elementos traço na *A* é a inibição da síntese de clorofilas. A ação de elementos tóxicos geralmente é acompanhada pelo aumento das EROs em plantas, perturbando seu balanço e causando estresse oxidativo. Radicais ativos, especialmente o radical OH, interagem com moléculas orgânicas, como os pigmentos, oxidando-os (Schutzendubel *et al.*, 2002). Além disso, a peroxidação lipídica, resultado da ação das EROs, causa danos na membrana dos cloroplastos, inibindo a síntese de clorofilas (Iti, 2013). Redução no teor de pigmentos quando expostas a elementos tóxicos são reportados para *E. crassipes* (Reis, 2011), *Egeria densa* (Pestana, 2013), *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* e *Spirodela polyrhiza* (Lizieri *et al.*, 2012).

No presente estudo a redução no teor de clorofila *a* foi maior em relação à clorofila *b*. Esses dados permitem concluir que a clorofila *a* é mais sensível à ação do As, assim como observado no estudo realizado com *Elodea densa* exposta a Cu (Maleva *et al.*, 2012). A redução no teor das clorofilas *a* e *b* devido ao estresse por As é relatado para várias espécies como *Pisum sativum* e *Pennisetum typhoides* (Iti, 2013), plantas de milho (Stoeva *et al.*, 2003) e arroz (Rahman *et al.*, 2007). O tratamento de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> não alterou o teor das clorofilas ao longo do experimento. É reportado que baixas concentrações de elementos traço podem estimular alguns processos fisiológicos nas plantas, como observado em *Lemna trisulca* exposta a

baixas doses de Cd e *Eichhornia crassipes* exposta a Cr (Malec *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2009).

A manutenção das proporções na razão clorofila total (a + b)/carotenoides é indicador da resistência dos pigmentos a elementos tóxicos (Maleva *et al.*, 2012). Segundo estes autores essa razão é normalmente estável, mas muda rapidamente sob a ação de fatores de estresse. Mudanças na proporção de pigmentos fotossintéticos são refletidas na atividade do aparelho fotossintético, afetando a taxa de fotossíntese, bem como o crescimento e produção das plantas (Malec *et al.*, 2010). Essa razão se alterou ao longo do experimento, sendo reduzida significativamente no tratamento de 20 mg.L<sup>-1</sup> no tempo de 96 horas, devido a redução das clorofilas a e b, sugerindo que os pigmentos fotossintetizantes foram mais um indicativo de estresse a As pela planta.

A manutenção do pH na rizosfera é diretamente influenciada pela absorção de íons pelas raízes das plantas, uma vez que o processo de extrusão de H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup> é estequiometricamente igual as respectivas concentração de cátions e ânions absorvidos (Haynes *et al.*, 1990). Uma vez que a absorção de ânions geralmente excede a absorção de cátions pelas plantas é possível que o aumento do pH durante o experimento (após a adição de As na solução nutritiva) esteja relacionada ao efluxo de OH<sup>-</sup> devido a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e/ou PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. No estudo realizado por Moorby e colaboradores (1985) foi observado que a liberação de OH<sup>-</sup> da raiz de *Brassica napus* foi sensível ao fornecimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, uma vez que plantas com suprimento desse nutriente liberavam OH<sup>-</sup> a fim de manter a eletro neutralidade da membrana plasmática. A figura 1.9 exemplifica a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pela célula vegetal.

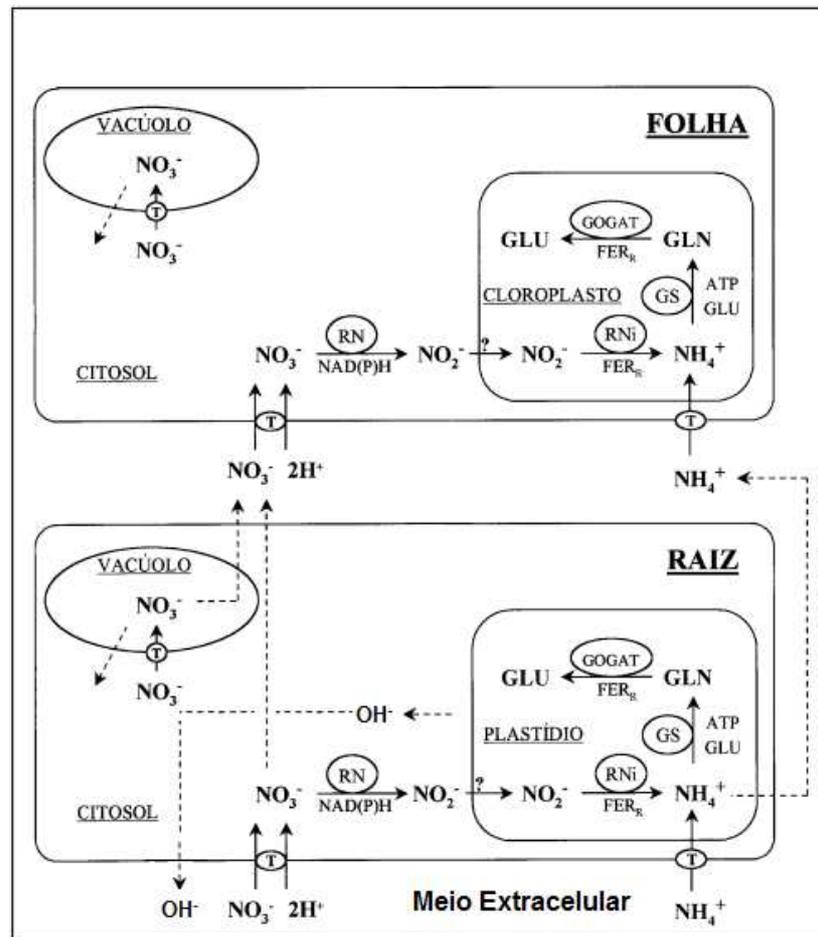


Figura 1.9: Representação esquemática da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas. ( $\text{NO}_3^-$ : nitrato;  $\text{NO}_2^-$ : nitrito;  $\text{NH}_4^+$ : amônio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; RN: redutase do nitrato; RNi: redutase do nitrito; GS: sintetase da glutamina; GOGAT: sintetase do glutamato; T: transportador).

Fonte: Bredemeier e Mundstock, 2000. Adaptado pelo autor (2013).

Em relação à redução do  $\text{O}_2$  dissolvido, esta pode ser decorrente da liberação de ácidos húmicos por *E. crassipes* (Mohedano, 2010) uma vez que há o consumo de oxigênio no processo de decomposição da matéria orgânica (Ferreira, 2005). Além disso, a cobertura vegetal diminui a superfície de contato com a atmosfera, reduzindo a difusão do oxigênio do ar para a água (Mohedano, 2010).

Visto que a condutividade elétrica é diretamente proporcional a concentração de íons em solução, este parâmetro aumentou nos tratamentos de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$  devido ao incremento de íons por meio da adição de  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{NaOH}$ . Porém a

condutividade elétrica diminui nos tratamentos controle e de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  devido, provavelmente, a absorção ativa de íons pelas plantas nestes tratamentos.

### 1.7 Conclusão

- Apesar de acumularem elevadas concentrações de As em seus tecidos, as plantas expostas aos tratamentos de  $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  não foram tolerantes ao metaloide, apresentando comprometimento das suas funções metabólicas a partir de 48 horas, o que refuta parcialmente a hipótese do estudo.
- As plantas mostraram-se tolerantes a As somente quando expostas ao tratamento  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , o que é confirmado pelo não comprometimento de suas funções metabólicas associado a seu elevado fator de bioacumulação, o que corrobora parcialmente a hipótese do estudo.
- A redução no teor dos pigmentos fotossintetizantes, limitação estomática e diminuição na atividade funcional do fotossistema II foram determinantes para desencadear estresse a As por *E. crassipes* nos tratamentos de  $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , a partir de 48 horas.

### 1.8. Referências Bibliográficas

ADRIANO, D.C. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. 2nd Edition. Springer-Verlag. 866 pp, 2001.

ALENCAR, T.S. Efeito do arsênio sobre a morfologia, fotossíntese e enzimas antioxidantes em aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). Defesa de monografia. 49p. Campos dos Goytacazes, 2013.

ALVES, E., CARDOSO, L.R., SCAVRONI, J.L.R., FERREIRA, L.C., BOARO, C.S.F., CATANEO, A. C. Avaliações fisiológicas e bioquímicas de plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*) cultivadas com níveis excessivos de nutrientes. Planta Daninha, Viçosa, v. 21, p. 27-35, 2003.

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

ARAÚJO, S.H.C. Tolerância de *Brassica juncea* ao arsênio e seu potencial para a fotestabilização de solos contaminados. Dissertação de Mestrado. Viçosa, 56p., 2011.

AXTELL, N.R., STERNBERG, S.P.K., CLAUSSEN, K. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. Bioresource Technology 89:41-48, 2003.

BAKER, N.R. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plant.*, 81, 563-570, 1991.

BARRA, C.M., SANTELLI, R.E., ABRÃO, J.J., DE LA GUARDIA, M. 2000. Especificação de As – Uma revisão. *Química Nova* 23:58-70.

BREDEMEIER, C., MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

BOLHAR-NORDENKAMPF H.R., LONG, S.P., BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Func. Ecol.* 3:497-514, 1989.

CAMPANELI, L.B., SOUZA, C.M.M., RIBEIRO, T.S., REZENDE, C.E., AZEVEDO, R.A., ALMEIDA, M.G., VITÓRIA, A.P. Variação espaço-temporal de metais em aguapé [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms], material particulado aderido às raízes de aguapé e no sedimento em dois rios do sudeste brasileiro. *Biotemas*, 23 (4): 119-128, 2010.

DHOTE, S, DIXIT, S. Water quality improvement through macrophytes - a review. *Environ Monit Assess.* 152:149–153, 2009.

FERREIRA, F.A. Comunidades de macrófitas aquáticas e aspectos físico-químicos de três lagoas do Parque Estadual do Rio Doce, MG. Dissertação de mestrado. Viçosa, 92p., 2005.

FORNAZIER, R.F., FERREIRA, R.R., MOLINA, S.M.G., VITÓRIA, A.P., AZEVEDO, R.A.. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar-cane. *Biologia Plantarum* 45 (1): 91-97, 2002.

GARG, N., SINGLA, P. Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environ Chem Lett.* 9:303–321, 2011.

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87–92, 1989.

GEORGIEVA, K., YORDANOV, I. Temperature dependence of chlorophyll fluorescence parameters of pea seedlings. *J. Plant Physiol.*, 142, 151–155, 1993.

GIRI, A.K., PATEL, R.K. Phytoaccumulation potential and toxicity of arsenic ions by *Eichhornia Crassipes* in hydroponic system. J Bioremed Biodegrad. Vol. 3, 1-6, 2012.

GLASS, A. D. M.; SHAFF, J. E.; KOCHIAN, L. V. Studies of uptake of nitrate in barley. Plant Physiology, v.99,p.456-463,1992.

GONÇALVES, J.A.C., LENA, J.C., PAIVA, J.F., NALINI, H.A.J. & PEREIRA, J.C. Arsenic in the groundwater of Ouro Preto (Brazil): its temporal behavior as influenced by the hydric regime and hydrogeology. Environ Geol, 53:785–793, 2007.

GULZ, P.A., GUPTA, S.K., SCHULIN, R. Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils. Plant Soil 272, 337–347, 2005.

GUNES, A., PILBEAM, D.J., INAL, A. Effect of arsenic–phosphorus interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. Plant Soil 314, 211–220, 2008.

HAYNES, R.J. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. Plant and Soil 120, 247-264, 1990.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agriculture Station, p. 347, 1950.

ITI, S. Arsenic-induced oxidative stress and antioxidant defense system of *Pisum sativum* and *Pennisetum typhoides*: A Comparative Study. Res. J. Biotech. Vol. 8 (4) April, 2013.

KRÄMER, U., PICKERING, I.J., PRINCE, R.C., RASKIN, I., SALT, D.E. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. Plant Physiol. 122: 1343-1353, 2000.

KRAUSE, G.H., WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 313-349, 1991.

LAGE-PINTO, F. Alterações ecofisiológicas e estruturais em *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) no Rio Paraíba do Sul. Dissertação de mestrado. Campos dos Goytacazes, RJ. 102p., 2008.

LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31:109-120, 2002.

LIDON, F.C., HENRIQUES, F.S. Effect of copper on protein and biomass yields of rice plants. *J. Plant Physiol.* Vol. 138. 115-118, 1991.

LIZIERI, C., KUKI, K.N., AGUIAR, R. The morphophysiological responses of free-floating aquatic macrophytes to a supra-optimal supply of manganese. *Water, Air, Soil Pollut.* 223:2807–2820, 2012.

MA, L.Q., KOMAR, K.M., TU, C., ZHANG, W., CAI, Y., KENNELLEY, E.D. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature.* Vol. 409, 1p., 2001.

MALEC, P., MALEVA, M.G., PRASAD, M.N.V. e STRZALKA, K. Responses of *Lemna trisulca* L. (Duckweed) Exposed to Low Doses of Cadmium: Thiols, Metal Binding Complexes and Photosynthetic Pigments as Sensitive Biomarkers of Ecotoxicity, *Protoplasma*, vol. 240, pp. 69–74, 2010.

MALEVA, M.G., NEKRASOVA, G.F., BORISOVA, G.G., CHUKINA, N.V., USHAKOVA O.S. Effect of heavy metals on photosynthetic apparatus and antioxidant status of *Elodea*. *Russian Journal of Plant Physiology.* Vol. 59, N° 2, 190-197, 2012.

MARQUES, A.P.G.C., MOREIRA, H.A. RANGEL, O.S.S., CASTRO, P.M.L. Arsenic, lead and nickel accumulation in *Rubus ulmifolius* growing in contaminated soil in Portugal. *Journal of Hazardous Materials* 165, 174–179, 2009.

MARTINEZ, E.A., SHU-NYAMBOLI, C. Determination of selected heavy metal concentrations and distribution in a southwestern stream using macrophytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 74, 1504-1511, 2011.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, M.J., MARTÍNEZ-LÓPEZ, S., GARCÍA-LORENZO, M.L., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.B., PÉREZ-SIRVENT, C. Evaluation of arsenic in soils and plant uptake using various chemical extraction methods in soils affected by old mining activities. *Geoderma*. Vol. 160:535-541, 2011.

MASCHER, R., LIPPMANN, B., HOLZINGER, S., BERGMANN, H. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants, *Plant Sci*. Vol. 163, 961–969, 2002.

MATHEWS, S., MA, L.Q., RATHINASABAPATHI, B., NATARAJAN, S., SAHA, U.K. Arsenic transformation in the growth media and biomass of hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresource Technology* 101, 8024–8030 2010.

MEHARG, A.A., HARTLEY-WHITAKER, J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*. 154:29-43, 2002.

MENDES, P.L.A., MEYER, S.T., NORONHA, I.A.S., GOMES, S.M.A., SANTOS, M.H. Alterações morfológicas em *Eichhornia crassipes* (Aguapé) (Mart.) Solms-Laubach (Pontederiaceae), exposta a elevadas e concentrações de mercúrio. *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba*, v. 19, p. 29-38, jan./dez. 2009.

MISHRA, K., GUPTA, K., RAI, U.N. Bioconcentration and phytotoxicity of chromium in *Eichhornia crassipes*. *Journal of Environmental Biology*. Vol. 30, 521-526, 2009.

MISHRA, S., DUBEY R.S. Changes in phosphate content and phosphatase activities in rice seedlings exposed to arsenite. *Braz. J. Plant Physiol.*, 20(1):19-28, 2007.

MITEVA, E., MERAKCHYISKA, M. Response of chloroplasts and photosynthetic mechanism of bean plants to excess arsenic in soil. *Bulgarian J. Agr. Sci.*, v. 8, n. 2p. 151-156, 2002.

MOHEDANO, R.A. Uso de macrófitas lemnáceas (*Landoltia punctata*) no polimento e valorização do efluente de eucultura e na fixação de carbono. Tese de Doutorado. Florianópolis, 270p., 2010.

MOORBY, H., NYE, P.H., WHITE, R.E. The influence of nitrate nutrition on H<sup>+</sup> efflux by young rape plants (*Brassica napus* cv. emerald). *Plant and Soil* 84, 403-415, 1985.

MYLONA, P.V., POLIDOROS, A.N., SCANDALIOS, J.G. Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 25, Nos. 4/5, pp. 576–585, 1998.

NASCIMENTO, K.J.T. Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidantes em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio. Dissertação de Mestrado. Viçosa, 47p., 2007.

OLIVEIRA, J.G., ALVES, P.L.A.C., VITÓRIA, A.P. Alterations in chlorophyll a fluorescence, pigment concentrations and lipid peroxidation to chilling temperature in coffee seedlings. *Environ. Exp. Bot.*, 67, 71-76, 2009.

OLIVEIRA, J.G., ALVES, P.L.C.A., MAGALHÃES, A.C.N. The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. The protective action of chloroplastid pigments. *Braz. J. Plant Physiol.* 14, 95–104, 2002.

PAIVA L.B., OLIVEIRA, J.G., AZEVEDO, R.A., RIBEIRO, D.R., SILVA, M.G., VITÓRIA, A.P. Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr<sup>3+</sup> and Cr<sup>6+</sup>. *Environmental and Experimental Botany* 65, p. 403–409, 2009.

PÄIVÖKE, A.E.A., SIMOLA, L.K. Arsenate toxicity to *Pisum sativu*: mineral, nutrients, chlorophyll contend and phytase activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 111-121, 2001.

PARYS, E., ROMANOWSKA, E., SIEDLECKA, M., POSKUTA, J.W. The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum* 20:313-322, 1998.

PESTANA, I.A. Absorção de cádmio pela macrófita aquática *Egeria densa* sob um gradiente de concentração de macronutrientes. Monografia. Campos dos Goytacazes, 55p., 2013.

PICKERING, I.J., GUMAELIUS, L., HARRIS. H.H., PRINCE, R.C., HIRSCH G, BANKS, J.A., SALT, D.E., GEORGE, G.N. Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern. *Environmental Science & Technology* 40: 5010–5014, 2006.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.* 35:525-545, 1995.

RAHMAN, M.A., HASEGAWA, H., RAHMAN, M.N., ISLAM, M.N., MIAH, M.A.M., TASMEN, A. Effect of arsenic on photosynthesis, grown and yield of fiv widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bagladesh. *Chemeosfere*. Vol. 67: 1072-1079, 2007.

REIS, I.N.R.S. Sistemas de defesa dntioxidativo contra a toxicidade induzida por arsênio em aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). Tese de Doutorado. Viçosa, 91p., 2011.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L., CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28:123-130. 2003.

ROBINSON, B., DUWING, C., BOLAN, N., KANNATHASAN, M., SARABANAN, A. Uptake of arsenic by New Zealand watercress (*Lepidium sativum*). *The Science of the Total Environment* 30, 67–73, 2003.

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning and mutual relationships. *Photosynthetica* 40:13-29, 2002.

RUBIN, A.B., *Biophysics of Photosynthesis and Methods for Ecological Monitoring, Problemy regulyatsii v biologicheskikh sistemakh* (Problems of Regulation in Biological Systems), Moscow–Izhevsk: Nauch. Issled. Tsentr “Regulatory and Chaotic Dynamics”, 2006.

RÜEGSEGUER, A., BRUNOLD, C. Effect of cadmium on  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol.* 99: 428-433, 1992.

SALT, D.E., SMITH, R.D., RASKIN, I. Phytoremediation. *Plant Physiology*. Vol. 49, 643-668, 1998.

SCHUTZENDUBEL, A. e POLLE, A., Plant Responses to Abiotic Stress: Heavy Metal Induced Oxidative Stress and Protection by Mycorrhization. *J. Exp. Bot.*, vol. 53, pp. 1351–1365, 2002.

SING, N., MA, L.Q., SRIVASTAVA, M., RATHINASABAPATHI, B. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*. In press, Corrected Proof, 2005.

SMART, R.M., BARKO J.W. Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments. *Aquat. Bot.* 21: 251-263, 1985.

SMEDLEY, P.L., KINNIBURGH, D.G. Sources and behavior of arsenic in natural water, Chapter 1 in United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water, 2005.

SOLTAN, M.E., RASHED, M.N. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. *Advances in Environmental Research* 7, 321–334, 2003.

SOUZA, V.L., SILVA, D.C., SANTANA, K.B., MIELKE, M.S., ALMEIDA, A.F., MANGABEIRA, P.A.O., ROCHA, E.A. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. *Acta bot. bras.* 23(2): 343-354. 2009a.

SOUZA, D.C., RIBEIRO, R., LIMA, S.B., CARVALHO, K.Q., SILVA, J.R. Tolerância e hiperacumulação de cobre em *Pontederia parviflora* Alexander. *OLAM – Ciência & Tecnologia*, ISSN 1982-7784 – n.2, n. especial, p. 329, set. 2009b.

SRIVASTAVA, S., MISHRA, S., TRIPATHI, R.D., DWIVEDI, S. TRIVEDI, P.K., TANDON, P.K. Phytochelatins and antioxidant systems sespond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2930 – 2936, 2007.

STOEVA, N., BINEVA, T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulgarian J. Agric. Sci.*, v. 29, n. 1, p. 87-95, 2003.

STOEVA, N., BEROVA, M., ZLATEV, Z. Physiological response of maize to arsenic contamination. *Biologia Plantarum* 47 (3): 449-452, 2003/4.

STOEVA, N., BEROVA, M., ZLATEV, Z. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plantas. *Biologia Plantarum* 49 (2): 293-296, 2005.

SUNDBERG-JONES, S.E., HASSAN, S.M. Macrophyte sorption and bioconcentration of elements in a pilot constructed wetland for flue gas desulfurization wastewater treatment. *Water Air Soil Pollut*, 183:187–200, 2007.

VALE, F.R., FURTINI, A.E.N., RENÓ, N.B., FERNANDES, L.A., RESENDE, A.V. Crescimento radicular de espécies florestais em solo ácido. *Pesq. Agropec. bras.*, Brasília, v. 3, n. 9, p. 609-616, set. 1996.

VAN KOOTEN, O., SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147-150, 1990.

VITÓRIA, A.P., LAGE-PINTO, F., CAMPANELI, L.B., ALMEIDA, M.G., SOUZA, C.M.M., REZENDE, C.E., AZEVEDO, R.A., OLIVEIRA, J.G. Ecophysiological adaptation and metal accumulation in water hyacinth from two tropical rivers. *Braz. J. Plant Physiol.*, 22(1): 49-59, 2010.

VÖGELI-LANGE, R., WAGNER, G. J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 92: 1086-1093, 1990.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144 (3): 307-313, 1994.

XU, X.Y., McGRATH, S.P., ZHAO, F.J. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist*. 176: 590–599, 2007.

ZAYED, A., GOWTHAMAN, S., TERRY, N. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*. Vol. 27, 715-721, 1998a.

ZAYED A., LYTLE, C.M., QIAN, J.H., TERRY, N. Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta*, 206: 293-299, 1998b.

ZHANG, J., ZHAO, Q. Z., DUAN, G. L., HUANG, Y. C. Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 72, 4–40, 2011a.

ZHANG, X. HU, Y. LIU, Y.X, CHEN, B.D. Arsenate uptake, accumulation and phytofiltration by duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.). *Journal of Environmental Sciences*, 23(4): 601–606, 2011b.

ZHAO, F.J., MA, J.F., MEHARG, A.A., McGRATH, S.P. Arsenic uptake and metabolism in plants. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 181:777-794, 2009.

ZHAO, F.J., McGRATH, S.P., MEHARG, A.A. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual Review of Plant Biology*, 61:535-59, 2010.

## Anexos

(I, II, III, IV, V, VI)

Anexo I: Peso seco dos indivíduos de *Eichhornia crassipes* (n=36).

Tempo (horas)	Tratamento	Peso seco (g)
0	controle	4,37
		9,53
		3,63
	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	5,19
		6,31
		3,63
	2 mg.L <sup>-1</sup>	3,20
		7,78
		10,41
	20 mg.L <sup>-1</sup>	4,06
		2,84
		3,52
48	controle	3,25
		3,57
		6,84
	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	5,42
		5,26
		4,81
	2 mg.L <sup>-1</sup>	3,87
		3,21
		3,49
	20 mg.L <sup>-1</sup>	12,12
		11,6
		20,71
96	controle	4,68
		5,56
		13,7
	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	3,64
		6,45
		4,32
	2 mg.L <sup>-1</sup>	4,75
		9,03
		9,23
	20 mg.L <sup>-1</sup>	2,94
		8,11
		5,28

## Anexo II: Variação da intensidade luminosa na casa de vegetação.

Localização dos baldes	T0 ( $\mu\text{mol}$ )	T48 ( $\mu\text{mol}$ )	T96 ( $\mu\text{mol}$ )	T144 ( $\mu\text{mol}$ )	T192 ( $\mu\text{mol}$ )
Fila 1**	157	132	310	147	217
Fila 2**	106	133	314	143	125
Fila 3**	110	133	308	105	114
Fila 4**	128	134	320	150	153
Fila 6**	112	133	320	115	142
Fila 5**	111	132	370	116	138
Fila 7**	154	130	410	104	*
Fila 8**	113	130	409	120	*
Fila 9**	133	130	391	135	*
Fila 10**	165	129	440	130	*
Fila 11**	164	129	415	119	*
Fila 12**	165	131	394	127	*
Fila 13**	161	130	374	*	*
Fila 14**	127	131	339	*	*
Fila 15**	154	132	380	*	*
Fila 16**	159	131	335	*	*
Fila 17**	160	128	303	*	*
Fila 18**	158	124	294	*	*

\*\* Cada fila foi composta por 2 baldes (2 indivíduos).

\* Amostras de plantas retiradas.

Anexo III: Teor de As (%) na Raiz e Folhas de Indivíduos de *Eichhornia crassipes* - Média (n=36).

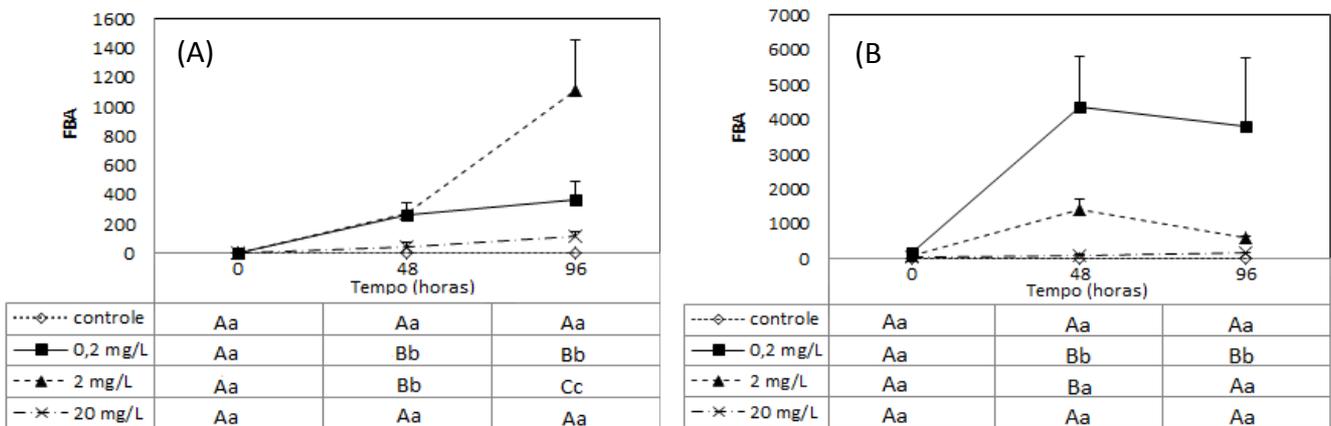
Tempo (horas)	Tratamento	Folha (%)	Raiz (%)
0	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	0	100
	2,0 mg.L-1	0,54	99,45
	20 mg.L-1	0,24	99,76
48	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	4,4	95,6
	2,0 mg.L-1	16,3	83,7
	20 mg.L-1	29,7	70,3
96	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	8,9	91,12
	2,0 mg.L-1	56,7	43,3
	20 mg.L-1	38,7	61,3

Anexo IV: Teor de As em indivíduos de *Eichhornia crassipes* (raiz + folha) - Média (n=36).

Tempo (horas)	Tratamento	Planta (mg.Kg <sup>-1</sup> )
0	controle	0 ± 0 Aa
	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	25,87 ± 8,29 Aa
	2,0 mg.L-1	187,2 ± 45,9 Aa
	20 mg.L-1	843,92 ± 77,66 Ab
48	controle	20,86 ± 4,57 Aa
	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	747,64 ± 152,70 Bb
	2,0 mg.L-1	3032,48 ± 291,67 Bc
	20 mg.L-1	2851,90 ± 104,14 Bc
96	controle	3,58 ± 3,30 Aa
	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	575,96 ± 166,39 Ba
	2,0 mg.L-1	2234,69 ± 545,84 Cb
	20 mg.L-1	4756,94 ± 525,81 Cc

Anexo V: Teor de As na solução nutritiva - Média (n=36) .

Tempo (horas)	Tratamento	Água (mg.L <sup>-1</sup> )
0	controle	0,01 ± 0,02 Aa
	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	0,15 ± 0,02 Aa
	2,0 mg.L-1	1,7 ± 0,11 Ab
	20 mg.L-1	14,17 ± 0,32 Ac
48	controle	0,07 ± 0,069 Aa
	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	0,13 ± 0,036 Aa
	2,0 mg.L-1	1,81 ± 0,11 Ab
	20 mg.L-1	17,65 ± 0,51 Bc
96	controle	0,08 ± 0,09 Aa
	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	0,12 ± 0,08 Aa
	2,0 mg.L-1	1,49 ± 0,08 Ab
	20 mg.L-1	15,52 ± 0,27 Cc



Anexo VI: Média do Fator de bioacumulação (FBA) em folhas (A) e raízes (B) de *Eichhornia crassipes* exposta a diferentes tempos e tratamentos de  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição. As barras representam o desvio padrão da média.

## CAPÍTULO 2

### Efeitos do Arsênio na Absorção de Nitrato e Fosfato por *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.

#### Resumo

Este estudo avaliou a influência do arsênio (As), adicionado na solução nutritiva sob a forma de arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ), na absorção de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) por *Eichhornia crassipes*.  $\text{AsO}_4^{3-}$  foi adicionado nas concentrações de 0,0; 0,2; 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  em uma única concentração sendo de, respectivamente, 0,95 e 3,0  $\text{mg.L}^{-1}$ . Amostras da solução nutritiva foram coletadas e analisadas ao longo de quatro dias de experimento. A concentração do metaloide e de ambos os nutrientes apresentaram valores decrescentes no primeiro dia, seguido por valores crescentes até o final do experimento, principalmente para o tratamento de 20  $\text{mg.L}^{-1}$ . Provavelmente isso ocorreu devido ao efluxo dos ânions para o meio, em razão das diferenças de concentração entre o meio intracelular e a solução ou por processos de dessorção. As afetou a absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  por *E. crassipes* nas concentrações de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ , o que pode estar relacionado a diminuição na sua taxa fotossintética líquida, observado no experimento do capítulo 1 realizado sob as mesmas condições. Aliado a isso,  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  são análogos químicos, competindo por absorção através do mesmo sítio ativo. O metaloide também pode inibir a aquisição de N por meio da inibição da atividade de enzimas chave na assimilação de  $\text{NO}_3^-$  pelas plantas. Os indivíduos expostos ao tratamento de 0,2  $\text{mg.L}^{-1}$  não tiveram redução na absorção de nutrientes, assim como mantiveram seus parâmetros ecofisiológicos semelhantes ao tratamento controle, observado no capítulo anterior, sugerindo que nessa concentração As não desencadeou efeitos tóxicos nas plantas. Este estudo sugere que a sinalização do estresse por As em plantas pode ocorrer por meio do seu impacto na homeostase de elementos essenciais.

Palavras-chave: Arsênio, fosfato, nitrato.

### Abstract

This study evaluated the influence of arsenic (As), added to the nutrient solution in the form of arsenate ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ), uptake of phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) by *Eichhornia crassipes*.  $\text{AsO}_4^{3-}$  was added at concentrations of 0,0; 0,2; 2,0 and 20 mg  $\text{L}^{-1}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{NO}_3^-$  in a single concentration being, respectively, 0,95 and 3,0 mg. $\text{L}^{-1}$ . Nutrient solution samples were collected and analyzed along four days of the experiment. The metalloid concentration and both nutrients presented decreasing values on the first day followed by increasing values until the end of the experiment, mostly for the treatment of 20 mg. $\text{L}^{-1}$ . Probably this happened due to efflux of anions to the medium, due to differences in concentration between the intracellularly and the solution or by desorption. As affected absorption  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{NO}_3^-$  by *E. crassipes* in concentrations of 2,0 and 20 mg. $\text{L}^{-1}$ , which may be related to a decrease in its net photosynthetic rate, observed in the experiment of chapter 1 performed under the same conditions. Allied to this,  $\text{AsO}_4^{3-}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  are chemical analogs, competing by absorption for the same active site. The metalloid may also inhibit the acquisition of N by inhibiting the activity of key enzymes in the assimilation  $\text{NO}_3^-$  by plants. Individuals exposed to treatment of 0.2 mg  $\text{L}^{-1}$  had no reduction in the absorption of nutrients, as well as maintained their ecophysiological parameters similar to the control treatment, observed in the previous chapter, suggesting that this concentration As did not cause toxic effects in plants. This study shows that stress signaling the As in plants can occur through their impact on the homeostasis of essential elements.

Keywords: Arsenic, phosphate, nitrate.

## 2.1 Introdução

As é um contaminante em potencial amplamente distribuído no ambiente, oriundo de fontes naturais e atividades antrópicas. Esse metaloide é não essencial para plantas, formando espécies inorgânicas consideradas fitotóxicas (Wang *et al.*, 2002). A espécie inorgânica arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) é predominante em ambientes aeróbicos e preferencialmente absorvida pelas plantas (Garg e Singla, 2011), enquanto o arsenito ( $\text{AsO}_2^{1-}$ ) é dominante sob condições anaeróbicas (Smith *et al.*, 1998). Quando o As não é destoxificado pela planta pode desencadear uma sequência de reações que levam a inibição do crescimento vegetal (Stoeva e Mineva, 2003), alteração dos parâmetros fisiológicos (Nascimento, 2007) e estimulação do metabolismo secundário (Garg e Singla, 2011). As plantas respondem a toxicidade a As por uma variedade de mecanismos, incluindo hiperacumulação (Ma *et al.*, 2001), sistema de defesa antioxidante (Garg e Singla, 2011) e produção de fitoquelatinas (Schmöger *et al.*, 2000).

Estruturalmente reconhecido como análogo químico do  $\text{PO}_4^{3-}$ , o  $\text{AsO}_4^{3-}$  utiliza por meio da membrana plasmática as mesmas vias de entrada nas células vegetais (Irtelli e Navari-Izzo, 2008; Pickering *et al.*, 2000) provocando, em algum grau, uma alteração na absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  devido à supressão do sistema de transporte  $\text{PO}_4^{3-}/\text{AsO}_4^{3-}$  de alta afinidade (Smith *et al.*, 2010). O fósforo (P) é um nutriente essencial para as plantas e um importante componente do metabolismo celular, possuindo papel fundamental na transferência de energia e regulação metabólica, além de ser um constituinte estrutural de várias biomoléculas (Duff *et al.*, 1994).

A competição intracelular  $\text{PO}_4^{3-}/\text{AsO}_4^{3-}$  pelos mesmos sítios de ligação perturba o metabolismo vegetal, comprometendo a produção de metabólitos intermediários da respiração e fotossíntese, alterando as membranas e danificando as moléculas de ATP, DNA e RNA (Taiz e Zeiger, 1991). Ao substituir o  $\text{PO}_4^{3-}$  na molécula de ATP, o  $\text{AsO}_4^{3-}$  (ADP-As) perturba fortemente o fluxo energético da célula (Meharg, 1994).

A primeira evidência da competição entre  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  em plantas foi reportado por Asher e Reay (1979). Os autores reportaram que o  $\text{PO}_4^{3-}$  foi o potencial inibidor na absorção de  $\text{AsO}_4^{3-}$  em mudas de cevada. Desde então, vários estudos têm corroborado a importância da competição entre os ânions em *Oryza*

*sativa* (Wang e Duan, 2009), *Pteris vittata* (Santos *et al.*, 2008), *Salvinia natans* (Rahman *et al.*, 2008), *Glycine max* (Milivojevic *et al.*, 2006), *Azolla caroliniana*, *Salvinia mínima* e *Lemna gibba* (Guimarães *et al.*, 2012) e *Eichhornia crassipes* (Low e Lee, 1990).

Apesar do  $\text{AsO}_4^{3-}$  ser a espécie química dominante em ambientes aeróbicos, processos químicos e biológicos que ocorrem na rizosfera podem influenciar a especiação de As, bem como seu mecanismo de absorção pelas plantas. Isso ocorre devido à elevada atividade de microrganismos anaeróbicos nesse ambiente, com elevado consumo de oxigênio, levando a redução de  $\text{AsO}_4^{3-}$  a  $\text{AsO}_2^{1-}$  (Zhao *et al.*, 2009).  $\text{AsO}_2^{1-}$  é absorvido pelas plantas por meio de canais de aquaporinas/aquagliceroporinas (Bienert *et al.*, 2007). Segundo Ma *et al.* (2008),  $\text{AsO}_2^{1-}$  é absorvido pelas células das raízes de arroz por proteínas intrínsecas do tipo nodulin26 (PINs), um subgrupo de aquaporinas, mas funcionalmente equivalente ao grupo das aquagliceroporinas, podendo absorver moléculas neutras, como água, glicerol e ureia.

A toxicidade do  $\text{AsO}_2^{1-}$  está relacionada à sua elevada afinidade com grupos sulfidrilas de enzimas e proteínas, como a glutatona (GSH) e fitoquelatinas (PCs), o que altera a estrutura das proteínas ou interfere nos sítios catalíticos das enzimas, levando a inibição da função celular (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). Ainda segundo estes autores, na célula vegetal o  $\text{AsO}_4^{3-}$  pode ser reduzido a  $\text{AsO}_2^{1-}$  por meio de processos enzimáticos (arsenato redutase) ou não enzimáticos (glutatona) sendo o  $\text{AsO}_2^{1-}$  complexado com tióis, principalmente PCs (Pickering *et al.*, 2000). É provável que o complexo As-PC seja sequestrado em vacúolos da raiz, onde o pH ácido (~5.5) é adequado para a estabilidade do complexo, sendo esse considerado um possível mecanismo de detoxificação de As (Zhao *et al.*, 2009). A figura 2.1 ilustra os mecanismos de absorção de  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{AsO}_2^{1-}$ , bem como sua especiação intracelular.

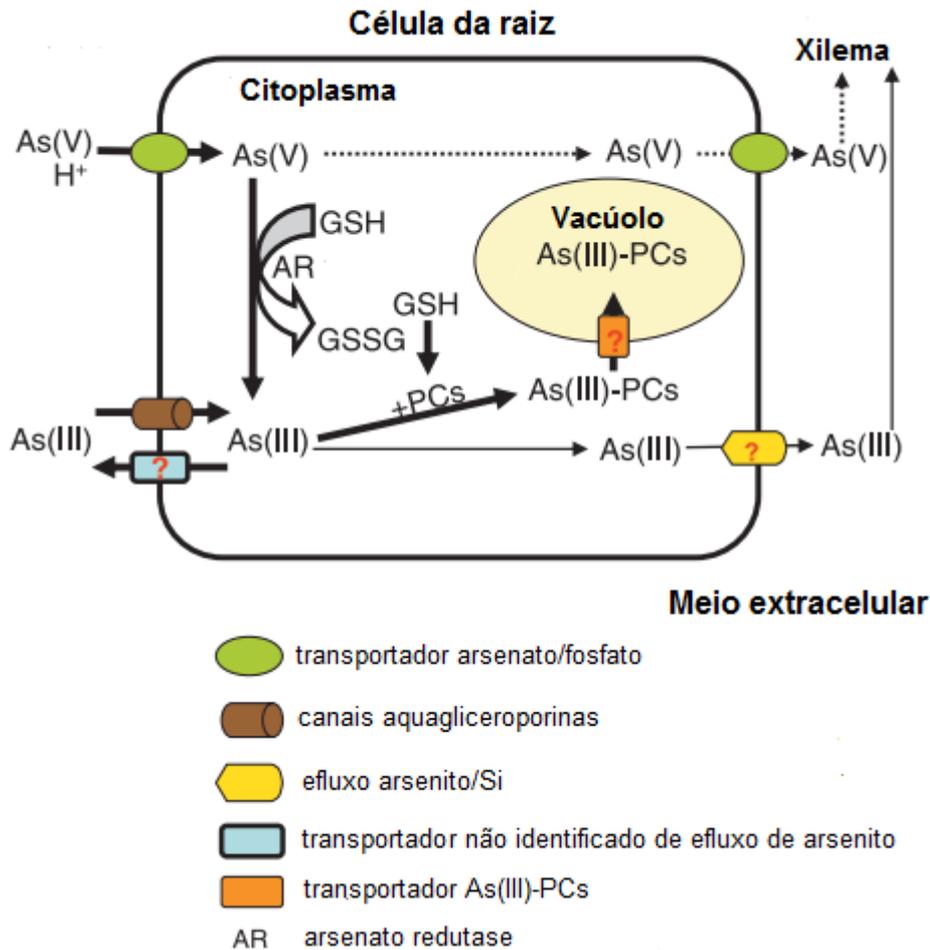


Figura 2.1: Absorção de arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) e arsenito ( $\text{AsO}_2^{1-}$ ) e o metabolismo em raízes de plantas. A espessura da linha refere-se a taxa de fluxo, com a linha tracejada indicando a taxa mais lenta. Pontos de interrogação indicam lacunas no conhecimento. GSH: glutatona; GSSG: glutatona oxidada; PC: fitoquelatinas.

Fonte: Zhao *et al.*, (2009). Adaptado pelo autor (2013).

$\text{AsO}_2^{1-}$  também pode influenciar a assimilação de nutrientes essenciais para as plantas, como a absorção de  $\text{NO}_3^-$ . O nitrogênio (N) participa da constituição de moléculas de proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, citocromos e clorofila, além de ser um dos nutrientes mais relevantes para o aumento da produção vegetal (Ferreira *et al.*, 2001). O N é absorvido pelas plantas na forma de  $\text{NO}_3^-$  e, uma vez no ambiente intracelular, passa por processos de redução para ser assimilado pela célula. O  $\text{NO}_3^-$  é primeiramente reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pela ação da enzima nitrato redutase (NR) e, posteriormente no cloroplasto, o  $\text{NO}_2^-$  é reduzido a amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) pela nitrito redutase (NiR) (Beevers e Hageman, 1969). A assimilação do  $\text{NH}_4^+$  é

mediada por duas enzimas chaves, a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) (Melo *et al.* 2003) (Fig. 2.2).

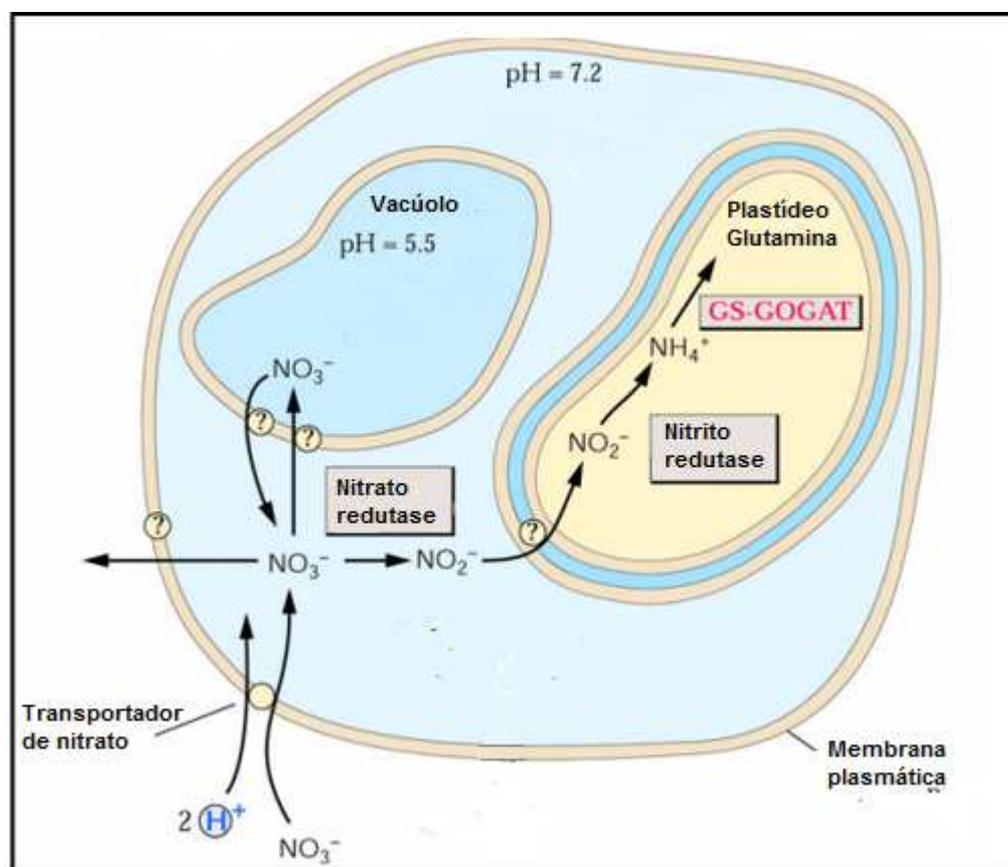


Figura 2.2: Absorção e assimilação de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) na célula vegetal.  
 Fonte: [http://www.dbi.ufla.br/Ledson/MPS/MPS2011/MAM/fig16\\_34.png](http://www.dbi.ufla.br/Ledson/MPS/MPS2011/MAM/fig16_34.png).  
 Acessado em: 27 de maio de 2013.

Jha e Dubey (2004) observaram que o aumento no teor de  $\text{AsO}_2^{1-}$  no meio levou a um declínio na atividade das enzimas responsáveis pela assimilação de N, NR, NiR e GS em plantas de arroz. Os resultados desse estudo sugeriram que a inibição da atividade das enzimas, seguida pela diminuição da afinidade das mesmas por seus substratos, levou a supressão da assimilação de N e prejudicou o crescimento de plantas de arroz.  $\text{AsO}_4^{3-}$  também reduz a atividade das enzimas NR e NiR, como observado no estudo realizado por Singh e colaboradores (2009) com *Pteris vittata* e *Pteris ensiformis*, que também foi acompanhado pela redução no teor de  $\text{NO}_3^-$  do tecido vegetal.

Neste contexto, aguapé (*Eichhornia crassipes*) tem demonstrado ser um bom modelo para estudo, possuindo características que favorecem a absorção de

elementos traço e nutrientes, como sua elevada produção de biomassa, rápida propagação, uma vez que sua reprodução pode ser vegetativa, e sistema radicular fasciculado (Ebel *et al.*, 2007). Além disso, é bem documentado na literatura a sua capacidade de absorção de As (Giri e Patel, 2012; Pereira *et al.*, 2011; Misbahuddin; Fariduddin, 2002), porém são escassos os estudos que relacionam a influência do As na absorção de nutrientes essenciais por esta espécie.

## 2.2 Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do As na absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  por *E. crassipes* por meio de medidas realizadas na solução nutritiva na qual as plantas foram acondicionadas.

## 2.3 Hipótese

Visto que diferentes espécies químicas de As podem prejudicar o metabolismo vegetal, comprometer a assimilação de nutrientes ou competir diretamente pela absorção/adsorção de nutrientes essenciais espera-se que a absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  por *E. crassipes* diminua ao longo do experimento nas diferentes concentrações de  $\text{AsO}_4^{3-}$  utilizadas.

## 2.4 Material e Métodos

### 2.4.1. Coleta das amostras

Espécimes de *Eichhornia crassipes* foram coletadas na Lagoa do Campelo (Fig. 2.3A), localizada a  $21^\circ39'01''\text{S}$  e  $41^\circ11'\text{W}$ , entre os municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco de Itabapoana, RJ. Foram selecionados os indivíduos que aparentavam ser jovens e saudáveis e que não possuíam estolões. Logo após a coleta, as plantas foram acondicionadas em recipientes plásticos com água da lagoa (Fig. 2.3B) e levadas para o Laboratório de Ciências Ambientais (Centro de Biociências e Biotecnologia – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro). No laboratório as amostras foram lavadas com água corrente para retirada da epifauna e do material adsorvido e pesadas (Fig. 2.3C e D). O tamanho da raiz foi padronizado em 10 cm.

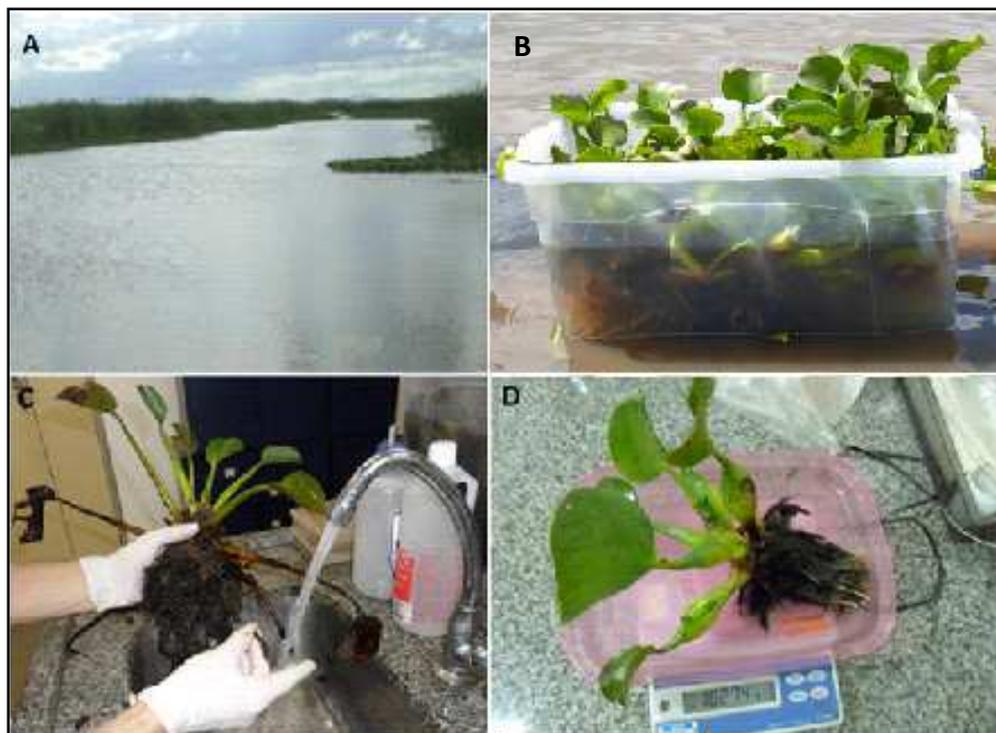


Figura 2.3: Coleta e preparo das amostras: Lagoa do Campelo (A); *Eichhornia crassipes* acondicionada em recipientes plásticos (B); Triagem (C); Pesagem (D).

#### 2.4.2 Desenho Experimental

Após a triagem os indivíduos foram levados para casa de vegetação, onde foram acondicionados em recipientes com 8L de solução nutritiva contendo micronutrientes segundo Hoagland e Arnon (1950) (Tab. 2.1) e macronutrientes segundo Smart e Barko (1985) (Tab. 2.2). O  $\text{PO}_4^{3-}$  e o  $\text{NO}_3^-$  foram adicionados nas concentrações de, respectivamente, 0,95 e 3,0  $\text{mg.L}^{-1}$ . As soluções de Fe + EDTA foram preparadas separadamente (Tab. 2.2). O As foi adicionado na forma de arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) diluído em meio ácido (HCl - 0,5M) a partir da solução padrão Tritisol, Merck, após 5 dias de aclimação da macrófita. Anteriormente a adição do  $\text{AsO}_4^{3-}$  a solução nutritiva foi renovada. As concentrações de As adicionadas foram 0,2; 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ , sempre mantendo o controle e em duplicata, totalizando 8 indivíduos (Fig. 2.4) que foram expostos durante 4 dias (96 horas) ao  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Paralelamente, mantiveram-se dois conjuntos de três recipientes com as respectivas concentrações experimentais de As na ausência da planta, de forma a avaliar o percentual de adsorção ocasionado pelo recipiente. As concentrações de As

estiveram abaixo de  $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , que equivale ao limite de detecção do equipamento.

Tabela 2.1: Reagentes, seus respectivos pesos e diluições utilizados para a preparação da solução estoque de micronutrientes.

Solução Estoque	Reagentes	PM	Massa (mg)	Volume de solução (mL)	Volume adicionado em 20 L (mL)	Concentração adicionada ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
micronutrientes	$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	187	1190,5			17,00
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	319	160,93			2,20
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	281	52,4	100*	285,7**	0,74
	$\text{H}_3\text{BO}_4$	78	1972,48			28,17
	$\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1146	121,11			1,73

\*20mL de cada solução foram colocados em um balão de 2L e completado com água Milli-Q até atingir o volume final.

\*\* Volume retirado de 2L da solução final.

Tabela 2.2: Reagentes, seus respectivos pesos e diluições utilizados para a preparação da solução estoque de macronutrientes e Fe + EDTA.

Solução Estoque	Reagentes	PM	Massa (mg)	Volume de solução (mL)	Volume adicionado em 20 L (mL)	Concentração adicionada ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
macronutrientes	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	80	161	1000	200	4,00
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136,1	136,1	1000	80	1,36
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	146	9170	100	20	9,17
	$\text{KHCO}_3$	100	7700	500	20	7,70
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278	34000	500	20	34,00
	$\text{NaHCO}_3$	84	29200	500	20	29,20
Fe + EDTA	EDTA	186,12	11910	400*	20**	11,91
	$\text{FeCl}_3$	161	5190	400*	20**	5,19

\*400mL de cada solução foram colocados em um balão de 1L e completado com água Milli-Q até atingir o volume final.

\*\*Volume retirado de 1L da solução final.



Figura 2.4: Experimento conduzido em casa de vegetação.

### 2.4.3 Monitoramento da solução nutritiva

O pH, condutividade elétrica e  $O_2$  dissolvido da solução nutritiva foram monitorados durante todo o experimento, entre 8h00 e 12h00, em dias alternados, utilizando-se três potenciômetros da marca WTW: pH 3110, condutividade 3110 e  $O_2$  dissolvido 3110.

### 2.4.4 Dinâmica de coleta da solução nutritiva

Para a análise do As,  $PO_4^{3-}$  e  $NO_3^-$  alíquotas da solução nutritiva começaram a ser coletadas imediatamente após a adição do  $AsO_4^{3-}$  (8h00). Foram realizadas retiradas de minuto a minuto nos primeiros cinco minutos e depois de cinco em cinco minutos até completar a primeira hora de experimento. Na segunda hora a retirada foi realizada de dez em dez minutos e a partir da terceira hora as amostras foram coletadas de meia em meia hora até a quinta hora. Após 4 horas foi retirada as amostras da nona hora, com o mesmo procedimento sendo realizado para coletar as amostras da décima terceira hora, finalizando o primeiro dia de coleta, às 21:00 horas. Após 12 horas foi realizada a coleta do segundo dia (25 horas) e as coletas do terceiro (49 horas) e quarto dia (73 horas) foram realizados após vinte quatro horas da coleta anterior (Tab. 2.3).

Tabela 2.3: Dinâmica da coleta de amostras da solução nutritiva para análise do teor de As,  $PO_4^{3-}$ ,  $NO_3^-$ .

Tempo (dias)	Estratégia Experimental			
	Período experimental	Unidade temporal da retirada	Nº de retiradas	Horário de coleta
1º	0	0	1	8h
	5'	1'	5	8h05
	55'	5'	11	9h
	2h	10'	6	10h
	3h	30'	2	11h
	4h	30'	2	12h
	5h	30'	2	13h
	9h	4h	1	17h
	13h	4h	1	21h
2º	25h	12h	1	9h
3º	49h	24h	1	9h
4º	73h	24h	1	9h

#### 2.4.5 Determinação do As, $\text{PO}_4^{3-}$ e $\text{NO}_3^-$

Alíquotas de 20 mL da solução nutritiva foram coletadas em duplicada e armazenadas em tubo de ensaio com dedo frio para determinação do As. A digestão foi conduzida em bloco digestor por 3 horas a temperatura de 80°C, após adição de 6 mL de HCl 37% (Merck). Após a digestão, as amostras foram filtradas em provetas com auxílio de funil e papéis de filtro quantitativo (Framex). A determinação do As foi realizada por meio de Espectrofotometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES), utilizando-se o equipamento Varian Liberty Series II. O limite de detecção para As foi de 0,05  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

Alíquotas de 50mL (em duplicata) da solução nutritiva foram filtradas em acetato de celulose com porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$  para a determinação de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  dissolvidos. A determinação foi realizada no Cromatógrafo de íons (Metrhon 844).

## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Teor de As, $\text{PO}_4^{3-}$ e $\text{NO}_4^{3-}$ na solução nutritiva

Não houve diferença significativa na variação do teor de As para os tratamentos controle, 0,2  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  e 2,0  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  ao longo do experimento (Fig. 2.6A). O teor do metaloide na solução nutritiva, quando adicionado a 0,2  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ , teve valor máximo de 0,14  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  no primeiro dia de experimento (tempo 0), sendo completamente absorvido pela planta 25 horas após sua adição. Em relação ao tratamento de 2,0  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  a maior concentração (1,2  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ ) foi observada no tempo 0 e a menor (0,7  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ ) a partir de 13 horas de experimento. Variação significativa no teor de As foi observada no tratamento de 20  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ , principalmente no final do experimento. Concentração elevada de As (13,45  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ ) foi observada no tempo 0, com diminuição significativa (10,51  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ ) de 9 horas após sua adição. A partir de 13 horas o teor de As no tratamento de 20  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  aumentou novamente, e se manteve até o final do experimento.

A maior concentração de  $\text{PO}_4^{3-}$  na solução nutritiva foi no tratamento de 20  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  de  $\text{AsO}_4^{3-}$ , variando entre 0,26  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  (tempo 0) e 0,72  $\text{mg}.\text{L}^{-1}$  (73 horas de experimento) (Fig. 2.6B). Diferenças significativas no teor de  $\text{PO}_4^{3-}$ , nesse tratamento foram observadas a partir de 3 horas de experimento. As plantas

absorveram totalmente o  $\text{PO}_4^{3-}$  da solução nutritiva nos tratamentos controle e de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  a partir de, respectivamente, 3 e 13 horas de experimento. Em geral, o teor de  $\text{PO}_4^{3-}$  no tratamento de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  diminuiu (exceto para os tempos de 49 e 73 horas), sendo o menor valor ( $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ ) encontrado em 25 horas de experimento.

A concentração do  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva foi menor nos tratamentos controle e de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  (Fig. 2.6C), com queda acentuada deste nutriente 13 horas após a adição do  $\text{AsO}_4^{3-}$  para ambos os tratamentos sendo de, respectivamente,  $0,2$  e  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , mas sem diferença significativa em relação aos outros tempos. Os tratamentos de  $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  apresentaram, em geral, pouca variação no teor de  $\text{NO}_3^-$  até 13 horas de experimento, a partir da qual foi observado um aumento acentuado no teor desse nutriente na solução nutritiva, sendo o maior valor para ambos os tratamentos ( $0,62 \text{ mg.L}^{-1}$ ) observado em 73 horas de experimento. Vale ressaltar que a diferença significativa entre os tratamentos no mesmo tempo de exposição foi observada somente em 73 horas, entre os tratamentos de  $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  e os tratamentos controle e  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ .

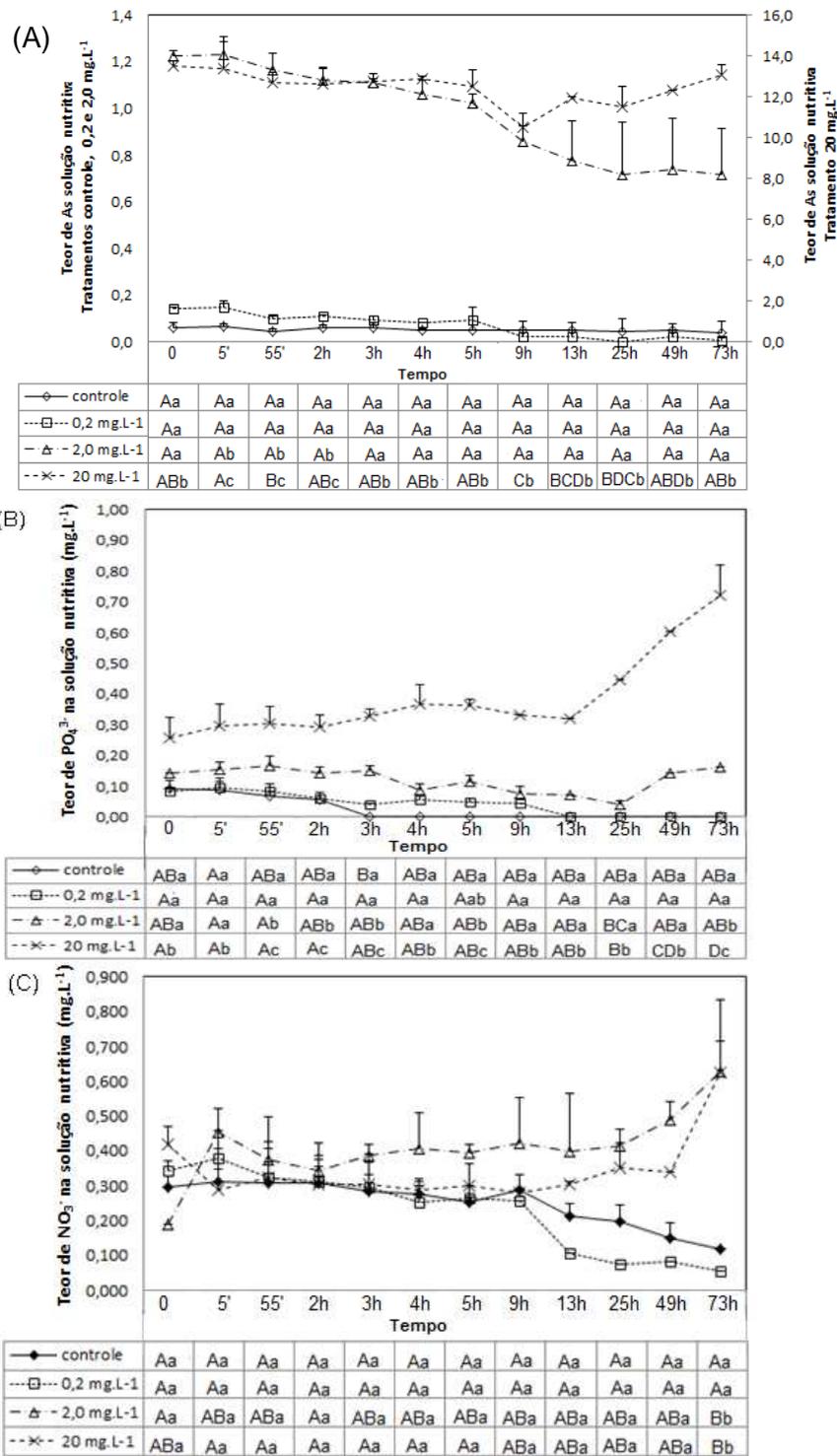


Figura 2.5: Média do teor de As (A),  $PO_4^{3-}$  (B) e  $NO_3^-$  (C) na solução nutritiva ao longo do experimento. No gráfico A eixo secundário para o tratamento de  $20\text{ mg.L}^{-1}$ . Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição. As barras representam o desvio padrão da média.

## 2.5.2 Parâmetros Físico-químicos

A figura 2.5 mostra a variação nos parâmetros físico-químicos medidos na solução nutritiva durante a aclimação e o experimento. O  $\text{AsO}_4^{3-}$  foi adicionado no final da aclimação (96 horas), porém, os parâmetros físico-químicos neste dia foram medidos antes da adição, exceto para o pH, que foi medido antes e depois a fim de ser mantido na faixa de variação na qual *E. crassipes* se desenvolve em condições naturais (6,5 – 7,5) (Lage-Pinto, 2008). Em função da acidez do sistema após a adição do  $\text{AsO}_4^{3-}$  o pH foi ajustado entre 7,0 e 7,2 por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH).

Em geral, observou-se queda nos valores de pH durante a aclimação (Fig. 2.5A). Após adição do  $\text{AsO}_4^{3-}$  os valores de pH continuaram diminuindo para todos os tratamentos (Fig. 2.5B), sendo o menor valor (6,72) encontrado no tratamento de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> e no tempo de 96 horas e o maior valor (7,08) no tratamento controle, no tempo de 48 horas, durante o experimento. Não foi observada diferença estatística nos valores de pH entre tratamentos e tempos ao longo do experimento.

Em geral, os tratamentos não apresentaram um padrão na variação do O<sub>2</sub> dissolvido durante a aclimação (Fig. 2.5C). Após a adição do metaloide observou-se queda do O<sub>2</sub> dissolvido em todos os tratamentos até o final do experimento (Fig. 2.5D). O menor valor durante o experimento foi observado em 96 horas, para o tratamento de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> (3,87 mg.L<sup>-1</sup>) e o maior valor foi observado no tratamento de 20 mg.L<sup>-1</sup> (4,47mg.L<sup>-1</sup>), em 48 horas. Não foi observada diferença estatística entre tratamentos e tempos ao longo do experimento.

Os valores de condutividade elétrica aumentaram durante a aclimação, mas sem diferença significativa entre tratamentos e tempos (Fig. 2.5E). Após a adição do  $\text{AsO}_4^{3-}$  observou-se aumento no valor da condutividade elétrica para os tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup>, que se mantiveram até o final do experimento (Fig. 2.5F). Diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos de 2,0 e 20 mg.L<sup>-1</sup>, assim como entre estes tratamentos e os tratamentos controle e de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> em 48 e 96 horas. O menor e maior valor encontrado durante o experimento foi em 96 horas sendo de, respectivamente, 341  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  para o tratamento controle e 1691  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  para o tratamento de 20 mg.L<sup>-1</sup>.

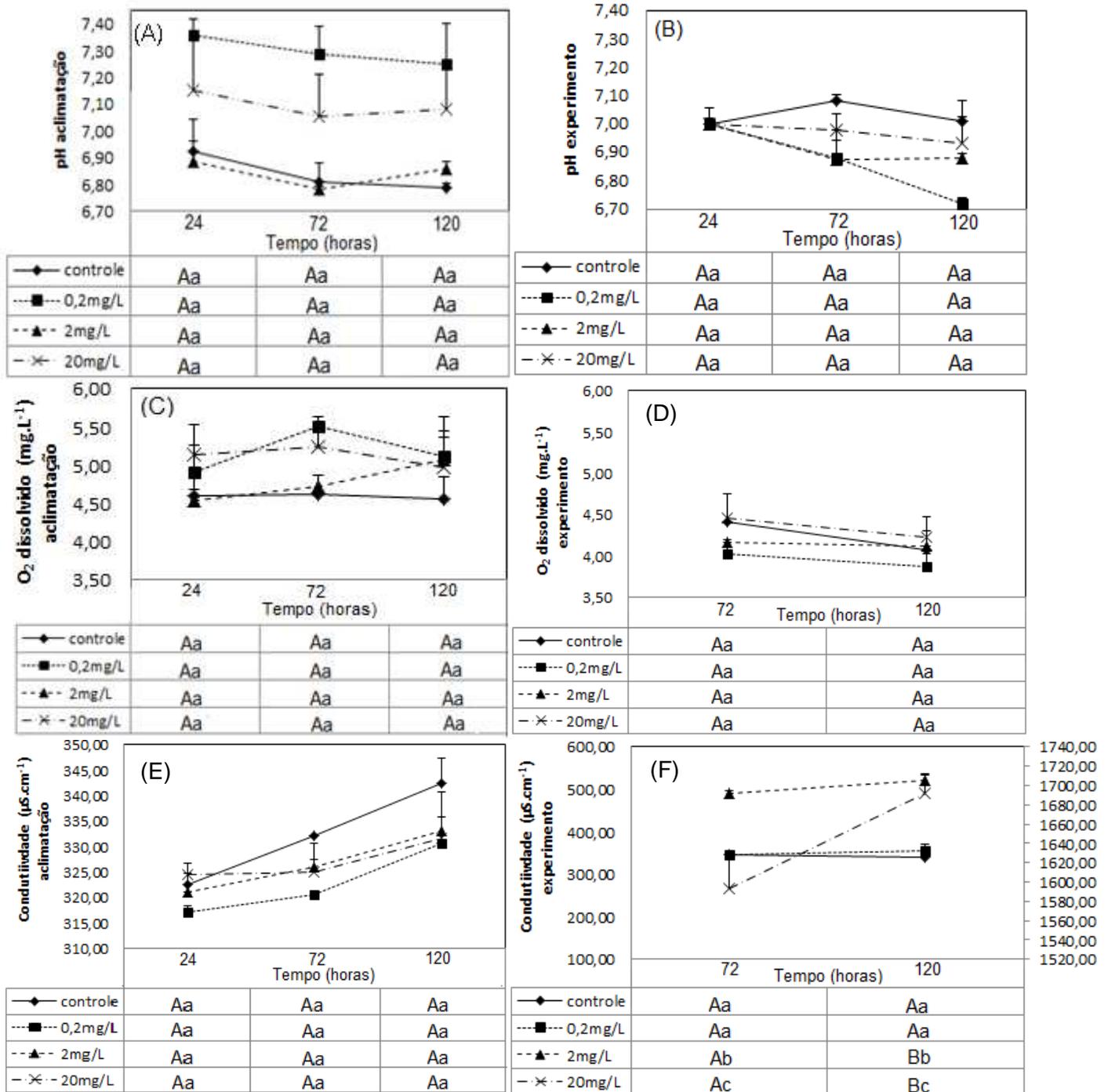


Figura 2.6: Média dos valores de pH (A e B), O<sub>2</sub> dissolvido (C e D) e condutividade elétrica (E e F) monitorados durante a aclimatação e o experimento. No gráfico F eixo secundário para o tratamento de 20 mg.L<sup>-1</sup>. Letras maiúsculas denotam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição enquanto as letras minúsculas diferenciam os tratamentos no mesmo tempo de exposição. As barras representam o desvio padrão da média.

## 2.6 Discussão

Em geral, os valores crescentes de As,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  observados na solução nutritiva para os tratamentos de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$  podem ter ocorrido via efluxo de ânions pela célula vegetal. A absorção de As pelas raízes seguida pela sua perda via efluxo para o meio externo é relatado por Xu e colaboradores (2007), o que também ocorre com  $\text{PO}_4^{3-}$  (especialmente sob elevadas concentrações no meio como relatado por Mimura, 1999) e  $\text{NO}_3^-$  (Crawford e Glass, 1998).

Microrganismos foram os modelos experimentais pioneiros em estudos sobre os mecanismos de efluxo de As pela célula (Wysocki *et al.*, 1997). Evidências mostram que a redução intracelular de  $\text{AsO}_4^{3-}$ , seguida pelo efluxo de  $\text{AsO}_2^{1-}$ , é uma via comum em microrganismos, sendo um importante mecanismo de detoxificação de As (Bhattacharjee e Rosen, 2007). Yang e colaboradores (2005) mostraram que bactérias utilizam canais de proteínas para liberação de  $\text{AsO}_2^{1-}$  para o meio, ao invés de bombas de ATP, o que é energeticamente mais eficiente. Além disso, na presença de  $\text{AsO}_4^{3-}$ , que prejudica a síntese de ATP, um canal seria um mecanismo mais robusto, pois funciona independente do APT, sendo conduzido por um gradiente de concentração (Bienert *et al.*, 2007). Por outro lado, Silver e Phung (2005) demonstraram que o efluxo de  $\text{AsO}_2^{1-}$  em *Escherichia coli* ocorre com gasto de energia, sendo mediado por uma ATPase.

Os mecanismos de efluxo de As em plantas ainda precisam ser mais bem elucidados (Zhao *et al.*, 2009). O efluxo de  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{AsO}_2^{1-}$  foi reportado pela primeira vez por Xu e colaboradores (2007). Nesse estudo, diferentes mecanismos para a extrusão destas duas espécies químicas de As foram observados. O efluxo de  $\text{AsO}_4^{3-}$  por raízes de tomate foi maior em plantas tratadas com -P em comparação as plantas tratadas com +P. É provável que isso tenha ocorrido, pois, na ausência de P plantas absorvem mais  $\text{AsO}_4^{3-}$ , sugerindo que o efluxo de As é ligado a um gradiente de concentração por meio da membrana plasmática, sendo um mecanismos passivo. Tal fato foi reiterado pelo efluxo de  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{AsO}_2^{1-}$  em raízes de tomate carregados com  $\text{AsO}_4^{3-}$  e transferidas para o meio livre de As.

Em relação ao efluxo de  $\text{AsO}_2^{1-}$ , a presença de carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), um inibidor da fosforilação oxidativa que provoca a dissipação da força motora de prótons por meio da membrana, inibiu significativamente o efluxo

dessa espécie química pelas raízes de tomate, ao contrário do observado para o  $\text{AsO}_4^{3-}$ , indicando que o efluxo de  $\text{AsO}_2^{1-}$  é um processo ativo, dependente de energia. Efluxo de As tem sido reportado por outras espécies de plantas, incluindo *Azolla caroliniana* e *Azolla filiculoides* (Zhang *et al.*, 2008) e *Zea mays* (Abbas e Meharg, 2008).

Influxo e efluxo de  $\text{PO}_4^{3-}$  são mecanismos essenciais para manutenção da homeostase desse nutriente em plantas (Raghothama, 2000). Segundo este mesmo autor o efluxo ocorre por meio de canais de ânions sob condições não limitantes de  $\text{PO}_4^{3-}$ , mas a ATPase também pode fornecer energia para conduzir esse transporte. Em plantas de trigo o efluxo de  $\text{PO}_4^{3-}$  quase neutralizou sua absorção (Cogliatti e Santa Maria, 1990), sendo postulado que em concentrações não limitantes a absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  é controlada principalmente pela sua extrusão. No estudo realizado por Schjorring e Jensén (1984) o efluxo em leveduras com elevado teor de P foi considerado um mecanismo para combater concentrações tóxicas deste nutriente.

Segundo Crawford e Glass (1998) o efluxo de  $\text{NO}_3^-$  pelas plantas é um processo passivo, e sua taxa é diretamente proporcional ao aumento externo desse nutriente. Macduff e Jackson (1992) realizaram experimentos para comparar o efluxo de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em azévem (gramínea) e trevo branco em plantas controle e submetidas a estresse (exposição prolongada ao escuro e desfolhação). Foi observado que o efluxo de  $\text{NO}_3^-$ , ao contrário do efluxo de  $\text{NH}_4^+$ , aumentou significativamente em ambas as espécies quando submetidas ao estresse. É provável que isso tenha ocorrido pois o N está estritamente relacionado ao processo fotossintético, uma vez que está presente na constituição das moléculas de clorofila, essenciais a todo processo de transformação de energia luminosa em química (Lemos *et al.*, 2008).

Segundo Carelli e colaboradores (1990) a assimilação do  $\text{NO}_3^-$  é dependente da atividade fotossintética das plantas uma vez que, na presença de luz, a principal fonte de elétrons para a redução desse ânion são as reações fotoquímicas que ocorrem nos cloroplastos. O poder redutor (NADH) produzido nos cloroplastos pode ser transferido para o citoplasma, onde está localizada a enzima nitrato redutase, disponibilizando energia para os processos de redução e assimilação desse

nutriente. No estudo realizado por Meneguelli-Souza e colaboradores (dados não publicados) sob as mesmas condições do presente experimento é observado comprometimento dos processos fotoquímicos de *E. crassipes* através da diminuição das razões  $F_v/F_m$  e  $F_v/F_0$ , o que implica na redução da assimilação e absorção de  $\text{NO}_3^-$  pela planta.

No presente estudo, caso o efluxo tenha sido o mecanismo responsável pelo aumento das concentrações de  $\text{As}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva é possível que ele tenha sido mediado por canais aquaporinas por meio da difusão, que ocorre quando a concentração intracelular de íons excede a do meio externo. Estudo realizado por Meneguelli-Souza *et al.* (dados não publicados) sob as mesmas condições experimentais do presente estudo, mostrou comprometimento das funções fisiológicas de *E. crassipes* quando submetida aos tratamentos de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ , o que possibilita inferir que a planta não teria condições para realizar o efluxo de íons por meio de um processo dependente de ATP. Além disso, elementos traço em geral produzem radicais livres de oxigênio (EROs) que atacam principalmente as membranas plasmáticas (Palma *et al.*, 2002). É possível que o aumento da concentração e do tempo de exposição ao metaloide tenha levado a produção de EROs, que alteraram a permeabilidade da membrana plasmática, comprometendo a absorção de nutrientes pelas plantas e/ou facilitando a difusão dos íons para o meio.

A adsorção físico-química é um mecanismo alternativo para acumulação desses íons em plantas, sendo um processo inicialmente rápido e reversível (Giri e Patel, 2012). É bem reportado que óxidos de Fe (placas de Fe) na superfície das raízes adsorvem  $\text{AsO}_4^{3-}$  (Robinson *et al.*, 2006; Garnier *et al.*, 2010) e  $\text{PO}_4^{3-}$  (Liu *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2008). Em um estudo com plantas de arroz foi observado que a adsorção de  $\text{AsO}_4^{3-}$  em placas de ferro foi maior em plantas com -P em relação as plantas com +P (Liu *et al.*, 2004). Hossain e colaboradores (2009) estudando o efeito sinérgico e/ou antagônico de  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  em plantas de arroz observaram que a adição de  $\text{Fe}^{2+}$  no meio reduziu o efeito tóxico do metaloide nas plantas, bem como aumentou a produção dos grãos. O efeito da aplicação do  $\text{PO}_4^{3-}$  foi oposto, resultando em elevado teor de  $\text{AsO}_4^{3-}$  nas plantas. Ambos os estudos indicam que há competição por adsorção na placa de Fe entre  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ .

São escassos os dados sobre a adsorção de  $\text{NO}_3^-$  na superfície de plantas. Fried e colaboradores (1965) sugeriram a adsorção desse nutriente em raízes de arroz. Caso o  $\text{NO}_3^-$  tenha sido de fato adsorvido, é provável que tenha sido nos resquícios de sedimento nas raízes. Brix (1987) estudando a eficiência da rizosfera de plantas de zonas úmidas no tratamento de águas residuais observou que a remoção de N foi, principalmente, devido à adsorção em partículas do sedimento.

O processo inverso da adsorção é a dessorção, sendo determinado pelas propriedades do adsorvente e do adsorbato (soluto). Vários fatores são relevantes no processo de adsorção – dessorção, como a estrutura do soluto, pH, temperatura e o grau de agitação do meio (Ziulli e Jardim, 1998). A dessorção de  $\text{NO}_3^-$  ocorre principalmente em pH neutro (Li, 2003) enquanto a dessorção de As e  $\text{PO}_4^{3-}$  são maiores em pH ácido (Impellitteri, 2005; Barrow, 1984). Caso tenha ocorrido a dessorção dos ânions no presente estudo, é possível que ela tenha sido maior para  $\text{NO}_3^-$  devido ao pH do meio, que se manteve próximo a 7,0.

Dessorção de  $\text{AsO}_4^{3-}$  em placas de Fe de raízes de arroz foi observada com o aumento de  $\text{PO}_4^{3-}$  na solução (Hossain e colaboradores 2009). Apesar do aumento de  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  na solução nutritiva ocorrerem ao mesmo tempo no presente estudo, a concentração do metaloide foi maior, sugerindo que o  $\text{PO}_4^{3-}$  foi preferencialmente adsorvido pelos óxidos de Fe na superfície das plantas, caso esse processo tenha ocorrido. Segundo Lambkin e Alloway (2003) ânions de  $\text{PO}_4^{3-}$  são menores que ânions de  $\text{AsO}_4^{3-}$  e têm uma carga mais elevada, possibilitando ao  $\text{PO}_4^{3-}$  se ligar mais fortemente a óxidos.

Comparando a concentração de As,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  foi observado que nas concentrações de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{AsO}_4^{3-}$  houve aumento no teor de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva, sugerindo que o metaloide influenciou a absorção desses nutrientes. No estudo realizado sob as mesmas condições ambientais, abordado no capítulo anterior, observou-se redução na transpiração das plantas expostas aos tratamentos de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ , indicando comprometimento na absorção de água e íons pelo sistema radicular na presença do metaloide. Aliado a isso, é reportado na literatura a relação antagônica entre a absorção de  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  em diferentes espécies de plantas (Liu *et al*, 2004; Rosa *et al*, 2006; Tu *et al.*, 2004), uma vez que são análogos químicos.

Wang e Duan (2009) observaram que plantas de arroz tratadas com solução deficiente em P acumularam mais As em relação àquelas tratadas com elevado teor de P em solução. Tu e colaboradores (2004) sugerem que P desempenha um papel chave na desintoxicação de As em *Pteris vittata*, uma vez que a adição de P na solução reduziu a concentração de  $\text{AsO}_4^{3-}$  nas raízes da planta.  $\text{AsO}_2^{1-}$  também pode influenciar a aquisição de  $\text{PO}_4^{3-}$  por plantas. Plantas de arroz expostas a  $\text{AsO}_2^{1-}$  reduziram seus estoques de fosfato e alteraram a atividade de enzimas fosfohidrolíticas (Mishra e Dubey, 2007). Nesse mesmo estudo foi sugerido que a diminuição na concentração de  $\text{PO}_4^{3-}$  está relacionada à redução na atividade de fosfatases, uma vez que enzimas fosfohidrolíticas regulam o fornecimento de fósforo inorgânico para várias partes de crescimento das plantas. Segundo Tripathi e colaboradores (2007) a toxicidade de  $\text{AsO}_2^{1-}$  em células de planta pode ser devido a sua ligação a grupos sulfidrilas de proteínas/enzimas, afetando sua atividade.

Na literatura há relatos que elementos traço, quando presentes no solo, reduzem a absorção de N pelas plantas e a atividade das enzimas assimiladoras desse elemento (Dubey e Pessarakli 2002). Os mesmos autores relataram que plantas crescendo em solos contaminados com Pb, Cd e Cu apresentaram redução na concentração de N em suas folhas e na absorção de  $\text{NO}_3^-$ , assim como alteração nas atividades de enzimas-chave na assimilação de N. Redução no teor de  $\text{NO}_3^-$  foi observado em *Pteris vittata* e *Pteris ensiformis* quando submetidas à As (Singh *et al.*, 2009). Nesse estudo, a presença de As na solução nutritiva resultou na diminuição da atividade da NR e NiR nas raízes, rizomas e folhas de *P. ensiformis* e *P. vittata*, com intensificação desse efeito quando a concentração de As foi maior. Resultado semelhante foi observado no estudo realizado por Jha e Dubey (2004) com plantas de arroz.

Apesar de, no presente estudo, As influenciar a obtenção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  pela planta, a absorção dos nutrientes foi maior que a do metaloide nos tratamentos de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$ , o que pode estar relacionada a capacidade de *E. crassipes* absorver e tolerar As em seus tecidos. É possível que a rápida absorção de As em concentrações elevadas interfira nos mecanismos de tolerância de *E. crassipes*, promovendo saturação dos mecanismos de absorção do metaloide. Além disso, a maior afinidade do  $\text{PO}_4^{3-}$  pelo sistema de absorção P/As pode ter contribuído para

sua maior absorção. Segundo Meharg e Macnair (1994) P é preferencialmente absorvido pelos transportadores de P/As em comparação com o seu análogo tóxico. Wang e colaboradores (2002) em um experimento com *P. vittata*, também relataram que o  $\text{PO}_4^{3-}$  tem maior afinidade pelo sistema de absorção por meio da raiz em comparação com o  $\text{AsO}_4^{3-}$ .

Vale ressaltar que a concentração de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  não interferiu na absorção de ambos os nutrientes, uma vez que a variação de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  observada nesse tratamento foi semelhante ao do tratamento controle. Relacionando este trabalho com um estudo anterior realizado sob as mesmas condições experimentais por Meneguelli-Souza e colaboradores (dados não publicados) observa-se que *E. crassipes* manteve suas funções metabólicas quando exposta a  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{AsO}_4^{3-}$ , não apresentando sinais de toxicidade, o que não ocorreu para os indivíduos expostos aos tratamentos de  $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ .

É reportado na literatura a habilidade das plantas em alterar o pH da rizosfera durante seu crescimento (Nye, 1981). A acidificação ou alcalinização da rizosfera é influenciada pela absorção de nutrientes pelas raízes das plantas, tendo como principal força motriz para o equilíbrio cátion-ânion a manutenção do balanço de cargas durante a absorção de íons. A fim de manter sua neutralidade elétrica, plantas excretam íons  $\text{H}^+$  e  $\text{OH}^-$  por meio das raízes para o meio, em quantidades que são estequiometricamente iguais aos respectivos excessos de cátion a ânions absorvidos (Haynes, 1990).

A queda do pH após a adição do  $\text{AsO}_4^{3-}$  (durante o experimento) pode estar relacionada a assimilação de  $\text{NH}_4^+$ , visto que a absorção desse nutriente pelas raízes de plantas causa a acidificação do meio, através da extrusão de um íon  $\text{H}^+$  por molécula de  $\text{NH}_4^+$  absorvida (Raven e Smith, 1976). Isso ocorre devido à reação de assimilação do  $\text{NH}_4^+$  em que o equivalente ao íon  $\text{H}^+$  produzido no meio intracelular pode ser liberado para solução externa, a fim de balancear a carga da membrana plasmática.



Além disso, é possível que tenha ocorrido a absorção preferencial de  $\text{NH}_4^+$  em detrimento do  $\text{NO}_3^-$  devido ao estresse que a planta se encontrava (Cruz *et al.*, 2006). Isso ocorre, pois a exigência energética para a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  é maior que a do  $\text{NH}_4^+$ , em razão deste não precisar ser reduzido para incorporação em aminoácidos (Bredemeier e Mundstock, 2000). A assimilação de N é um processo com elevado gasto energético, ocorrendo a transferência de 2 elétrons por  $\text{NO}_3^-$  reduzido a  $\text{NO}_2^-$ , 6 elétrons por  $\text{NO}_2^-$  convertido a  $\text{NH}_4^+$  e 2 elétrons e 1 ATP por molécula de  $\text{NH}_4^+$  convertida a glutamato (Bloom *et al.*, 1992).

É possível que a diminuição do  $\text{O}_2$  dissolvido no experimento tenha ocorrido devido a decomposição de ácidos orgânicos excretados pelas macrófitas (Brylinsky, 1977). Diminuição do  $\text{O}_2$  dissolvido também foi reportado por Azevedo e colaboradores (2008) devido à decomposição da matéria orgânica liberada por *Eichhornia azurea*. Sabendo-se que a condutividade elétrica é diretamente proporcional a concentração de íons em solução, a elevação do seu valor após a adição do  $\text{AsO}_4^{3-}$  nos tratamentos de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$  era esperado, uma vez que estes tiveram um incremento na concentração de íons por meio da adição do metaloide e de NaOH.

Crespo (2003) encontrou um amplo intervalo de variação para os valores de pH,  $\text{O}_2$  dissolvido e condutividade elétrica na lagoa do Campelo (Tab. 2.4). No presente estudo, os valores de tais parâmetros estão inseridos nesse intervalo,.

Tabela 2.4: Intervalo da variação nos parâmetros físico-químicos da Lagoa do Campelo.

pH	$\text{O}_2$ dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Condutividade elétrica ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )
6,5 - 9,7	4-160	107,7 - 4239

## 2.7 Conclusão

- Os tratamentos de 2,0 e 20  $\text{mg.L}^{-1}$  reduziram a absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  por *E. crassipes* ao longo do experimento, o que corrobora parcialmente a hipótese do estudo.
- O tratamento de 0,2  $\text{mg.L}^{-1}$  não influenciou a absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  por *E. crassipes* ao longo do experimento, o que refuta parcialmente a hipótese do estudo.

## 2.8 Referências Bibliográficas

ABBAS, M.H.H., MEHARG, A.A. Arsenate, arsenite and dimethyl arsinic acid (DMA) uptake and tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*. Vol. 304: 277–289, 2008.

ASHER, C.J., REAY, P.F. Arsenic uptake by barley seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.* Vol. 6, 459-466, 1979.

AZEVEDO, J.C.R., MIZUKAWA, A., TEIXEIRA, M.C., PAGIORO, T.A. Contribuição da decomposição de macrófitas aquáticas (*Eichhornia crassipes*) na matéria orgânica dissolvida. *Oecol. Bras.* Vol.12 : 42-56, 2008.

BARROW, N.J. Modelling the effects of pH on phosphate sorption by soils. *Journal of Soil Science*. Vol. 35, 283-297, 1984.

BEEVERS, L., HEGEMAN, H. Nitrate reduction in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* Vol. 20, 495-522, 1969.

BHATTACHARJEE, H., ROSEN, B.P. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. *Microbiol Monogr.* Vol. 6. 372 – 406, 2007.

BIENERT, G. P., SCHÜSSLER, M. D., JAHN, T. P. Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out. *Trends in Biochemical Sciences*. Vol. 33, 20-26, 2007.

BLOOM, A.J., SUKRAPANNA, S.S., WARNER, R.L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol.* Vol. 99, 1294-1301, 1992.

BREDEMEIER, C., MUNDSTOCK, C.M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural, Santa Maria*. Vol. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

BRIX, H. Treatment of wastewater in the rhizosphere of wetland plants – the root-zone method. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 19, 107-118, 1987.

BRYLINSKY, M. Release of Dissolved Organic Matter by Some Marine Macrophytes. *Marine Biology.* Vol. 39, 213-220, 1977.

COGLIATTI, D.H., SANTA MARIA, G.E. Influx and efflux of phosphorus in roots of wheat plants in non-growth-limiting concentrations of phosphorus. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 41, No. 226, pp. 601-607, 1990.

CRAWFORD, N.M., GLASS, A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trens in plant Science.* Vol. 3, No 10, 389-395, 1998.

CRESCO, M.C.R. Hidroquímica, composição química do sedimento e da macrófitas aquáticas submersas da lagoa do Campelo, Campos dos Goytacazes - São Francisco do Itabapoana, RJ. Tese de mestrado. Campos dos Goytacazes – RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 89p, 2003.

CRUZ, J.L., PELACANI, C.R., ARAÚJO, W.L. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. *Bragantia, Campinas.* Vol.65, n.3, p.467-475, 2006.

DUBEY R.S. e PESSARAKLI M. Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plants under stressful conditions. In: Pessarakli M. (ed.), *Handbook of Plant and Crop Physiology.* Marcel Dekker, New York, pp. 637–655, 2002.

DUFF, S.M.G., SARATH, G., PLAXTON, W.C. The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant.* 90:791-800, 1994.

EBEL, M., EVANGELOU, M.W.H., SCHAEFFER, A. Cyanide phytoremediation by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). *Chemosphere* 66, 816–823, 2007.

FERREIRA, A.C.B., ARAÚJO, G.A.A., PEREIRA, P.R.G., CARDOSO, A.A. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. *Scientia Agricola*, v.58, n.1, 131-138, 2001.

FRIED, M., ZSOLDOS, F., VOSE, P.B., SHATOKHIN, I.L. Characterizing the  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  uptake process of rice roots by use of  $^{15}\text{N}$  labeled  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . *Physiologia Plantarum*, Vol. 18, 313-320, 1965.

GARG, N., SINGLA, P. Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanism. *Environ Chem Lett* 9:303–321, 2011.

GARNIER, J.M., TRAVASSAC, F., LENOBLE, V., ROSE, J., ZHENG, Y., HOSSAIN, M.S., CHOWDHURY, S.H., BISWAS, A.K., AHMED, K.M., CHENG, Z., VAN GEEN, A. Temporal variations in arsenic uptake by rice plants in Bangladesh: The role of iron plaque in paddy fields irrigated with groundwater. *Science of the Total Environment*. Vol. 408, 4185–4193, 2010.

GIRI, A.K., PATEL, R.K. Phytoaccumulation potential and toxicity of arsenic ions by *Eichhornia crassipes* in hydroponic system. *J Bioremed Biodegrad*. Vol. 3, 2-6, 2012.

GUIMARÃES, F.P., AGUIAR, R., OLIVEIRA, J.A., SILVA, J.A.A., KARAM, D. Potential of macrophyte for removing arsenic from aqueous solution. *Planta Daninha*. Vol. 30, n. 4, 683-696, 2012.

HAYNES, R.J. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil* 120, 247-264, 1990.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agriculture Station, p. 347, 1950.

HOSSAIN, M.B., JAHIRUDDIN, M., LOEPPERT, R.H., PANAULLAH, G.M., ISLAM, M.R., DUXBURY, J.M. The effects of iron plaque and phosphorus on yield and arsenic accumulation in rice. *Plant Soil*. Vol.317:167–176, 2009.

IMPELLITTERI, C.A. Effects of pH and phosphate on metal distribution with emphasis on As speciation and mobilization in soils from a lead smelting site. *Science of the Total Environment*. Vol. 345, 175– 190, 2005.

IRTELLI, B., NAVARI-IZZO, F. Uptake kinetics of different arsenic species by *Brassica carinata*. *Plant Soil*, 303:105–113, 2008.

JHA, A.B., DUBEY, R.S. Arsenic exposure alters activity behaviour of key nitrogen assimilatory enzymes in growing rice plants. *Plant Growth Regulation* 43: 259–268, 2004.

LAGE-PINTO, F., OLIVEIRA, J.G., CUNHA, M.D., SOUZA, C.M.M., REZENDE, C.E., AZEVEDO, R.A., VITÓRIA, A. P. Chlorophyll a fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. *Environmental and Experimental Botany* 64, 307–313, 2008.

LAMBKIN, D.C, ALLOWAY, B.J. Arsenate-induced phosphate release from soils and its effect of plant phosphorus. *Water, Air, and Soil Pollution* 144: 41–56, 2003.

LEMOS, O.L., ALMEIDA, O.S., GUEDES, P.A., REBOUÇAS, T.N.H., SENO, S. Relação entre o metabolismo de nitrogênio e a fotossíntese na formação de frutos: uma revisão bibliográfica. *Diálogos e Ciência. Revista da rede de ensino FTC*. Ano II, n. 7, 2008.

LI, Z. Use of surfactant-modified zeolite as fertilizer carriers to control nitrate release. *Microporous and Mesoporous Materials* 61, 181–188, 2003.

LIU, W.J., ZHU, Y.G., SMITH, F.A., SMITH, S.E. Do phosphorus nutrition and iron plaque alter arsenate (As) uptake by rice seedlings in hydroponic culture?

New Phytologist. Vol. 162: 481–488, 2004.

LOW, K.S., LEE, C.K. Removal of arsenic from solution by water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart) Solms). *Pertanika*. Vol. 13, 129.

MA, L.Q., KOMAR, K.M., TU, C., ZHANG, W., CAI, Y., KENNELLEY, E.D. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*. Vol. 409, 2001.

MA, J.F, YAMAJI, N., MITANI, N., XU, X.Y, SU, Y.H, McGRATH, S.P., ZHAO, F.J. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS*. Vol. 105, nº. 29, 9931–9935, 2008.

MACDUFF, J.H., JACKSON, S.B. Influx and efflux of nitrate and ammonium in italian ryegrass and white clover roots: comparisons between effects of darkness and defoliation. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 43, No. 249, pp. 525-535, 1992.

MEHARG, A.A. Integrated tolerance mechanisms – constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant, Cell & Environment* 17: 989–993, 1994.

MEHARG A. A., MACNAIR, M. R. Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv that differ in their tolerance to arsenate. *Plant and Soil*, 162: 99–106, 1994.

MEHARG, A.A., HARTLEY-WHITAKER, J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol* 154: 29–43, 2002.

MELO, P.M., LIMA, L.M., SANTOS, I.M., CARVALHO, H.G., CULLIMORE, J.V. Expression of the Plastid-Located Glutamine Synthetase of *Medicago truncatula*.

Accumulation of the Precursor in Root Nodules Reveals an in Vivo Control at the Level of Protein Import into Plastids. *Plant Physiology*. Vol. 132, 390–399, 2003.

MILIVOJEVIC, D.B., NIKOLIC, B.R., DRINIC, G. Effects of arsenic on phosphorus content in different organs and chlorophyll fluorescence in primary leaves of soybean. *Biologia Plantarum* 50 (1): 149-151, 2006.

MIMURA T. Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology – a Survey of Cell Biology* 191: 149–200, 1999.

MISBAHUDDIN, M., FARIDUDDIN, A. Water hyacinth removes arsenic from arsenic-contaminated drinking water. *Archives of environmental health*. Vol. 57(6), 516-8, 2002.

MISHRA, S.; DUBEY R.S. Changes in phosphate content and phosphatase activities in rice seedlings exposed to arsenite. *Braz. J. Plant Physiol.*, 20(1):19-28, 2007.

NASCIMENTO, K.J.T. Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidantes em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio. Dissertação de Mestrado. Viçosa, 47p., 2007.

NYE P.H. Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant and Soil*. Vol. 61, 7-26, 1981.

PALMA, J.M., SANDALIO, L.M., CORPAS, F.J., ROMERO-PUERTAS, M.C., MACARTHY, I., DELRIO, L.A.: Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: Role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem*. Vol. 40, 521-530, 2002.

PEREIRA, F.J., CASTRO, E.M, OLIVEIRA, C., PIRES, M.F., PASQUAL, M. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. *Planta Daninha*. Vol. 29, n. 2, 259-267, 2011.

PICKERING, I.J., PRINCE, R.C., GEORGE, M.J., SMITH, R.D., GEORGE, G.N., SALT, D.E. Reduction and coordination of arsenic in Indian Mustard. *Plant Physiology*. Vol. 122, pp. 1171–1177, 2000.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate transport and signaling. *Plant Biology*. Vol. 3:182–187, 2000.

RAHMAN, M.A., HASEGAWA, H., UEDA, K., MAKI, T., RAHMAN, M.M. Influence of phosphate and iron ions in selective uptake of arsenic species by water fern (*Salvinia natans* L.), *Chemical Engineering Journal* 145, 179–184, 2008.

RAVEN, J.A., SMITH, F.A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* 76, 415-431, 1976.

ROBINSON, B., KIM, N., MARCHETTI, M., MONI, C., SCHROETER, L., VAN DEN DIJSEL, C., MILNE, G., CLOTHIER, B. Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Environ. Exp. Bot.* 58, 206–215, 2006.

ROSA, G.D.L., PARSONS, J.G., MARTINEZ-MARTINEZ A, PERALTA-VIDEA, J.R., GARDEA-TORRESDEY, J.L. Spectroscopic study of the impact of arsenic speciation on arsenic/phosphorus uptake and plant growth in tumbleweed (*Salsola kali*). *Environmental Science and Technology*, 40: 1991–1996, 2006.

SANTOS, J.A.G., GONZAGA, M.I.S., MA, L.Q., SRIVASTAVA, M. Timing of phosphate application affects arsenic phytoextraction by *Pteris vittata* L. of different ages. *Environmental Pollution*. 154, 306 – 311, 2008.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, v.101, p.7-12, 1993.

SCHJORRING, J.K., JENSÉN, P. Phosphorus nutrition of barley, buckwheat and rape seedlings.II. Influx and efflux of phosphorus by intact roots of different P status. *Physiol. Plant.* Vol. 61: 584-590. 1984.

SCHMÖGER, M.E.V., OVEN, M., GRILL, E. Detoxification of Arsenic by Phytochelatins in Plants. *Plant Physiology.* Vol. 122, 793–801, 2000.

SILVER, S., PHUNG, L.T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* Vol. 32: 587–605, 2005.

SINGH, N., MA, L.Q, VU, J.C., RAJ, A. Effects of arsenic on nitrate metabolism in arsenic hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ferns. *Environmental Pollution.* Vol. 157, 2300–2305, 2009.

SMART, R.M., BARKO J.W. Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments. *Aquat. Bot.* 21: 251-263, 1985.

SMITH, S.E., CHRISTOPHERSEN, H.M., POPE, S., SMITH, F.A. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. *Plant Soil* 327:1–2, 2010.

SMITH E, NAIDU R, ALSTON A.M. Arsenic in the soil environment: a review. *Adv Agron* 64: 149–195, 1998.

STOEVA, N., BINEVA, T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulgarian J. Agric. Sci.*, v. 29, n. 1, p. 87-95, 2003.

TAIZ, L., ZEIGER, E. *Plant Physiology.* The Benjamim/Cummings Publishing Company, Inc, Redwood City, California. 556p., 1991.

TRIPATHI, R.D., SRIVASTAVA, S., MISHRA, S., SINGH, N., TULI, R., GUPTA, D.K., MAATHUIS, J.M. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol.* 25:158-165, 2007.

TU, S., MA, L.Q., McDONALD, G.E., BONDADA, B. Effects of arsenic species and phosphorus on arsenic absorption, arsenate reduction and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* L. *Environmental and Experimental Botany*. Vol. 51, 121–131, 2004.

WANG, L., DUAN, G. Effect of external and internal phosphate status on arsenic toxicity and accumulation in rice seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 2. 346–351, 2009.

WANG, J., ZHAO F.J., MEHARG, A.A., RAAB, A., FELDMANN, J., McGRATH, S.P. Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake Kinetics, Interactions with Phosphate, and Arsenic Speciation. *Plant Physiology*, Vol. 130, pp. 1552–1561, 2002.

WYSOCKI R, BOBROWICZ P, ULASZEWSKI S. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *Journal of Biological Chemistry* 272: 30061–30066, 1997.

XU, X.Y., McGRATH, S.P., ZHAO, F.J. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist*. Vol. 176:590–599, 2007.

YANG, H.C., CHENG J., FINAN, T.M., ROSEN, B.P., BHATTACHARJEE H. Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 187:6991–6997, 2005.

ZHANG, X., LIN, A.J., ZHAO, F.J., XU, G.Z., DUAN, G.L., ZHU, Y.G. Arsenic accumulation by the aquatic fern *Azolla*: Comparison of arsenate uptake, speciation and efflux by *A. caroliniana* and *A. filiculoides*. *Environmental Pollution*. Vol. 156, 1149–1155, 2008.

### Conclusão Geral

É possível inferir que sob as condições experimentais impostas nesse estudo *E. crassipes* mostrou-se hiperacumuladora de As somente quando exposta a concentração de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , o que foi relacionado ao não comprometimento dos seus parâmetros ecofisiológicos e da absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$ , que se mantiveram semelhantes aos tratamentos isentos de contaminação durante o experimento. Aliado a isso, as plantas apresentaram elevada remoção do metaloide do meio nesta concentração, indicando que esta espécie é eficiente na remediação de As em ambientes com baixa contaminação. Por outro lado, *E. crassipes* não apresentou hiperacumulação de As nos tratamentos de  $2,0$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  a partir de 48 horas de experimento, observado por meio do comprometimento de seus parâmetros ecofisiológicos e da absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$ . As plantas não foram eficientes na remoção de As da solução nutritiva nestas concentrações, mostrando a limitação do uso de *E. crassipes* na remediação de ambientes altamente impactados. Há uma relação de causa e consequência entre a manutenção dos parâmetros ecofisiológicos nas plantas e a absorção de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$ , essenciais a seus processos metabólicos. Porém é complexo o estabelecimento de qual fator influenciou negativamente o outro, supondo que tal processo tenha ocorrido em sinergia.

### Considerações Finais

Experimentos hidropônicos possuem importância indiscutível no entendimento dos problemas de contaminação ambiental, uma vez que é possível simular as condições do meio por meio de ensaios controlados. Porém, na hidroponia a reação das plantas varia de acordo com as condições impostas, o que acarreta em respostas pontuais acerca de determinado estresse. Portanto, a fim de compreender a resposta das plantas a condições variantes em um ambiente dinâmico, é necessário simular diferentes tipos de contaminação. No presente estudo buscou-se o entendimento da tolerância de *E. crassipes* a As quando submetida a estresse agudo (fontes antrópicas) e crônico (fontes naturais). As condições do meio, como a concentração de nutrientes, também influenciam a reação das plantas a contaminações. Lagoas costeiras, classificadas em geral como ambientes eutróficos, se assemelham as condições de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NO}_3^-$  utilizados nesse experimento. É possível que haja competição entre nutrientes e As por absorção nas plantas nestes ambientes, diminuindo sua eficiência na remoção do metaloide. Experimentos que avaliem a influência do As na absorção de nutrientes podem atuar como modelos (mantendo as devidas proporções) para ambientes costeiros, uma vez que a liberação de resíduos industriais e domésticos, bem como a lixiviação do solo com diferentes usos no seu entorno, possibilita a liberação de elementos tóxicos nestes sistemas. As plantas inseridas nesse ambiente podem ser mais tolerantes aos efeitos tóxicos do As, o que permite que elas permaneçam mais tempo no meio. Em contrapartida, ambientes mesotróficos e oligotróficos, como represas e rios, podem favorecer a absorção de As pelas plantas, mas estas serão mais sensíveis a seus efeitos deletérios, diminuindo sua permanência no meio. Por isso, é essencial que programas de remediação de As levem em consideração o estado trófico do ambiente e o ciclo de vida da espécie, uma vez que o manejo das plantas varia de acordo com tais condições. A toxicidade a As encontrada nos indivíduos de *E. crassipes* nesse estudo ocorreu, possivelmente, pois não houve tempo suficiente para o aparelho fotossintético das plantas se protegerem do estresse, ou as defesas ativadas provavelmente não foram suficientes para evitar danos causados pelo metaloide.