

MARIA ANGÉLICA GUERRA DE OLIVEIRA

ANATOMIA E MICROMORFOLOGIA DE *Salvinia auriculata* AUBL.
(SALVINIACEAE) SUBMETIDA AO ARSÊNIO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48a
2012

Oliveira, Maria Angélica Guerra de, 1984-
Anatomia e micromorfologia de *Salvinia auriculata* Aubl.
(Salviniaceae) submetida ao arsênio / Maria Angélica Guerra
de Oliveira. – Viçosa, MG, 2012.
viii, 37f. : il. (algumas col.) ; 29 cm.

Orientador: João Marcos de Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 29-37

1. *Salvinia auriculata*. 2. Arsênio. 3. Plantas - Anatomia.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 587.3

MARIA ANGÉLICA GUERRA DE OLIVEIRA

ANATOMIA E MICROMORFOLOGIA DE *Salvinia auriculata* AUBL.
(SALVINIACEAE) SUBMETIDA AO ARSÊNIO

Dissertação apresentada á Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de março de 2012.

Prof.^a. Dr.^a Luzimar Campos da Silva

Prof. Dr. Cleberson Ribeiro

Prof. Dr. João Marcos de Araújo
(Orientador)

DEDICATÓRIA

*Tens o dom de ver estradas onde eu vejo fim
Me convences quando falas: não é bem assim
Se me esqueço me recordas, se não sei me ensinas
E se perco a direção vens me encontrar*

Exclusivamente à DEUS, dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me deram todo apoio possível e me ensinaram a trilhar os caminhos dessa vida, tudo o que sou devo a eles.

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos, que preencheram meus dias de alegria quando nos encontrávamos em poucos finais de semana ou mesmo nos telefonemas cheios de saudades e choro, quando meu pai dizia: só falta você aqui...

Ao Bernardo, meu marido, meu companheiro. A distância nesses anos todos só fez aumentar e amadurecer o nosso amor.

A Universidade Federal de Viçosa, que me encantou anos antes do mestrado e agora é um sonho realizado!

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Professor João Marcos, meu orientador, por compartilhar comigo o seu conhecimento, sempre firme e responsável, mas com seu jeito de ser humano e compreensível. Obrigada por me acolher e confiar que eu fosse capaz.

Aos meus co-orientadores, Juraci e Aristéa, por me acolherem com toda a solicitude em seus laboratórios, onde aprendi tudo o que me foi necessário.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica, Laboratório de Biologia Celular e Estrutural e Laboratório de Botânica. O resultado do meu trabalho se deve também a cada um de vocês.

À Beth, por me manter sempre informada. Quanta paciência e disponibilidade. Obrigada!

À minha grande amiga Heloísa, um presente que Deus me concedeu nessa jornada, e que será para sempre lembrada em todos os caminhos que eu ainda possa percorrer. Ah, se todos tivessem o privilégio de conhecê-la...

Às minhas primas, Ana Paula e Luana, pelo apoio e companhia, pelos conselhos e pelo insubstituível amor que só encontramos na família.

Às amigas Isabella, Márjorie e Michele, pelos momentos de liberação do estresse, das tensões, das angústias, onde esquecíamos de tudo e virávamos a noite conversando... Só Deus sabe...

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	4
3. OBJETIVOS	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	6
4.1. Condições de cultivo da planta	6
4.2. Acúmulo de biomassa	7
4.3. Quantificação do arsênio acumulado nas plantas	7
4.4. Análise estrutural	7
4.5. Análises estatísticas	8
5. RESULTADOS	9
5.1. Análise macroscópica e acúmulo de biomassa	9
5.2. Acúmulo de arsênio e sua distribuição nas plantas	13
5.3. Caracterização anatômica	16
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÕES	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

RESUMO

OLIVEIRA, Maria Angélica Guerra de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012. **Anatomia e micromorfologia de *Salvinia auriculata* Aubl. (Salviniaceae) submetida ao arsênio.** Orientador: João Marcos de Araújo. Co-orientadores: Aristéa Alves Azevedo e Juraci Alves de Oliveira.

A contaminação ambiental constitui um sério problema no mundo inteiro. O arsênio (As) é um metalóide que tem recebido grande atenção de pesquisadores devido a sua elevada toxicidade para os seres vivos. Nesse contexto, o uso de plantas tem se revelado uma metodologia adequada e de baixo custo para a detecção dos poluentes. Entretanto, o uso de espécies vegetais como bioindicadoras requer o conhecimento prévio das suas características. Este trabalho tem a finalidade de avaliar as respostas de *Salvinia auriculata* Aubl. na presença de arsênio, na forma de arsenato de sódio, determinando o teor deste elemento acumulado pela espécie, bem como os possíveis efeitos sobre o desenvolvimento, o acúmulo de biomassa, as alterações morfológicas e a estrutura anatômica das suas folhas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com controle e quatro concentrações de As, sendo 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ com cinco repetições, cultivadas em solução nutritiva de Clark, durante 15 dias, em casa de vegetação. Para determinação dos teores de As, amostras foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidreto. Amostras das folhas emersas e submersas do primeiro e do quarto nós foram coletadas e processadas para análise microscópica. A parte aérea foi visivelmente afetada, com áreas necróticas na superfície foliar, com formato arredondado e com tonalidade marrom escura, cuja intensidade foi diretamente proporcional à concentração de As. As folhas modificadas apresentaram aspecto gelatinoso e escurecimento. A absorção de arsênio pelas plantas aumentou proporcionalmente com a concentração do metalóide na solução. Pelas análises microscópicas pôde-se constatar danos mais drásticos no primeiro nó, se comparado ao quarto nó. No primeiro nó, as células tiveram acúmulo de conteúdos intensamente corados pelo azul de toluidina, deformação na arquitetura das células epidérmicas, danos parciais nos tricomas e distorção da parede do contorno dos elementos do xilema. No quarto nó ocorreu acúmulo de conteúdos, alterações nos cloroplastos, compactação das lacunas, alterações no padrão de desenvolvimento dos tricomas com pouco desenvolvimento e redução na espessura do mesofilo. As alterações anatômicas nas folhas emersas e nas folhas modificadas de *S. auriculata* foram evidentes, podendo

ser utilizados no diagnóstico das injúrias e para o entendimento dos mecanismos de fitotoxicidade do As.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Maria Angélica Guerra de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2012. **Anatomy and morphology of *Salvinia auriculata* Aubl. (Salviniaceae) submitted to the arsenic.** Adviser: João Marcos de Araújo. Co-advisers: Aristéa Alves Azevedo and Juraci Alves de Oliveira.

Environmental contamination is a serious problem worldwide. Arsenic (As) is a metalloid that has received great attention from researchers due to its high toxicity to live beings. In this context, the use of plants has proven to be an appropriate methodology and cost-effective for the detection of pollutants. However, the use of plant species as bioindicators requires prior knowledge of their characteristics. This study aims to evaluate the responses of *Salvinia auriculata* Aubl. in the presence of arsenic, determining the content of this element accumulated by species and the possible effects on development, biomass accumulation, morphological alterations and anatomical structure of its leaves. The experimental design was completely randomized with control and four concentrations of As, in the form of sodium arsenate, being 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹ with five repetitions, cultivated in Clark nutrient solution during 15 days in the greenhouse. Samples were analyzed by atomic absorption spectrophotometry with hydride generation, to determine the levels of As. Samples of submerged and floating leaves of the first and fourth nodes were collected and processed for microscopic analysis. Aerial parts of the plant was visibly affected, with necrotic areas on the leaf surface, with rounded shape and dark brown tint, whose intensity was directly proportional to the concentration of As. Modified leaf presented gelatinous and browning appearance. Clonal growth rates decreased strongly with increasing concentration of arsenic in the nutrient solution, with a 56.4% reduction in the concentration 0.5 mg L⁻¹, reaching 86.7% at 2.0 mg L⁻¹. In relation to the accumulation, the absorption of arsenic by plants increased proportionally with the concentration of metal in solution. The microscopic analysis was able to see more dramatic damage in the first node, compared to the fourth node. In the first node may be observed accumulation of cells with content intensely colored by toluidine blue, deformation in the architecture of the epidermal cells, partial damage to trichomes, distortion of the boundary wall of xylem elements. In the fourth node occurred accumulation of contents, changes in the chloroplasts, compression of the gaps, changes in the pattern of development of trichomes with little development and reduction in thickness of the mesophyll. The anatomical

changes in leaves and immersed in modified leaves of *S. auriculata* were evident and can be used for diagnosing injuries and for understanding the mechanisms of phytotoxicity by As.

1. INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um elemento tóxico e cancerígeno e sua toxicidade depende, dentre outros fatores, da sua forma química. A introdução do As no meio ambiente, pode ser por fonte natural ou antrópica. As fontes naturais de contaminação incluem minerais e rochas que contêm este elemento e os solos e sedimentos formados a partir dessas rochas, bem como os fenômenos geotermiais e vulcânicos. As fontes antrópicas estão relacionadas à preservação de madeira, à utilização do elemento na agricultura, geralmente em pesticidas, aos rejeitos provenientes da mineração, às atividades de refino dos metais não ferrosos e à queima de carvão (Borba, 2002). O arsênio é um metalóide que pode ser encontrado na natureza como As (III) (arsenito), As(V) (arsenato), íon monometilarsônico (MMA) e íon dimetilarsínico (DMA). As formas mais comuns de exposição humana ao As são: consumo de água contaminada, inalação de gases e ingestão de pó (Gonçalves et al., 2007).

Dependendo das condições físico-químicas do ambiente, alguns compostos que contêm As podem ser altamente solúveis, resultando em alto nível de biodisponibilidade. O potencial tóxico e a disponibilidade de As no meio ambiente dependem de vários fatores, incluindo, o potencial redox e o pH. Arsenito (AsIII) e arsenato (As V) são os mais tóxicos, e, também, mais abundantes em água. Do ponto de vista geoquímico o As está associado a sulfetos metálicos e a grande variedade de minerais que contêm ouro, cobre, chumbo, ferro (arsenopirita), níquel, cobalto e outros metais (Lièvremonet et al., 2009).

Em muitas cidades brasileiras, o abastecimento público de água depende da água armazenada em lagos, naturais ou artificiais, que podem conter rejeitos de mineração e garimpo, onde são encontradas elevadas concentrações de metais pesados (Borba et al., 2004). A mineração no Brasil é uma atividade econômica muito importante e o As ocorre naturalmente em mais de duzentas formas de minerais (Mandal & Suzuki, 2002). Quando exposto à água e ao ar, o As associado à matriz de sulfetos nos minérios pode se solubilizar e ser incorporado à cadeia trófica (Mello et al., 2006). Um exemplo acontece no Quadrilátero Ferrífero onde, em alguns locais, há a utilização pela população de água subterrânea proveniente de antigas minas de ouro. Nas águas subterrâneas coletadas em algumas minas auríferas e de nascentes das regiões de Ouro Preto e Mariana, segundo Borba et al. (2004), foram encontradas

concentrações de As variando entre 2 a 2980 $\mu\text{g L}^{-1}$, cujos valores são superiores ao máximo permitido para consumo humano, que no Brasil, segundo a Resolução CONAMA 357/05, é de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em Bangladesh, China, Índia e EUA tem sido relatados altos teores de As e danos à saúde humana pela ingestão de água contaminada (WHO, 2010).

A longa exposição a compostos inorgânicos de As pode induzir sérios danos à saúde humana, provocados pelo estresse oxidativo (Kumagai & Sumi, 2007) que gera disfunção crítica das enzimas e danos às células. O arsenito se liga aos grupos sulfidril das enzimas induzindo deficiências funcionais. Estudos de Abernathy et al. (1999) têm mostrado que o arsenito inibe mais de 200 enzimas nas células humanas. Por ser um análogo estrutural do íon fosfato, o arsenato compete com este íon e interfere no processo de fosforilação oxidativa, inibindo o metabolismo energético das células. Por outro lado, o As pode substituir o fosfato na dupla hélice do DNA, o que pode explicar os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (Tapio & Grosche, 2006; Lièremont et al., 2009). Como exemplos dos danos à saúde podem ser citados: hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele e gangrena nos membros (Barra et al., 2000), defeitos em fetos e problemas no sistema reprodutivo (Roy, 2008). Portanto, é necessário que sejam utilizadas estratégias que visem eliminar ou minimizar a exposição humana à poluição pelo As.

A recuperação de áreas contaminadas pelas atividades humanas pode ser feita através de vários métodos, tais como escavação, incineração, extração com solvente, óxido redução e outros que são bastante dispendiosos. Alguns processos deslocam a matéria contaminada para local distante, causando riscos de contaminação secundária e aumentando ainda mais os custos com o tratamento (Oliveira et al., 2009). Dentro desse contexto, a biotecnologia tem como instrumento a fitorremediação, que é a utilização de plantas e sua microbiota, com a finalidade de estabilizar, extrair, degradar ou volatilizar substâncias tóxicas do ambiente. Tem tido grande aceitação nos últimos 10 anos, como forma de tecnologia eficaz e de baixo custo, não invasiva ou complementando métodos de engenharia baseadas em remediação (Pilon-Smits, 2005; Lemos et al., 2009). As tecnologias baseadas em uso de vegetais para remediação dos efeitos da poluição são cada vez mais utilizadas em países como os Estados Unidos, o Canadá e a Alemanha. No Brasil tem ocorrido o crescimento da demanda por tecnologias de remediação ambiental, entre as quais a fitorremediação,

tem recebido grande atenção pela viabilidade técnica e econômica de sua aplicação (Rodrigues & Moeri, 2007).

A fitorremediação tem vantagens mas também apresenta limitações. As plantas devem se desenvolver onde o poluente se encontra, e as propriedades do substrato, o nível de toxicidade e o clima devem permitir o seu crescimento além, é claro, da biodisponibilidade do poluente. A toxicidade por As, em plantas, pode ser evidenciada pelo murchamento e necrose da folhas, crescimento lento das raízes e parte aérea, cor arroxeada e morte da planta (Woolson et al., 1971; Adriano, 1986). O As pode se acumular nos tecidos vegetais dependendo da sua disponibilidade no meio e do metabolismo da planta, fatores esses diretamente relacionados com mecanismos de tolerância (Marian et al., 1993).

Espécies de monilófitas podem ser empregadas nos processos de fitorremediação de solos e água contaminados (Oliveira et al., 2009). Para uma espécie ser considerada hiperacumuladora de arsênio deve apresentar Fator de Bioacumulação (FBA) e Fator de Translocação (FT) maiores que 1 e a concentração total de As deve ser superior a 1000 mg Kg^{-1} na biomassa vegetal. Samambaias do gênero *Pteris* e *Pityrogramma calomelanos* foram consideradas espécies hiperacumuladoras de As (Gonzaga et al. 2006). *Pteris vittata* apresentou capacidade para remover arsênio do solo, podendo acumular acima de 22630 mg Kg^{-1} As, concentrando 2,3% deste elemento em sua biomassa. Em geral, essas plantas parecem apresentar mecanismos constitutivos e adaptativos que permitem elevada absorção e sobrevivência em solos com altas concentrações de As (Oliveira et al., 2009). Entretanto, existe uma espécie desse grupo, *Salvinia auriculata*, da família Salvinaceae, que não se comporta como hiperacumuladora, e sim como bioindicadora (Guimarães et al., 2006).

Salvinia auriculata é uma monilófita livre e flutuante, da família Salvinaceae, muito comum em água doce, com ampla distribuição geográfica, que sob condições favoráveis é rapidamente disseminada por propagação vegetativa, colonizando extensas superfícies de água em um tempo reduzido. Esta espécie tem sido considerada como planta daninha, por proliferar de forma indesejada em diversos ecossistemas aquáticos (Henry-Silva & Camargo, 2006). *S. auriculata* apresenta morfologia peculiar, com nós e entre-nós nítidos, sendo que em cada nó se originam três folhas, sendo duas verdes e flutuantes em cuja superfície ocorrem inúmeros tricomas hidrofóbicos. Uma terceira folha submersa, modificada e adaptada à absorção de água e íons, funcionando basicamente como uma raiz (Forno & Harley,

1979). A alta produção de biomassa de *S. auriculata* tem despertado interesse para uso em benefício do homem. A utilização de plantas aquáticas como agente purificador de águas contaminadas, justifica-se pela sua intensa absorção de nutrientes e pelo seu crescimento rápido, como também por oferecer facilidades de sua retirada das lagoas (Thomé, 2008).

Algumas espécies vegetais são muito sensíveis a poluentes, não sendo apropriadas para a fitorremediação, mas podem ser úteis como bioindicadores de poluição pois, sob efeito de poluentes, apresentam injúrias visíveis como necroses e cloroses e/ou alterações fisiológicas evidentes (De Temmerman et al., 2004). Os organismos bioindicadores são aqueles que podem ser usados para avaliação da extensão das mudanças em seu ambiente, pois reagem de forma previsível e quantificável às perturbações ambientais, por meio de alterações nas suas funções vitais ou composição química (Arndt & Schweizer, 1991). No método da bioindicação, o comportamento do organismo frente a um agente estressor é utilizado para avaliar a qualidade de um ambiente. Na Europa, o biomonitoramento tem enfoque na utilização de plantas bioindicadoras para a avaliação da qualidade do ar (Klumpp et al., 2001), enquanto no Brasil, esta metodologia desperta interesse mas tem sido, ainda, pouco utilizada em programas para a avaliação do impacto ambiental de poluentes.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos anatômicos são apropriados para avaliar o efeito de metais em plantas em áreas contaminadas. Simon et al. (2000) recomendaram estes estudos como ferramenta nos processos de biorremediação. Diversos trabalhos retratam a importância da análise anatômica de folhas e raízes de plantas sob efeito de diversos poluentes (Vitória et al., 2003, 2006; Santana-Santos et al., 2006; Silva, 2008) na avaliação do potencial de fitorremediação ou bioindicação das espécies. Ainda são escassos os estudos anatômicos sobre efeitos do arsênio em plantas.

A escolha da espécie *Salvinia auriculata* deve-se ao fato de existirem poucas informações a respeito dos danos causados por As nos diferentes tecidos dessas plantas e também por ser bastante estudada e recomendada como bioindicadora de ambientes poluídos, seja por metais pesados, metalóides ou outras substâncias. É uma importante espécie dos ecossistemas aquáticos, sendo responsável por uma

grande produtividade primária, contribuindo para o aumento de nichos, diversidade faunística e, portanto, maior complexidade na dinâmica do ecossistema. A importância das macrófitas aquáticas é amplamente discutida na literatura, sendo sua utilização como bioindicadoras da qualidade da água em ambientes lóticos e lênticos uma das mais relevantes (Pedralli, 1989). *S. auriculata* tem sido utilizada em vários programas de monitoramento em corpos d'água passíveis de eutrofização, sendo considerada uma planta bioindicadora para muitos metais pesados como o cádmio (Almeida et al., 2007), flúor (Peixoto et al., 2005), zinco (Wolff et al., 2009) e descrita como fitorremediadora para o chumbo (Wolff et al., 2009), acumulando em seus tecidos concentrações consideráveis desse poluente.

Apesar do acúmulo de informações a respeito da tolerância de plantas ao As, ainda não se dispõe de informações suficientes, tanto do ponto de vista morfológico quanto fisiológico, que permita compreender o comportamento de *Salvinia auriculata* a este poluente, ressaltando, principalmente, as alterações estruturais, sendo este um importante passo na seleção de espécies para serem utilizadas como fitorremediadoras ou bioindicadoras.

Portanto, estudos que avaliem o efeito do As em *Salvinia auriculata* são importantes para utilização da espécie em programas de biomonitoramento. O conhecimento prévio e específico das respostas morfoanatômicas da planta ao As é essencial para a realização de estudos em campo. Existem relatos na literatura da sintomatologia desta espécie submetida ao arsênio (Guimarães et al., 2006), contudo, devem ser integrados os estudos microscópicos para assegurar uma diagnose precisa.

3. OBJETIVOS

Considerando o número reduzido de informações sobre a anatomia de *Salvinia auriculata* submetida ao arsênio, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar anatomicamente *S. auriculata* em resposta ao As. E como objetivos específicos: selecionar caracteres relevantes na identificação de contaminação por As, avaliar as respostas ao arsênio em *S. auriculata*, determinar o teor deste elemento acumulado pela espécie, avaliar os possíveis efeitos sobre o desenvolvimento, o acúmulo de biomassa e as alterações morfoanatômicas foliares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Condições de cultivo das plantas

Plantas da espécie *Salvinia auriculata* Aubl. (Salviniaceae), conhecidas popularmente como salvinia, foram coletadas no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa, sendo o experimento conduzido em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas – UCP, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

As plantas foram inicialmente desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio 1% e, logo após, lavadas com água corrente e água destilada. Em seguida, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, por cinco dias, em vasos com solução nutritiva de Clark, meia força iônica, pH 6,5. Após este período de aclimação, as plantas foram selecionadas pela uniformidade de tamanho e transferidas, para vasos, contendo 1,0 L de solução de Clark, pH 6,5 acrescida de arsênio na forma de arsenato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Foram utilizadas plantas com três nós, sendo dois nós com folhas completamente expandidas e o terceiro nó, mais apical com folhas jovens, contados a partir da base para o ápice.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, controle e quatro concentrações de arsênio, sendo 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L^{-1} , com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com duas plantas. As plantas foram cultivadas por 15 dias e o pH da solução foi ajustado a cada dois dias. A solução nutritiva foi trocada a cada cinco dias com a finalidade de se evitar a proliferação de algas e permitir a manutenção da concentração do poluente. Os sintomas visuais dos danos provocados pelo As foram registrados diariamente por equipamento fotográfico.

Após os 15 dias de exposição ao As, as plantas foram coletadas e lavadas para a retirada do excesso de solução nutritiva.

4.2. Acúmulo de biomassa

O material vegetal foi seco em estufa, durante 72 horas, a 65°C e pesado para a determinação da matéria seca da parte aérea (folhas emersas) e para a parte submersa (folhas modificadas e rizoma).

4.3. Quantificação do arsênio acumulado nas plantas

Para determinação dos teores de arsênio total, as amostras secas foram adicionadas a tubos contendo solução nitro-perclórica (1:4 v/v), em bloco digestor com temperatura controlada até que as soluções se tornaram transparentes. Tomou-se o cuidado para que a temperatura não ultrapasse 150°C para evitar a volatilização do As. Também foram levadas ao bloco digestor amostras contendo apenas solução nitro-perclórica, para servir de controle das análises. Após resfriamento, as amostras foram filtradas e diluídas em 25 mL de água destilada. Os teores de As foram determinados, por espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidreto, no aparelho Atomic Absorption Flame Emission Spectrophotometer, modelo AA-6701F.

Utilizando-se do teor de As acumulado por unidade de matéria seca, foi calculado o fator de translocação (FT) que é a razão entre a concentração de As na parte aérea da planta (folha emersa) e a concentração de As na parte submersa (folha modificada e rizoma) (Fayiga & Ma, 2005; Huang et al., 2006). Também foi expresso o fator de bioacumulação (FBA) que é a razão entre a concentração de As na planta e a concentração de As no meio de crescimento, podendo ser o solo ou a água (Ma et al., 2001; Tu et al., 2002; Huang et al., 2006).

4.4. Análise estrutural

Amostras das folhas emersas e das folhas modificadas, do primeiro nó (folhas já se encontravam expandidas no início do experimento) e do quarto nó (folhas desenvolvidas durante o experimento), contadas da base para o ápice, foram coletadas e processadas para análise microscópica. As amostras foram fixadas em solução contendo 4% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído em solução tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,0 (Karnovsky, 1965, modificado), por 24 horas.

Em seguida, foram lavadas em solução tampão de cacodilato de sódio, a seguir em água destilada e desidratadas em série etílica. Após, amostras foram incluídas em resina glicol-metacrilato (Historesin – Leica). Cortes com espessura de 5 μm foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (Modelo RM2255, Leica Microsystems, Inc., Deerfield, USA). Os cortes foram corados com Azul de toluidina 0,025% em Tampão McIlvaine, pH 4,0 (Vidal, 1977) e montados em Permount. Foram feitos cortes das amostras em todas as concentrações utilizadas neste experimento, sendo a concentração de 1,5 mg L^{-1} escolhida como referência para mostrar os danos causados em *S. auriculata* na presença do As, devido à concentração de 2,0 mg L^{-1} ter afetado severamente a estrutura da planta e causado a sua morte precocemente.

Para as análises micromorfométricas foram efetuadas medidas das espessuras da epiderme (faces adaxial e abaxial) e do mesofilo, das folhas emersas da folha jovem. A espessura do limbo foi obtida pelo somatório desses tecidos. Os cortes foram analisados e documentados em microscópio de luz (Microscópio AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema U-Photo, com câmera digital (Spot Insightcolour 3.2.0. Diagnostic Instruments Inc., Nova York, EUA). As medições foram realizadas com o auxílio do software de análise de imagens AnatiQuanti (Aguiar et al., 2007).

4.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com base no delineamento inteiramente casualizado, considerando os cinco tratamentos e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2003). As médias dos tratamentos foram submetidas ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e quando necessário os dados foram submetidos ao ajuste de modelos de regressão.

5. RESULTADOS

5.1. Análise macroscópica e acúmulo de biomassa

O aspecto geral das plantas de *Salvinia auriculata* no tratamento controle (Figuras 1A e 1B) diferiu daqueles observados nas plantas expostas ao As (Figura 1C a 1F). Sintomas visíveis de toxidez foram observados em decorrência da presença de As, até mesmo na menor dosagem aplicada ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de As) (Figura 1C). Foram identificadas áreas necrosadas amarronzadas (Figura 1C) que se concentraram da margem em direção a região da nervura principal das folhas emersas do primeiro e do segundo nós, ou seja, aquelas que já se encontravam expandidas no início do experimento. Em todas as doses de As foi possível verificar danos, que foram mais intensos nas maiores concentrações.

As manchas marrons na superfície da folha surgiram a partir do terceiro dia do experimento nas concentrações mais elevadas. No quarto dia, as manchas apareceram nos demais tratamentos, exceto no controle. A partir do sexto dia foi possível observar a morte das folhas que se encontravam expandidas no início do experimento, na maior concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de As (Figura 1F). Mesmo com sintomas de toxicidade ao As, as plantas foram capazes de emitir novas folhas com aspecto normal, ou seja, sem necroses ou cloroses, porém com pouco desenvolvimento (Figura 1C).

Com mais detalhes, foi possível visualizar, diferentemente do controle (Figuras 2A, 2D e 2F), as mudanças nas plantas submetidas ao arsênio (Figuras 2B, 2C, 2E e 2G). Foram observados também tricomas (Figura 2G), com ápice retorcido e com tonalidade marrom escura, coloração semelhante à observada nas áreas necróticas da lâmina foliar. As folhas do quarto nó não apresentaram os sintomas encontrados nas folhas do primeiro nó porém, as mesmas apresentaram menor crescimento, verificado pela análise visual (Figura 2C). Nas folhas modificadas do primeiro nó foram observadas mudanças de coloração e aspecto gelatinoso, nas concentrações mais elevadas do poluente (Figuras 2B e 2E).

As plantas tiveram a biomassa alterada, como evidenciada pela análise de regressão. Foram constatadas reduções na produção de massa seca na ordem de 66% e 93% para a parte aérea e de 67% e 92% para a parte submersa, nas doses de 0,5 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, em relação ao controle (Figura 3).

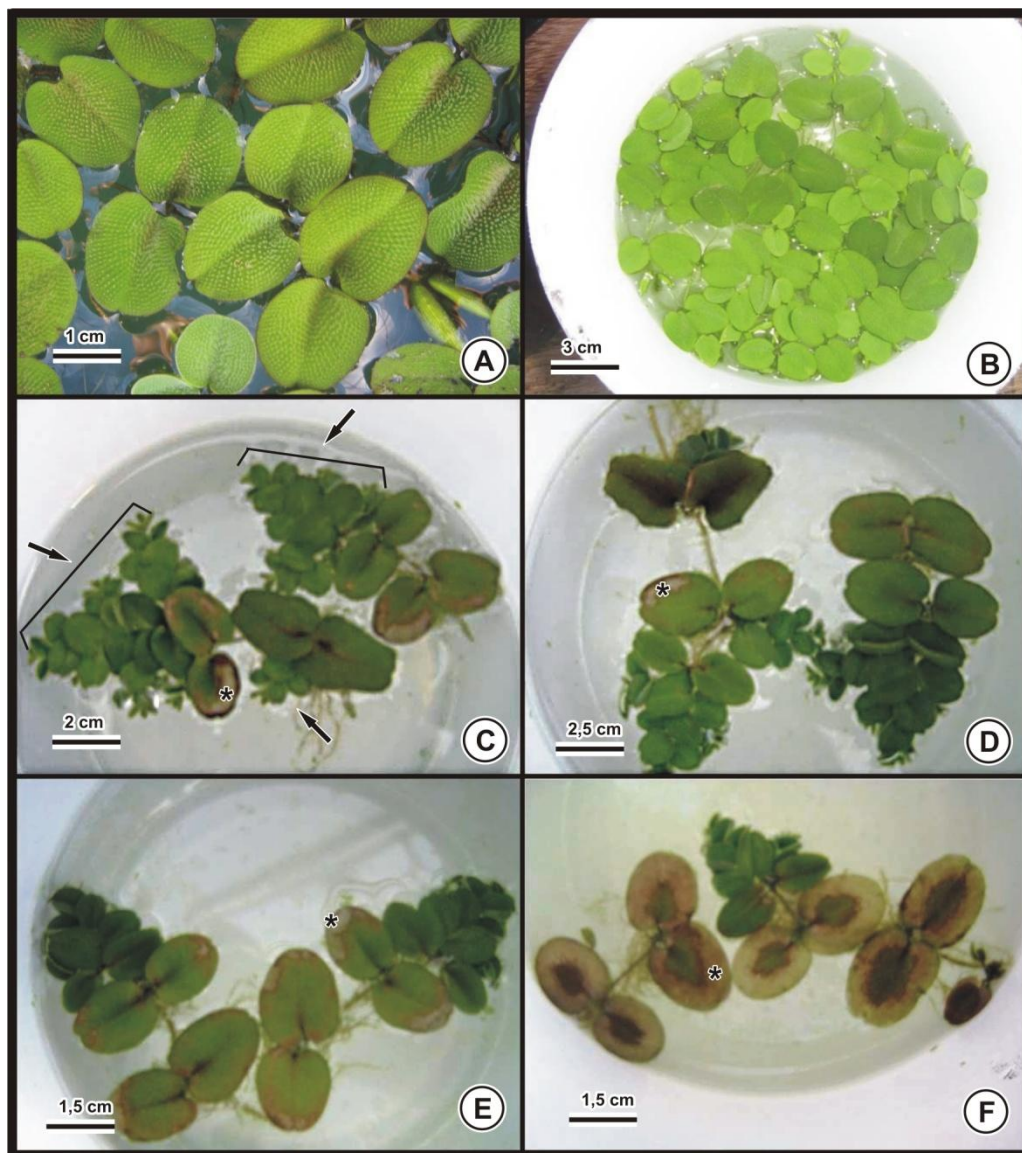


Figura 1 - Aspecto geral das plantas de *Salvinia auriculata* no tratamento controle (A e B) e em diferentes doses de arsênio (C a F): 0,5 mg L⁻¹; 1,0 L⁻¹; 1,5 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹, respectivamente. Durante 15 dias de exposição ao arsênio. Áreas necróticas em folhas que se encontravam expandidas no início do experimento(*). Folhas desenvolvidas durante o período experimental com área foliar reduzida, mas sem necrose (→).

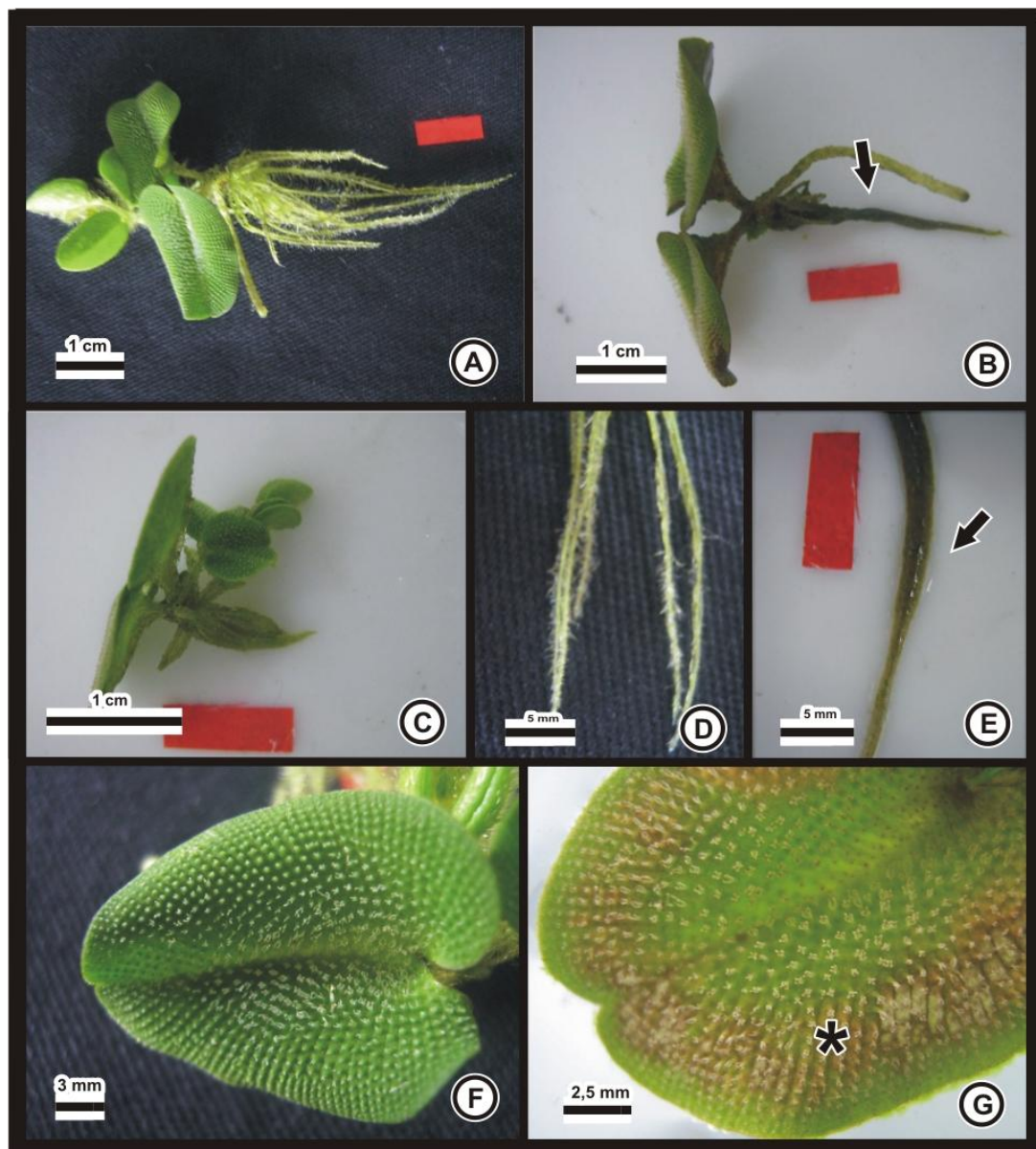


Figura 2 – Folhas emersas e folhas modificadas de *Salvinia auriculata*, controle (A, D e F) e tratadas com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de As (B, C, E e G). Durante 15 dias de exposição ao arsênio. Observam-se manchas escuras na parte aérea (*) e mudança de coloração e aspecto gelatinoso na folha modificada (→). C: Diminuição visual no crescimento tanto da folha emersa como da folha modificada. A, B, D, E, F e G: primeiro nó. C: quarto nó.

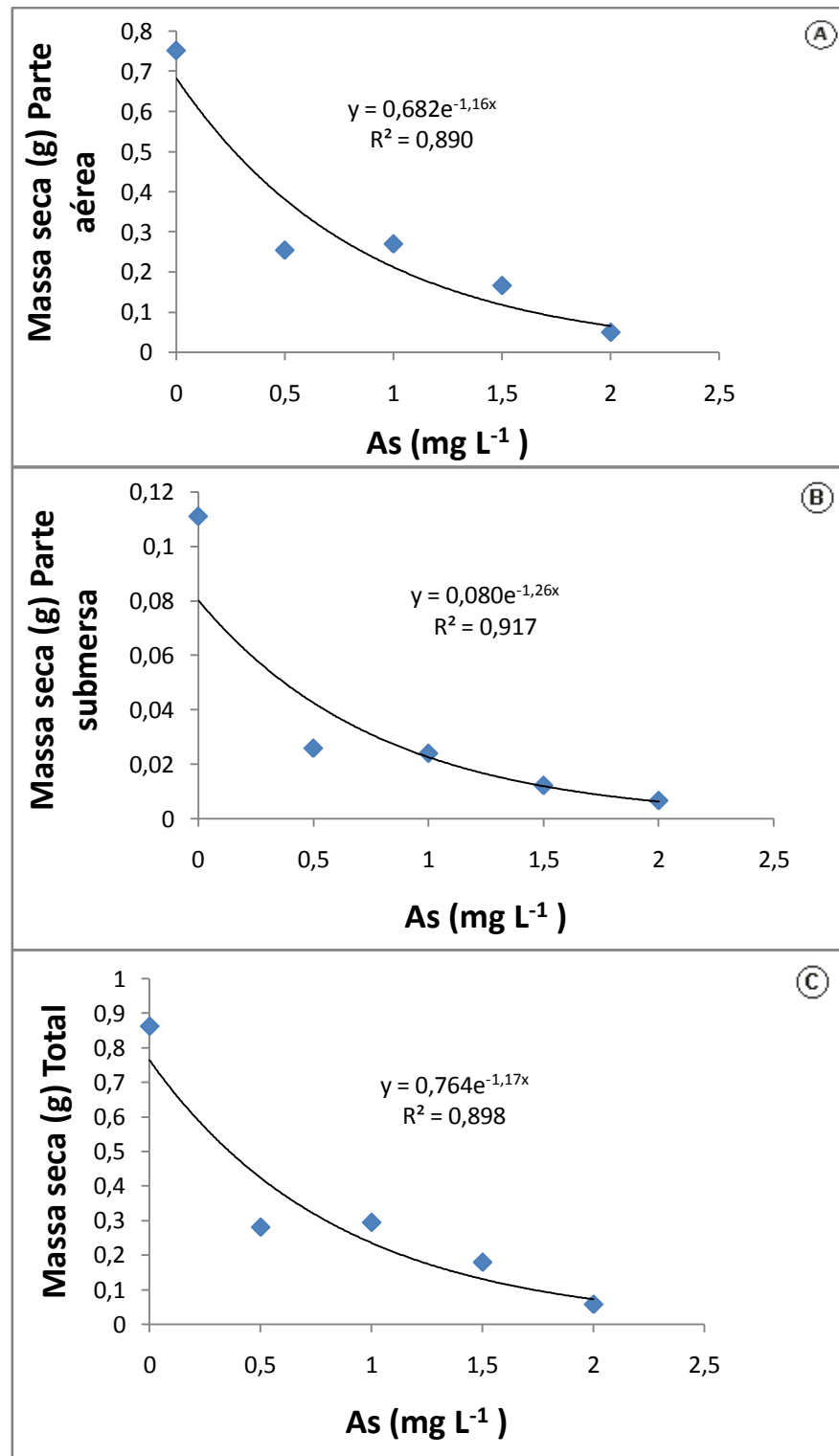


Figura 3 - Acúmulo de biomassa em plantas de *Salvinia auriculata*, submetidas a diferentes concentrações de arsênio, durante 15 dias de tratamento. A: Parte aérea. B: Parte submersa. C: Total. Em todos os parâmetros o modelo de regressão ajustado foi o exponencial. Significativo a $p < 0,05$.

5.2. Acúmulo de arsênio e sua distribuição nas plantas

O aumento das doses de As resultou no aumento significativo ($p \leq 0,05$) dos teores de As nas diferentes partes da planta. O acúmulo de As em *S. auriculata* demonstrou que ela remove parte do arsênio em solução nutritiva, sendo que a maior quantidade absorvida se concentra principalmente na parte submersa. Na maior dosagem de As aplicada foi detectado 0,04 mg/gMS de As na parte aérea e 0,4 mg/gMS de As na parte submersa (Figura 4A e 4B). O acúmulo de As foi mais elevado à medida que aumentou a concentração do mesmo na solução. A capacidade de translocar o arsênio absorvido, para a parte aérea da planta foi pequena, ficando quase todo o arsênio absorvido retido na parte submersa.

O fator de translocação de As para a parte aérea das plantas variou entre as concentrações utilizadas, sendo o efeito das doses significativo ($p \leq 0,05$), o resultado, $FT < 1$, indicou pouca translocação para a parte aérea (figura 5). O fator de translocação atingiu valor máximo de 12% no tratamento com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de As.

O FBA foi maior que 1 em todas as concentrações (Figura 6), indicando que uma quantidade considerável de As foi acumulada, mas a maior parte desse elemento absorvido ficou retida na parte submersa. O FBA foi maior na maior concentração de As aplicada.

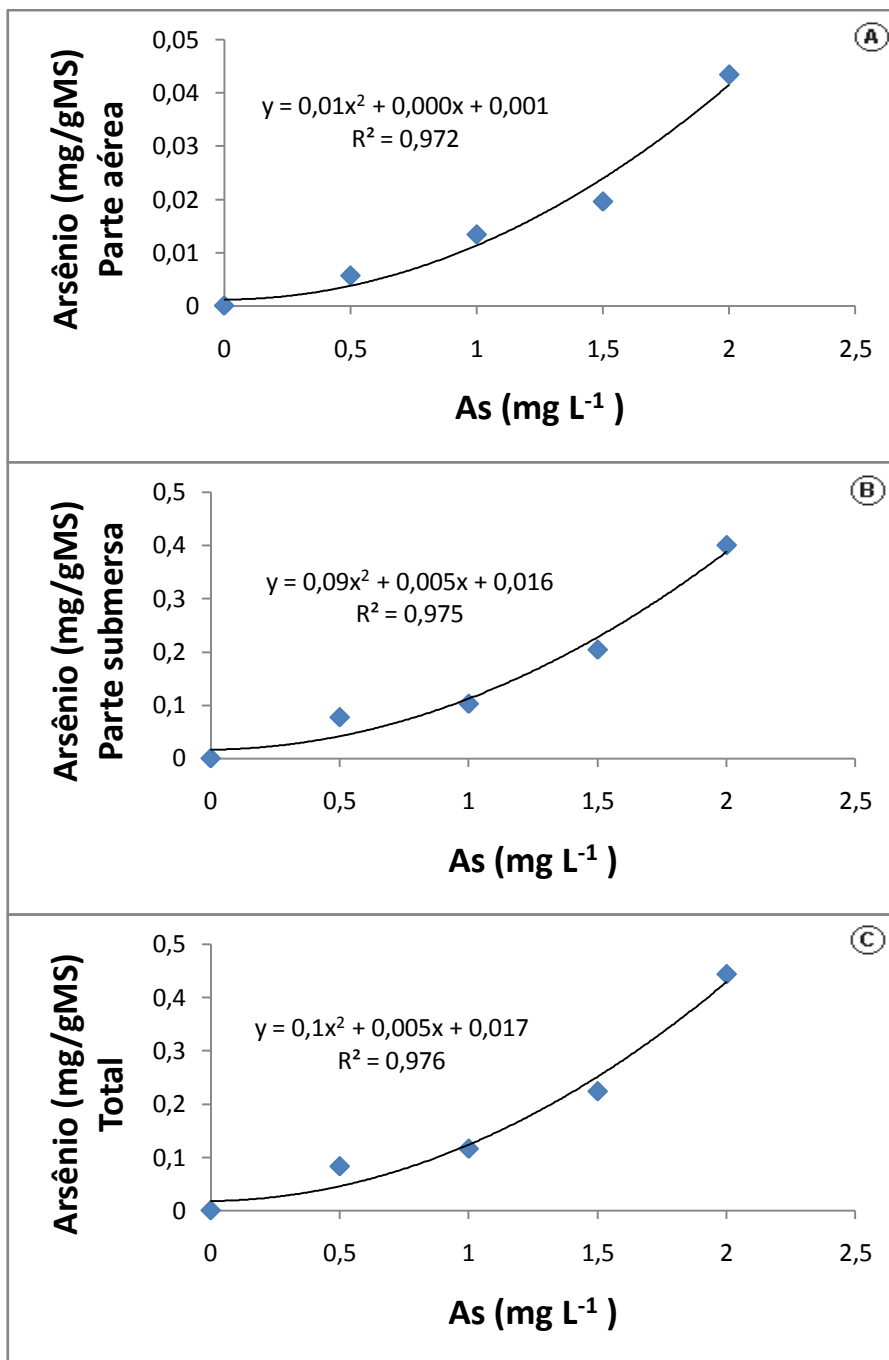


Figura 4 – Concentração de arsênio em plantas de *Salvinia auriculata* submetidas a diferentes concentrações de arsênio, durante 15 dias de tratamento. A: Parte aérea. B: Parte submersa. C: Total. Em todos os parâmetros o modelo de regressão ajustado foi o polinomial quadrático. Significativo a $p < 0,05$.

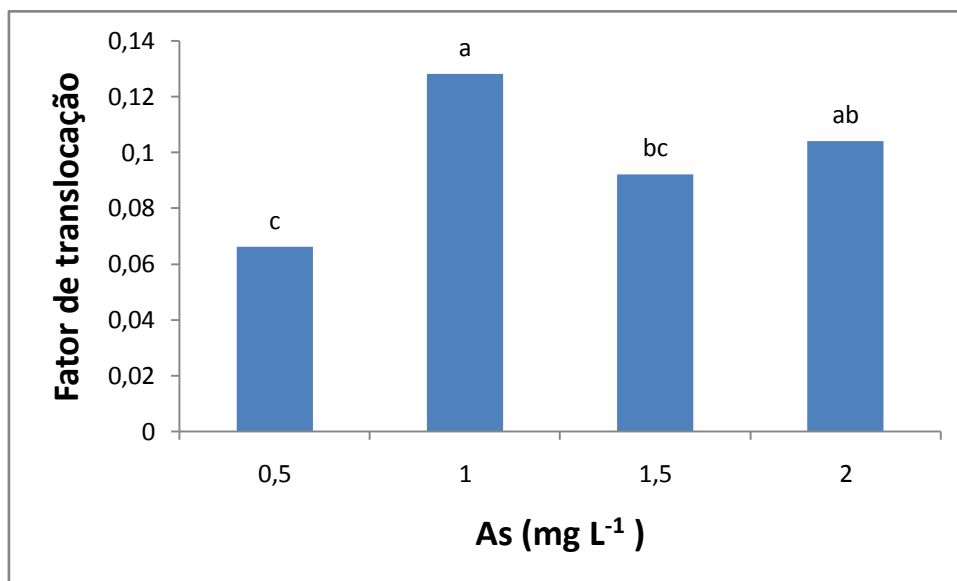


Figura 5 - Fator de translocação (FT) de plantas de *Salvinia auriculata* tratadas com diferentes concentrações de arsênio, durante 15 dias de tratamento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

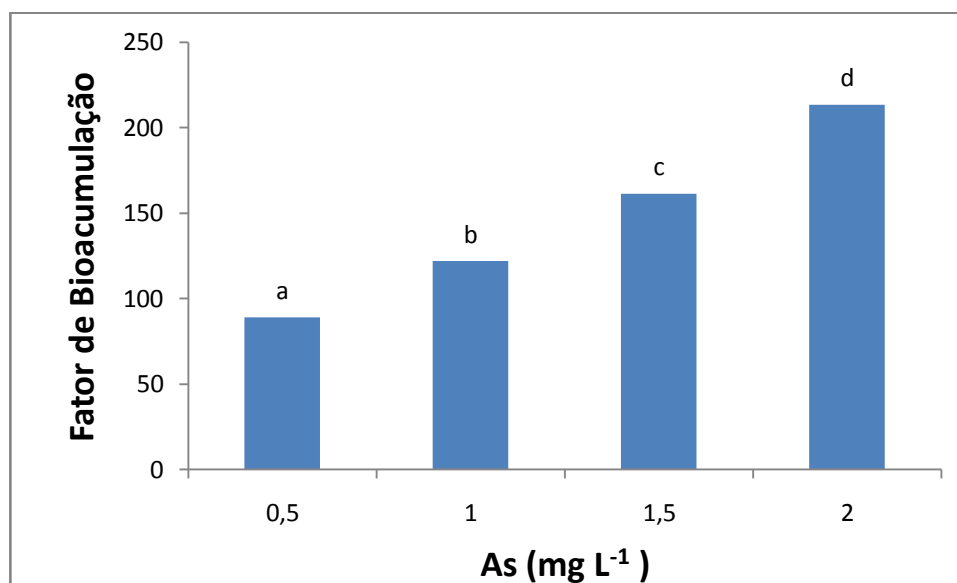


Figura 6 - Fator de bioacumulação (FBA) de plantas de *Salvinia auriculata* tratadas com diferentes concentrações de arsênio, durante 15 dias de tratamento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

5.3. Caracterização anatômica

Comparadas ao controle (Figuras 7A, 7C, 7E e 7G) as alterações ocorridas na nervura mediana das folhas emersas de *S. auriculata* (Figuras 7B, 7D, 7F e 7H) foram evidentes. Pôde-se verificar o desarranjo no aerênquima e colapso de algumas células da epiderme (Figura 7B). Foi observado, na nervura mediana da folha do primeiro nó, acúmulo de conteúdos com coloração azul-esverdeada (metacromasia) nas células do feixe vascular, nas concentrações mais elevadas de As (Figura 7D). Verificou-se maior quantidade de células com conteúdos mais intensamente corados pelo azul de toluidina no xilema e maior espessamento da parede dos elementos de vaso (Figura 7D).

No limbo foliar das folhas emersas de *S. auriculata* pôde-se constatar alterações (Figuras 8B, 8D, 9A, 9C e 9E) diferentemente do controle (Figuras 8A, 8C, 9B e 9D). No primeiro nó, a arquitetura do parênquima se modificou com o aumento das lacunas do aerênquima (Figura 8B). Houve colapso das células da epiderme da face adaxial da folha e de porções do mesofilo, exibindo a região inferior da folha com alterações menos drásticas (Figuras 9C). Na figura 9A, é possível visualizar a região sadia da folha emersa e a região afetada. Além de alterações nas células da epiderme verifica-se um acúmulo de conteúdos fortemente corados (Figura 9E).

As observações nas folhas modificadas também diferiram do controle (Figuras 10A e 10C). No primeiro nó, as células mais prejudicadas foram as do parênquima cortical e da epiderme. O sistema vascular e a endoderme se mantiveram íntegros, mas parte do córtex e da epiderme se modificou (Figura 10B).

A análise microscópica das folhas do quarto nó não mostrou danos significativos em seus tecidos se comparados aos danos ocorridos nas folhas do primeiro nó. A principal alteração foi a redução na espessura das lacunas e do mesofilo. No limbo do quarto nó foram observadas compactação das lacunas, alterações no padrão de desenvolvimento dos tricomas com pouco desenvolvimento e compactação do mesofilo (Figuras 7F e 8D). Apesar de não haver danos em sua estrutura, as células apresentaram conteúdos fortemente corados pelo azul de toluidina (Figura 7H). Contudo, no quarto nó não houve um desarranjo, mas um desenvolvimento reduzido das células do limbo foliar.

A análise morfométrica mostrou que, nas folhas emersas do primeiro nó, não houve diferença significativa entre a espessura dos tecidos do limbo das plantas

expostas ao As (Tabela 1). Já nas folhas emersas do quarto nó, todos os tecidos do limbo apresentaram menor espessura que o controle. A dose mais baixa de As aplicada foi suficiente para reduzir em 28% a espessura do limbo do quarto nó (Tabela 2).

Foi possível verificar alterações na folha modificada do quarto nó, com aumento no número de células fortemente coradas pelo azul de toluidina. Aparentemente, os cloroplastos se apresentam alterados, com aumentos perceptíveis em seu tamanho e número (Figura 10 D), embora não tenha sido feita uma análise quantitativa.

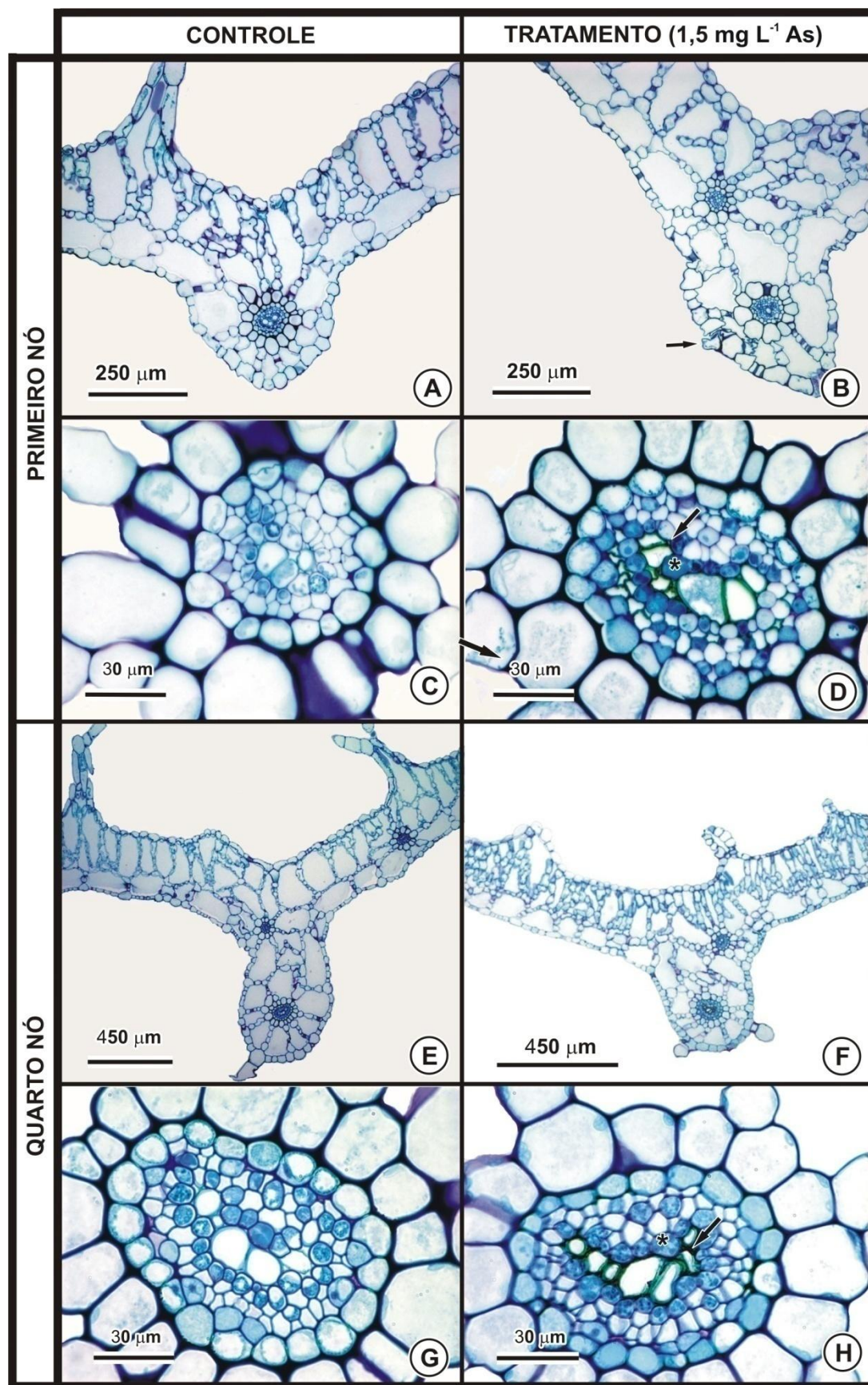


Figura 7 - Folha emersa de *Salvinia auriculata* (cortes transversais corados com azul de toluidina), durante 15 dias de tratamento. **A, C, E e G**: controle. **B, D F e H**: tratamento com 1,5 mg L⁻¹ As. **A a D**: primeiro nó. **E a H**: quarto nó. **B**: Desarranjo no aerênquima e colapso de algumas células (→). **D e H**: Nervura mediana com deformação na parede dos elementos do xilema com coloração esverdeada (→) e acúmulo de substâncias (*). **F**: Diminuição dos espaços das lacunas do aerênquima.

Tabela 1. Morfometria da folha emersa do primeiro nó de *Salvinia auriculata* após exposição a diferentes doses de arsênio.

Arsênio (mg L ⁻¹)	EAD (µm)	M (µm)	EAB (µm)	Limbo (µm)
0	38,32 bc	247,81 ab	33,42 ab	319,57 ab
0,5	40,74 ab	237,83 bc	37,89 bc	316,47 ab
1	34,32 cd	235,02 bc	34,38 ab	303,73 bc
1,5	38,17 bc	235,34 bc	33,94 ab	307,45 bc
2	36,76 bc	222,45 cd	38,57 bc	297,79 cd
CV%	9,2	5,4	9,6	4,9

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. EAD: epiderme adaxial; M: mesofilo; EAB: epiderme abaxial.

Tabela 2. Morfometria da folha emersa do quarto nó de *Salvinia auriculata* após exposição a diferentes doses de arsênio.

Arsênio (mg L ⁻¹)	EAD (μm)	M (μm)	EAB (μm)	Limbo (μm)
0	43,99 a	306,08 a	40,13 a	390.21 a
0,5	39,57 a	205,61 d	33,93 b	279.12 c
1	34,46 b	267,58 b	36,45 ab	338.51 b
1,5	33,17 bc	224,14 c	34,73 b	292.05 c
2	29,14 c	200,66 d	27,36 c	257.17 d
CV%	9,15	4,71	8,97	3,78

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. EAD: epiderme adaxial; M: mesofilo; EAB: epiderme abaxial.

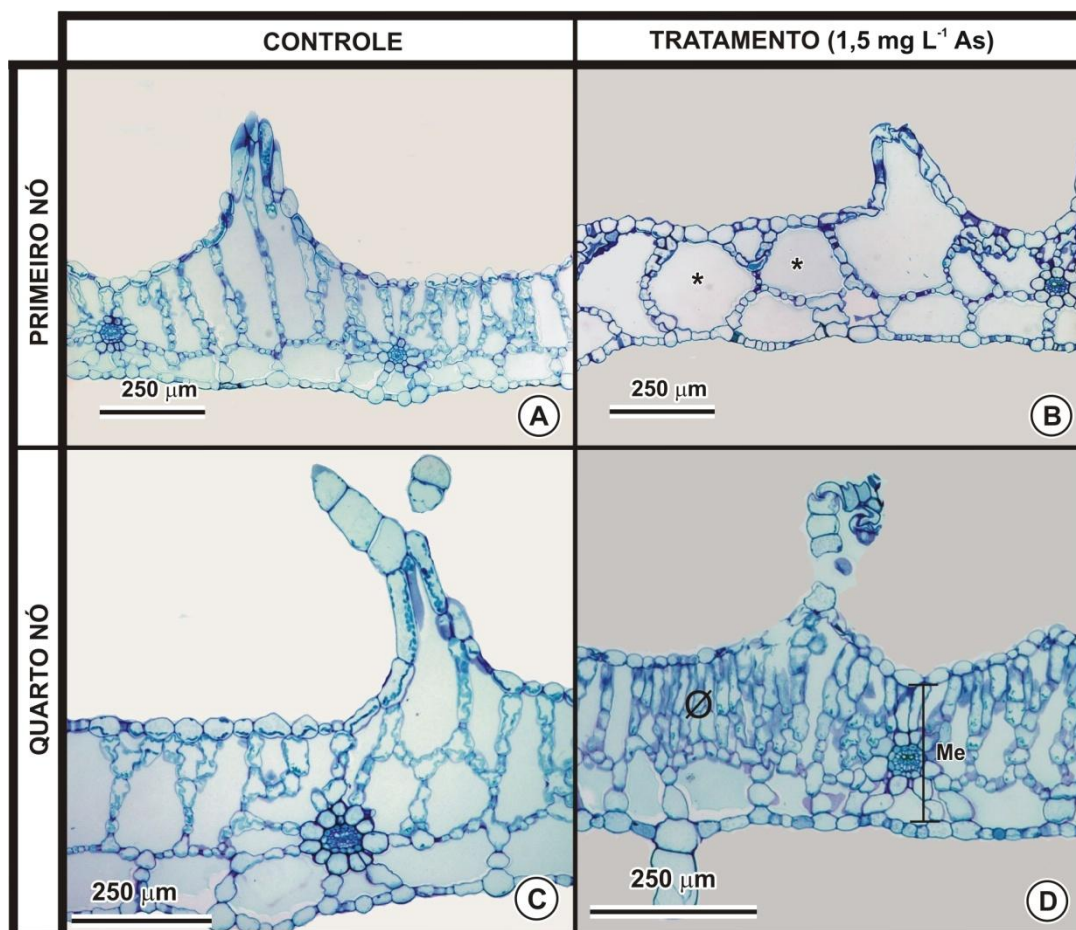


Figura 8 – Limbo foliar da folha emersa de *Salvinia auriculata* (cortes transversais corados com azul de toluidina), durante 15 dias de tratamento. A e C: controle. B e D: tratamento com 1,5 mg L⁻¹ As. A e B: primeiro nó. C e D: quarto nó. B: Desarranjo e aumento das lacunas do aerênquima (*); D: Redução da espessura do mesofilo (Me) e compactação do mesofilo (Ø).

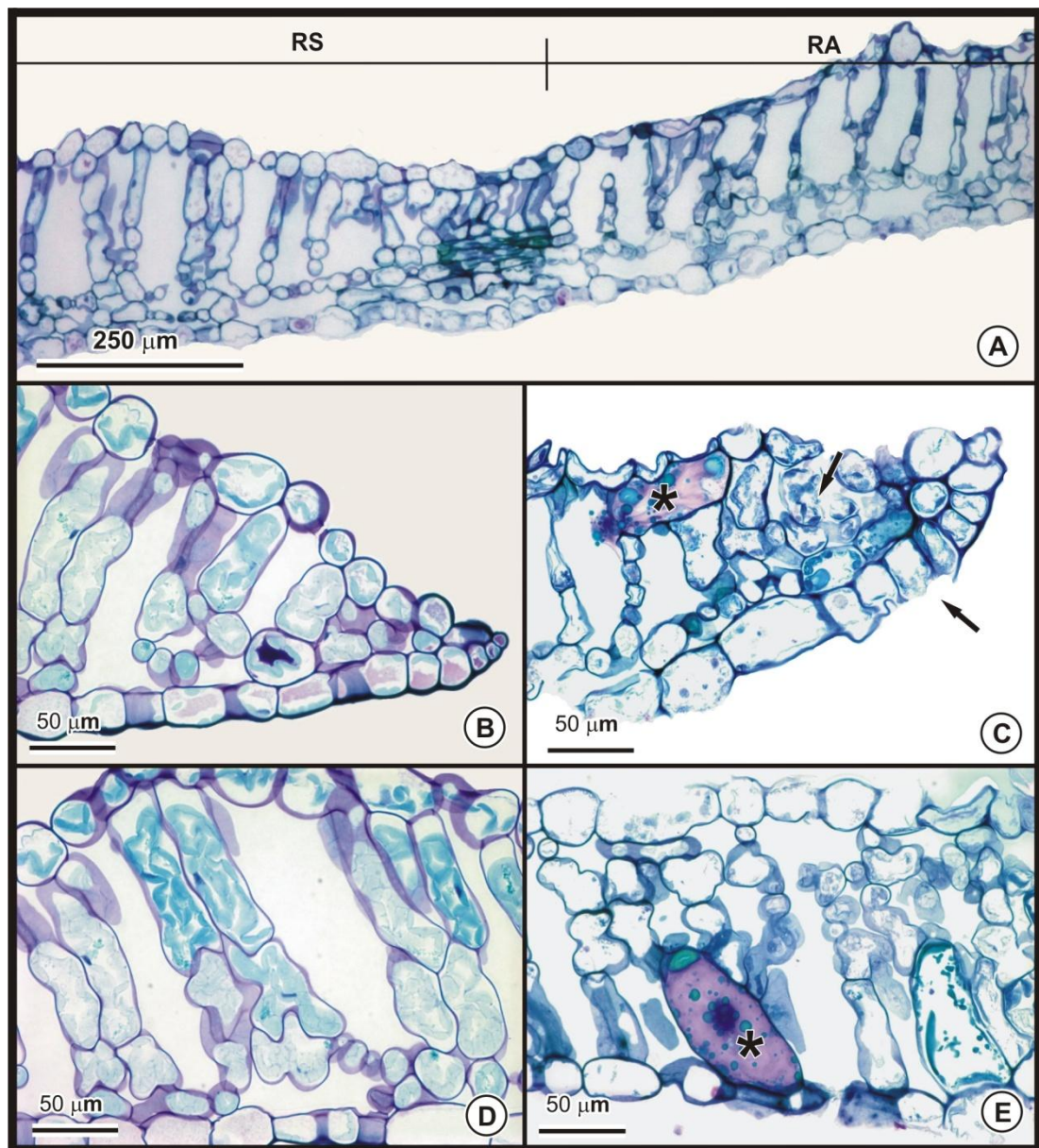


Figura 9 – Lâmina foliar de *Salvinia auriculata* em regiões sintomáticas da folha emersa do primeiro nó (cortes transversais corados com azul de toluidina). Tratamento com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ As. A: Região sadia (RS) e região afetada (RA). B e D: controle. C: Observam-se alterações nas células da epiderme e parênquima ($\rightarrow$) e acúmulo de conteúdos fortemente corados (*).

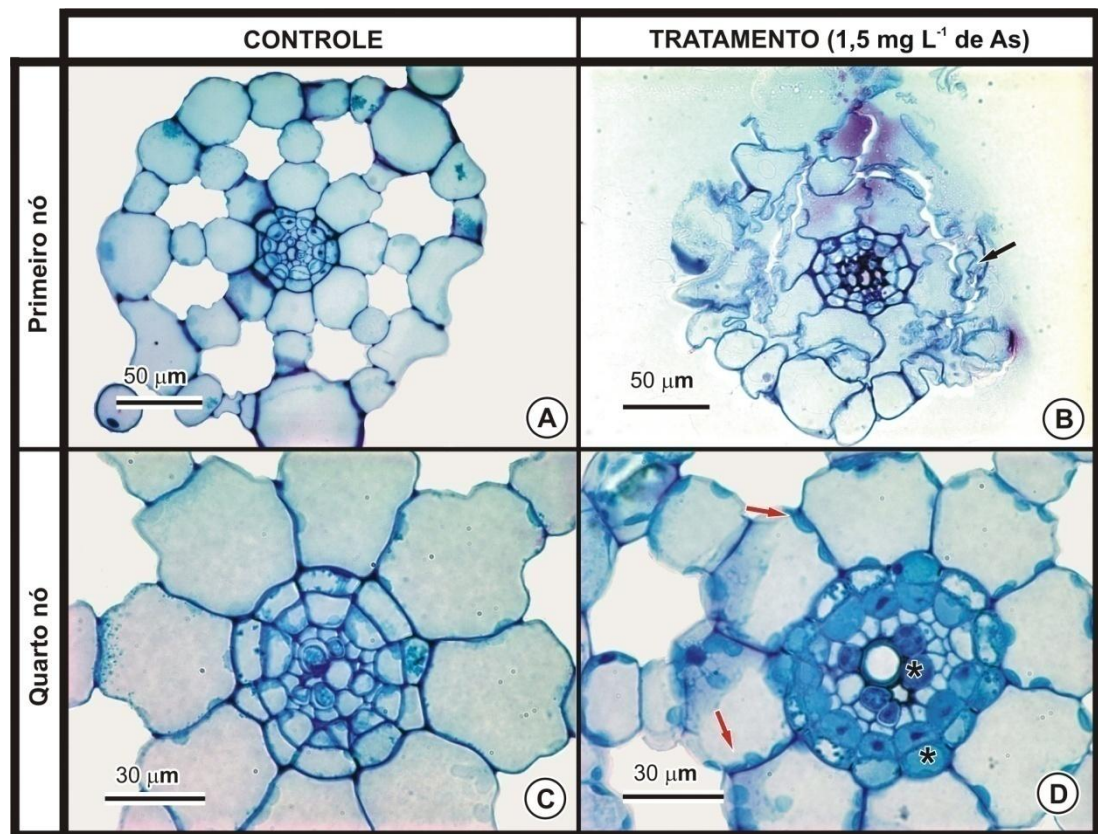


Figura 10 – Folha modificada de *Salvinia auriculata* (cortes transversais corados com azul de toluidina). A e C: tratamento controle. B e D: 1,5 mg L⁻¹ de As em solução nutritiva. B: Células colapsadas (→). D: Alteração nos cloroplastos (→) e muitos conteúdos fortemente corados pelo azul de toluidina (*). A e B: primeiro nó. C e D: quarto nó.

6. DISCUSSÃO

O aumento das doses de As na solução exerceu efeito negativo sobre o crescimento das plantas, refletindo na quantidade de biomassa produzida. Em outras espécies também foi possível verificar a redução na biomassa em resposta ao As (Li et al., 2006; Singh et al., 2006; Nascimento, 2007; Costa, 2007; Liu et al., 2008). A redução no crescimento e na produção de biomassa é um efeito geral da toxicidade dos metais pesados em plantas (Malavolta, 1994). As plantas de *S. auriculata*, portanto, não apresentaram tolerância ao As, pois houve redução na matéria seca da parte aérea e da parte submersa, além de lesões foliares durante o período experimental. As necroses marginais observadas nas folhas emersas também têm sido relatadas em *S. auriculata* na presença de outros poluentes como cádmio (Almeida et al., 2007), flúor (Peixoto et al., 2005) e zinco (Wolff et al., 2009).

A sensibilidade de *S. auriculata* ao arsênio foi confirmada, uma vez que a menor dose deste metalóide, além de causar sintomas visíveis nas folhas expandidas, influenciou negativamente o crescimento das folhas desenvolvidas durante o experimento que, apesar de morfológicamente normais e sem sintomas de cloroses ou necroses, tiveram o tamanho bastante reduzido. Os dados corroboram os de Guimarães et al. (2006) que verificaram a sensibilidade de *S. auriculata* ao arsênio e indicaram a espécie como modelo para estudos de bioindicação. Estes autores constataram que as plantas-mãe foram capazes de emitir plantas-filha morfológicamente normais. Em geral, as monilófitas são acumuladoras, usadas principalmente como fitoextratoras, entretanto, *S. auriculata* é indicada como bioindicadora. Por ser uma monilófita aquática que possui sua estrutura constituída, basicamente, por aerênquimas bem desenvolvidos, apresentando grande quantidade de espaços intercelulares, sua massa seca é menor, o que diminui a possibilidade de acúmulo de As. Ao contrário das monilófitas terrestres, que possuem maior massa seca e maior possibilidade de acumular As.

As análises morfométricas do presente trabalho mostraram interferência negativa no crescimento das plantas-filha (quarto nó) de *S. auriculata*, através da redução na espessura dos tecidos. Enquanto no primeiro nó não foi observada redução significativa na espessura dos tecidos, pois estes não se desenvolveram em solução nutritiva, no quarto nó a redução na espessura dos tecidos foi significativa, indicando que a presença do As não interfere no tamanho das plantas já desenvolvidas, mas ele

interfere no desenvolvimento das plantas que crescem em sua presença. Essa interferência negativa do As no crescimento das plantas pode ter ocorrido em função da competição deste elemento com o fósforo, uma vez que estes elementos competem pelo mesmo sítio de absorção devido às suas similaridades estruturais (Planas & Healey, 1978; Sanders, 1979). O crescimento de *S. auriculata* pode ter sido influenciado pela absorção do As, pois ele substitui o fósforo em processos essenciais na planta. Essa interferência foi observada em *Pteris ensiformis* (Singh & Ma, 2006) e *Schinus terebinthifolius* (Silva, 2008), espécies que apresentaram capacidade de reter arsênio nas raízes e nas quais a absorção de fósforo diminuiu com o aumento da concentração de arsênio. Estudos futuros de quantificação de As nas plantas do quarto nó são necessários para ratificar essas observações.

Sintomas de toxidez do As, podem ser também, atribuídos à indução de estresse oxidativo nas raízes, como observado em *Eichhornia crassipes* (Andrade, 2011). Em plantas de *Cajanus cajan*, estudos envolvendo atividades de enzimas antioxidativas, mostraram queda significativa na ação destas enzimas após exposição ao arsênio (Felipe, 2007). A queda destas enzimas pode estar relacionada aos danos sofridos por esta espécie, provocados pelo estresse oxidativo, em função de injúrias no sistema radicular, o que, conseqüentemente, levou à redução na biomassa. Estes danos podem ter influenciado a absorção de água e nutrientes em *S. auriculata*, implicando na diminuição do teor de fósforo nas folhas. No sistema radicular das plantas de *Cajanus cajan* (Silva, 2008) foram observadas injúrias tais como escurecimento, diminuição de raízes laterais e aspecto gelatinoso nas raízes. No presente trabalho, foram encontradas respostas similares, como escurecimento e aspecto gelatinoso das folhas modificadas, que em *S. auriculata*, funcionam como sistema radicular.

Plantas tolerantes, que acumulam poluentes em seus tecidos, como metais pesados e metalóides, podem ser utilizadas em estratégias efetivas de fitorremediação (Lewis, 1995). Esta capacidade, avaliada por meio dos fatores de bioacumulação (FBA) e de translocação (FT), deve ser relacionada com o acúmulo de biomassa das plantas estudadas. *S. auriculata* não demonstrou capacidade para translocação do arsênio, uma vez que apresentou $FT < 1$. Esse comportamento também foi constatado em *Schinus terebinthifolius* e *Cajanus cajan* (Silva, 2008), o que pode estar relacionado a mecanismos de controle interno, evitando que o As seja translocado para os tecidos metabolicamente ativos da parte aérea. As plantas de *S. auriculata* apresentaram maior quantidade relativa de As na parte submersa, mais

provavelmente na folha modificada, já que ela funciona como raiz. De acordo com Hartley-Whitaker et al. (2001), o arsênio é compartimentalizado, principalmente no vacúolo das células da raiz, complexado com arsenito livre ou conjugado com glutathionas ou outros tióis.

Outros autores também encontraram quantidades maiores de As nas raízes (Silva, 2008; Melo et al., 2009). Estudos têm demonstrado que os metais pesados também podem ser adsorvidos nas paredes celulares de tecidos radiculares, dentre eles, o xilema (Vásquez et al. 1992; Wójcik et al. 2005). A adsorção dos íons metálicos na parede celular é uma das estratégias da planta, que evita a translocação destes íons para a parte aérea (Gomes et al., 2011). O aumento na espessura das paredes celulares pode estar associado ao aumento da lignificação em raízes, o que tem sido verificado em resposta a íons metálicos (Ederli et al. 2004; Lux et al. 2004), devido à possível deposição do metal. O aumento do número de células fortemente coradas com azul de toluidina sugere a natureza fenólica dos conteúdos observados. O acúmulo de fenóis tem sido interpretado como mecanismo de defesa das plantas (Vaughn & Duke, 1984), a poluentes em geral e também a vários outros fatores causadores de estresse (Silva, 2008). De acordo com Larcher (2000), os mecanismos de tolerância das plantas a metais pesados podem variar desde a imobilização do metal no meio extracelular até imobilização do metal no vacúolo, com o auxílio de fitoquelatinas. Entretanto, são necessários estudos futuros de histoquímica para detecção do As, possivelmente no vacúolo das células da raiz.

Apesar da menor concentração de As na parte aérea, os danos causados nessa região foram evidentes. O funcionamento das raízes pode ter sido comprometido pelas alterações morfológicas obtidas como resposta ao arsênio, interferindo na absorção e translocação de água e nutrientes para a parte aérea (Carbonell-Barrachina et al., 1997). Como as folhas submersas absorvem água e nutrientes (Sculthorpe, 1967), podem concentrar teores consideráveis de íons em seus tecidos, como acontece nas raízes verdadeiras. Embora apresente $FBA > 1$, *S. auriculata* não deve ser considerada bioacumuladora, em razão de ser uma espécie muito sensível ao As, que promove danos severos e podem ocasionar a morte das plantas. Além disso, ela apresenta uma pequena biomassa. Os resultados indicam que esta espécie poderia reter este elemento em suas folhas modificadas, mas teve sua biomassa influenciada negativamente com a exposição do arsênio, o que não é um bom indicador para uso em fitorremediação.

Os resultados obtidos após exposição ao arsênio demonstraram alterações anatômicas mesmo quando não foram observadas alterações macroscópicas, reforçando assim, a importância dos estudos anatômicos para o diagnóstico da injúria por poluentes e para o entendimento dos mecanismos de fitotoxicidade (Soikkeli, 1981), conforme verificado em outros estudos com outros poluentes (Santos, 2008; Silva, 2008).

Os cloroplastos em *S. auriculata* se mostraram aparentemente alterados tanto em número quanto em tamanho nas folhas submersas. Apesar de não terem sido feitas avaliações quantitativas, o aumento no número e no tamanho dos cloroplastos foram evidentes o que indica a necessidade de uma análise ultraestrutural para estudo dessas alterações. A presença de um número maior de cloroplastos nas folhas modificadas pode ser devido à redução da biomassa da parte aérea das plantas cultivadas na presença do As e maior incidência da luz solar sobre essas folhas induzindo uma maior diferenciação dos proplastídeos ou uma reversão de amiloplastos a cloroplastos. No tratamento controle, a proliferação e o desenvolvimento da planta foram normais, ocupando toda a superfície da solução nutritiva no balde de cultivo e reduzindo a entrada de luz. Trabalhos de Simola (1997) e Li et al. (2006) relataram alterações estruturais em cloroplastos, após exposição ao arsênio, como arredondamento da organela, acúmulo de amido, desorganização com ruptura do sistema de membranas, indicando a sensibilidade do cloroplasto ao arsênio.

A eventual morte das folhas na maior concentração de As foi também observada em *S. auriculata* exposta a níveis tóxicos de cádmio (Oliveira et al. 2001). As alterações causadas por poluentes nas plantas mais citadas na literatura são: aumento ou diminuição na produção de algumas enzimas, alterações genéticas, alterações quantitativas e qualitativas de metabólitos, distúrbios na fotossíntese, entre outros (Pasqualini et al., 2003; Gerosa et al., 2003; Klumpp et al., 2006). Como consequência, surgem sintomas como clorose e necrose em tecidos e órgãos, que podem evoluir e levar as plantas à morte.

As alterações na anatomia e na micromorfologia de *S. auriculata* em resposta ao arsênio foram evidentes, demonstrando que estas ferramentas podem ser usadas no prognóstico de injúria por As. Sobretudo, é fundamental a utilização desses dados em conjunto com análises fisiológicas e ultraestruturais, para elucidar a fitotoxidez causada por este poluente.

7. CONCLUSÕES

- A sensibilidade de *S. auriculata* foi confirmada, uma vez que a menor dose de arsênio utilizada foi suficiente para influenciar negativamente o metabolismo desta espécie, que poderia ser útil em processos de biomonitoramento ambiental.

- *S. auriculata* apresentou elevado FBA o que indica que esta planta tem alta capacidade de extrair arsênio da solução nutritiva, porém na presença do poluente, tem seu crescimento severamente afetado, o que compromete o acúmulo de biomassa. Desta forma não se trata de uma espécie indicada para fitorremediação de ambientes contaminados por As.

- As alterações anatômicas nas folhas emersas e nas folhas modificadas de *S. auriculata* foram evidentes. No primeiro nó pôde-se verificar desarranjo no aerênquima, colapso das células da epiderme da face adaxial da folha e de porções do mesofilo, acúmulo de conteúdos nas células do feixe vascular, maior espessamento da parede dos elementos de vaso. No quarto nó a principal alteração foi a redução na espessura das lacunas e do mesofilo. Essas alterações podem ser utilizadas no diagnóstico das injúrias e para o entendimento dos mecanismos de fitotoxicidade pelo As.

- São necessários mais estudos, principalmente ultraestruturais, que possam elucidar os danos ocorridos na anatomia de *S. auriculata* e os mecanismos de fitotoxicidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNATHY, C.O.; LIU, Y.P.; LONGFELLOW, D.; et al. 1999. Meeting on arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues, Hunt Valley, Maryland, 22–24 September 1997, **Environmental Health Perspectives**, 107:593–597 .

ADRIANO, D. C. 1986. Trace elements in the terrestrial environment. New York, **Springer Verlag**. 533p.

AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; AZEVEDO, A.A.; FERREIRA, R.S. 2007. Anati Quanti: Quantitative Analysis Software for Plant Anatomy Studies. **Planta Daninha**, 25(4):649-659.

ALMEIDA, G. W.; PEREIRA, G. C.; CASTRO, E. M.; CARVALHO, J. G.; LOUZADA, J. N. C. 2007. Estudo laboratorial do potencial bioindicador de salvinia auriculata em água contaminada por cádmio. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu, MG, de 23 a 28 de setembro de 2007.

ANDRADE, H. M. 2011. **Óxido nítrico e tolerância ao arsênio em aguapé**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. 38p.

ARNDT, U.; SCHWEIZER. 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *In: Signals from the environment*. Ellenberg *et al.* (eds.). **Biological Monitoring**. Vieweg, Eschborn, p. 199-298.

BARRA, C.M.; SANTELLI, R.E.; ABRÃO, J.J.; GUARDIA, M. DE LA. 2000. Especiação de arsênio - uma revisão. **Química Nova**, 23(1).

BORBA, R.P. 2002. **Arsênio em ambiente superficial: processos geoquímicos naturais e antropogênicos em uma área de mineração aurífera**. Tese de Doutorado da Universidade Estadual de Campinas, Brasil. 113 p.

BORBA, R.P.; FIGUEIREDO, B.R.; CAVALCANTI, J.A. 2004. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **Revista Escola de Minas**, 57(1):45-51.

CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; BURLÓ, F.; BURGOS-HEMÁNDEZ, A.; LÓPEZ, E.; MATAIX, J. 1997. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Scientia Horticulturae**, 71:167-176.

COSTA, A. C. 2007. **Bases fisiológicas da ação do arsênio em algumas espécies de cerrado**. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 78p.

DE TEMMERMAN, L., BELL, J.N.B., GARREC, J. P., KLUMPP, A., KRAUSE, G.H.M.; TONNEIJCK, A.E.G. 2004. **Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future**. In: Urban air pollution, bioindication and environmental awareness. A. Klumpp, W. Ansel. & G. Klumpp (eds). Cuvillier Verlag. Göttingen, 337-373.

EDERLI, L.; REALE, L.; FERRANTI, F.; PASQUALINI, S. 2004. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. **Physiologia Plantarum**, 121: 66-74.

FAYIGA , A. O.; MA, L. Q. 2005. Arsenic uptake by two hyperaccumulator ferns from four arsenic contaminated soils. **Water, Air and Soil Pollution**, 168(1):71-89.

FELIPE, R. T. A. 2007. **Crescimento e respostas antioxidantes em espécies leguminosas submetidas ao arsênio**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 29p.

FERREIRA, D. F. 2003. Sisvar: versão4.2. Lavras: UFLA.

FORNO, I.W.; HARLEY, K.L.S. 1979. The occurrence of *Salvinia molesta* in Brazil. **Aquatic Botany**, 6:185-187.

GEROSA, G., MARZUOLI, R., BUSSOTTI, F., PANCRAZI, M.; BALLARINDENTI, A. 2003. Ozone sensitivity of *Fagus sylvatica* and *Fraxinus excelsior* young trees in relation to leaf structure and foliar ozone uptake. **Environmental Pollution**, 125: 91-98.

GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. S. E M.; NOGUEIRA, M. O. G.; SILVA, G. H.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.. 2011. Efeitos dos rejeitos da indústria de zinco na anatomia e crescimento de plantas jovens de *Salix humboldtiana* Willd. (salgueiro). **Hoehnea**, 38(1): 135-142.

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

GONZAGA, M. I. S.; SANTOS, J. A.; MA, L. Q. 2006. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. **Scientia Agricola**, 63(1): 90-101.

GUIMARÃES, F.P.; GOMES, C.Q.; MAGALHÃES, A.B.S.; FREITAS, T.V.; OLIVEIRA, J.A.; AGUIAR, R. 2006. Estudos Laboratoriais de Acúmulo e Toxicidade de Arsênio em *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, 1(2):109-113.

HARTLEY-WHITAKER, J.; AINSWORTH, G.; VOOIJS, R.; TEN-BOOKUM, W.; SCHAT, H.; MEHARG, A. A. 2001. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus Lanatus*. **Plant Physiology**, 126(1):299-306.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. 2006. Composição química de macrófitas aquáticas flutuantes utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Planta Daninha**, 24(1):21-28.

HUANG, R. Q.; GAO, S. F.; WANG, W. L.; STAUNTON, S.; WANG, G. 2006. Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in

Fujian Province , Southeast China. **Science of the Total Environment**, 368 (1):531-541.

KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27(2):137-138.

KLUMPP, A.; ANSEL, W.; KLUMPP, G.; FOMIN, A. 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). **Revista Brasileira de Botânica**, 24:511-518.

KLUMPP, A., ANSEL, W., KLUMPP, G., CALATAYUD, V., CARREC, J.P., HE, S., PEÑUELAS, J., RIBAS, A., RO-POULSEN, H., RASMUSSEN, S., SANZ, M.J.; ERGNE, F. 2006. Tradescantia micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. **Environmental Pollution**, 139: 515-522.

KUMAGAI, Y.; SUMI, D. 2007. Arsenic: Signal Transduction, Transcription Factor, and Biotransformation Involved in Cellular Response and Toxicity. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, 47: 243–262.

LARCHER, W. 2000. **Ecofisiologia vegetal**. RiMa Editora, São Carlos. 531p.

LEMO, J.L.S.; OLIVEIRA, S.D.; SHCLITTLER, L.A.F.S.; JÚNIOR, N.P. 2009. Técnicas de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. **Diálogos & Ciência**. Ano II, 11.

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

LI, W. X.; CHEN, T. B.; HUANG, Z. C.; LEI, M.; LIAO, X. Y. 2006. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Chemosphere**, 20:134-140.

LIÈVREMONT, D.; BERTIN, F.N.; LETT, M.-C. 2009. Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. **Biochimie**, 91:1229–1237.

LIU, Q.; HU, C.; TAN, Q.; SUN, X.; LIANG, Y. 2008. Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions. **Journal of Environmental Sciences**, 20(1):326-331.

LUX, A.; SOTTNIKOVÁ, A.; OPATRŇÁ, J.; GREGER, M. 2004. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, 120: 537-545.

MA, L. Q.; KOMAR, K. M.; TU, C.; ZHANG, W.; CAI, Y.; KENNELLEY, E. D. A. 2001. Fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature**, 409 (1):579.

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

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. 2002. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, 58(1):201-235.

MARIN, A. R.; MASSCHELEYN, P. H.; PATRICK, J. R. W. H. 1993. Soil redox-pH stability of arsenic species and its influence on arsenic uptake by rice. **Plant Soil**, 152: 245-253.

MELLO, J. W. V.; DIAS, L. E.; DANIEL, A. M.; ABRAHÃO, W. A. P.; DESCHAMPS, E.; SHAEFER, C. E. G. R. 2006. Avaliação preliminar de drenagem ácida no estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 30(2):365-375.

MELO, R. F.; DIAS, L. E., MELLO, J. W. V de ; OLIVEIRA, J. A. de. 2009. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33:455-465.

NASCIMENTO, K. J. T. 2007. **Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformes* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 36p.

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

OLIVEIRA, D. L.; ROCHA, C.; MOREIRA, P.C.; MOREIRA, S. O. L. 2009. Plantas nativas do cerrado: uma alternativa para fitorremediação. **Estudos**, 36(11):1141-1159.

PASQUALINI, S., PICCIONI, C., REALE, L., EDERLI, L., TORRE, G.D.; FERRANTI, F. 2003. Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. **Plant Physiology**, 133: 1122-1134.

PEDRALLI, G. 1989. Aguapé. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, 9(53):76-77.

PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D. S.; ANTUNES, F. 2005. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40(8):727-734.

PILON-SMITS, E. 2005. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, 56:15–39.

PLANAS, D.; HEALEY, F. P. 1978. Effects of arsenate on growth and phosphorus metabolism of phytoplankton. **Journal of Phycology**, 14:337-341.

RODRIGUES, D.; MOERI, E. 2007. **Áreas Contaminadas - Remediação e Revitalização**. Editora: Signus. - 3ª edição.

ROY, J. 2008. Economic benefits of arsenic removal from ground water — A case study from West Bengal, India. **Science of the total environment**. 397:1-12.

SANDERS, J. G. 1979. Effects of arsenic speciation and phosphate concentration on arsenic inhibition of *Skeletonem costatum* (Bacillariophyceae). **Journal Phycology**, 15: 424-428.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; SILVA, L. C.; AZEVEDO, A. A.; AGUIAR, R. 2006. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49(2):313-321.

SANTOS, B. F. S. 2008. Avaliação dos efeitos fitotóxicos do flúor em *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae), espécie tropical sensível. Tese de doutorado da Universidade Federal de Viçosa. 102 p.

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

SILVA, K. L. F. 2008. **Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio**. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Botânica. 109 p.

SIMOLA, L. K. 1997. The effect os lead, cadmium, arsenate, fluoride ions on the growth and fine structure of *Sphagnum nemoreum* in aseptic culture. **Canadian Journal of Botany**, 55(4):426-435.

SIMON, T.; EBERHARD, A.; ROHR, R. 2000. Effect of Ni and As on radish tuber cultivated on artificially polluted soils. **European Journal of soil Biology**, 36(1):73-80.

SINGH, N.; MA, L. Q. 2006. Arsenic speciation, and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris Vittata* L. and nonhyperaccumulator *Pteris ensiformis* L. **Environmental Pollution**, 141(1):238-246.

SINGH, N.; MA, L. Q.; SRIVASTAVA, M. 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. **Plant Science**, 170:274-282.

SOIKKELI, S. 1981. Comparison of cytological injuries in conifer needles industrial environments in Finland. **Annales Botanici Fennici**, 18:47-61.

TAPIO, S. & GROSCHE, B. 2006. Arsenic in the etiology of cancer. **Mutation Research**, 612:215-246.

THOMÉ, L. C. P. 2008. Bioacumulação de íons de Pb^{+2} na macrófita salvinia auriculata. Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste. 109p.

TU, C.; MA, L. Q.; BONDADA, B. 2002. Plant and environmental interactions: Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. **Journal of Environmental Quality**, 31(1):1671-1675.

VÁSQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.H.; BARCELÓ, J. 1992. Ultrastructural effects and localization of low cadmium concentrations in bean roots. **New Phytologist** 140:350-355.

VAUGHN, K.; DUKE, S. O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, 60:106-112.

VIDAL, B. C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Molecular Biology**, 22:45-64.

VITORIA, A. P.; RODRIGUEZ, A. P. M.; CUNHA, M.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. 2003. Structural changes in radish seedlings exposed to cadmium. **Biologia Plantarum**, 47(4):561-568.

VITORIA, A. P.; CUNHA, M.; AZEVEDO, R. A. 2006. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, 58(1):47-52.

WHO – World Health Organization. Exposure to arsenic: A major public health concern, 2010. Acesso em fevereiro de 2012. Disponível em http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/arsenic/en/

WÓJCIK, M.; VANGRONSVELD, J.; D’HAEN, J.; TUKIENDORF, A. 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. **Environmental and Experimental Botany**, 53: 163-171.

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

WOLFF, G., PEREIRA, G. C.; CASTRO, E.M.; COELHO, F.F. 2009. Potencial fitorremediador de *Salvinia auriculata* na presença de Pb. **Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia**, São Lourenço – MG, 10 a 13 de Setembro.

WOOLSON E. A.; AXLEY, J. H.; KEARNEY, P. C. 1971. Correlation between available soil arsenic, estimated by six methods, and response of corn (*Zea mays* L.). **Soil Science Society of América**, 35: 101-105.