

CLAUDINEIA LIZIERI DOS SANTOS

**ACÚMULO E TOXIDEZ DE MANGANÊS EM MACRÓFITAS
AQUÁTICAS FLUTUANTES LIVRES**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-graduação em Botânica,
para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

CLAUDINEIA LIZIERI DOS SANTOS

**ACÚMULO E TOXIDEZ DE MANGANÊS EM MACRÓFITAS AQUÁTICAS
FLUTUANTES LIVRES**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-graduação em Botânica,
para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de março de 2009.

Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Co-orientador)

Prof^a. Aristéa Alves Azevedo
(Co-orientadora)

Pesq. Sylvia Therese Meyer Ribeiro

Pesq. Kacilda Naomi Kuki

Prof^a. Rosane Maria de Aguiar Euclides
(Orientadora)

Àqueles que acreditam....que longe se vai sonhando demais...

Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas (Friedrich Nietzsche).

AGRADECIMENTOS

Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A minha orientadora Prof^a Rosane Aguiar, a qual devo todo o meu respeito e admiração, obrigada por me receber nesta Instituição, por acreditar em mim e especialmente pelo “bom dia Claudinéia!!” recebido durante todo esse tempo de convivência.

Aos meus co-orientadores, Prof^a Aristéa Alves Azevedo e Prof^o Juraci Alves de Oliveira, pelo apoio recebido, o qual foi de extrema importância para a realização desse trabalho.

Aos membros da banca, Dr^a Kacilda Naomi Kuki, obrigada pelos inúmeros momentos de aprendizado que me foi proporcionado, obrigada pela contribuição não só na construção deste trabalho, mas na construção de uma profissional que muito aprendeu com você. Obrigada a Dr^a Sylvia Therese Meyer Ribeiro, pelas grandiosas sugestões para melhoria neste trabalho.

Ao Ângelo secretário do programa de pós-graduação, obrigada por solucionar todos os nossos “pepinos”.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, à Dona Edite e toda a Galera de lá, que de forma direta ou indireta contribuíram.

Ao Rogério Gomide e ao João Bosco, por sempre solucionar os nossos problemas técnicos e por toda ajuda que me deram durante a realização deste trabalho.

As mais importantes da minha vida, minha mãe Sirley Lizieri dos Santos e minhas irmãs Adriana e Andréa Lizieri dos Santos, de todo o meu amor, carinho e respeito, obrigada por acreditarem tanto em mim e exigirem tão pouco, motivo de força...

Ao meu cunhado e irmão Edson Benito e meu querido primo Laudénir Savoine, pela ajuda financeira e pelo entusiasmo, sem os quais não seria possível iniciar o curso nesta Instituição, serei eternamente grata a vocês.

Aos amigos “UCPenianos” Michele, Patrícia, Alberto, Renan, Drica, Dudu, Cláudio, Tiago, Patrícia Luisa, Laise, Pity, Simone, Leticia do Anjos e Letícia da Costa, meu muito obrigada pela convivência, pelos momentos de descontração e por de alguma forma terem contribuído para realização deste trabalho.

De uma forma muito especial, agradeço os meus amigos Clénilson, Élcio, Carol, Maione, Elaine, Patrícia de Freitas e Iracénir, além da agradável convivência, obrigada por me socorrerem quando gritei socorro, fico devendo essa a vocês.

Aos amigos Elisângela, Moreno, Jaquelina, Ana Claudia e Alice, pela convivência e força recebida durante minha estadia em “*Viciosa*”.

Aos amigos Mato-grossense, onde tudo se iniciou, meu muito obrigada, as lembranças ainda estão vivas e aguardo o dia que voltaremos a “trabalhar” nas águas pantaneiras!!!

Aquele que chamo de Deus, cuja existência, embora incompreensível, não duvido e sua presença se faz real todos os dias da minha vida.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
 Acúmulo e toxidez de manganês em três macrófitas aquáticas flutuantes livres (<i>Azolla caroliniana</i> Willd, <i>Salvinia minima</i> Baker, <i>Spirodela polyrhiza</i> (L.) Schleiden).....	 5
Resumo.....	6
Abstract.....	6
1. Introdução.....	7
2. Materiais e Métodos.....	9
2.1. Obtenção e aclimação das planta.....	9
2.2. Montagem dos experimentos.....	9
2.3. Sintomatologia visual.....	9
2.4. Análise de crescimento das plantas.....	10
2.5. Determinação de pigmentos: clorofila total e carotenóides.....	10
2.6. Determinação do conteúdo Mn nas plantas.....	10
2.7 Análise estatística.....	11
3. Resultados.....	11
3.1. Sintomatologia.....	11
3.2. Crescimento das plantas.....	13
3.3. Conteúdo de pigmentos: clorofila total e carotenóides.....	14
3.4. Acúmulo de Mn nas plantas.....	17
4. Discussão.....	19
5. Referências Bibliográficas.....	23

Efeitos tóxicos de manganês em <i>Spirodela polyrhiza</i> (L.) Schleiden (Lemnaceae)	26
Resumo.....	27
Abstract.....	27
1. Introdução.....	28
2. Materiais e Métodos.....	30
2.1. Obtenção e aclimação das plantas.....	30
2.2. Montagem dos experimentos.....	30
2.3. Sintomatologia visual.....	30
2.4. Alterações morfo-anotômicas das folhas.....	30
2.5. Análise de crescimento das plantas.....	31
2.6. Determinação de pigmentos: clorofila total, carotenóides e antocianinas.....	31
2.7. Extração de enzimas.....	32
2.8. Atividade das Peroxidases (POX).....	32
2.9. Atividade da Catalase (CAT).....	32
2.10. Determinação do conteúdo Mn nas plantas.....	33
2.11 Análise estatística.....	33
3. Resultados.....	33
3.1. Sintomatologia.....	33
3.2. Caracterização das alterações morfo-anotômicas das folhas.....	33
3.3. Crescimento das plantas.....	37
3.4. Conteúdo de pigmentos.....	37
3.5. Atividade das enzimas Peroxidase (POX) e Catalase (CAT).....	39
3.6. Acúmulo de Mn nas plantas.....	39
4. Discussão.....	40
5. Referências Bibliográficas.....	43
CONCLUSÃO GERAL.....	48

LISTA DE FIGURAS

Acúmulo e toxidez de manganês em três macrófitas aquáticas flutuantes livres (*Azolla caroliniana* Willd, *Salvinia minima* Baker, *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden)

Figura 1. Caracterização da sintomatologia visual das macrófitas aquáticas estudadas.....	12
Figura 2. Taxa de crescimento relativo de plantas de <i>Azolla caroliniana</i> , <i>Salvinia minima</i> e <i>Spirodela polyrhiza</i> , em função de diferentes concentrações de Mn.....	13
Figura 3. Conteúdo de clorofila total em plantas de <i>Azolla caroliniana</i> , <i>Salvinia minima</i> e <i>Spirodela polyrhiza</i> , em função de diferentes concentrações de Mn.....	15
Figura 4. Conteúdo de carotenóides em plantas de <i>Azolla caroliniana</i> , <i>Salvinia minima</i> e <i>Spirodela polyrhiza</i> em função de diferentes concentrações de Mn.....	16
Figura 5. Acúmulo de Mn em plantas de <i>Azolla caroliniana</i> , <i>Salvinia minima</i> e <i>Spirodela polyrhiza</i> em função de diferentes concentrações do metal.....	18

Efeitos tóxicos de manganês em *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden (Lemnaceae)

Figura 1. Caracterização da espécie <i>Spirodela polyrhiza</i> : tratamento controle e tratamento 0,4 mM de manganês (Mn).....	35
Figura 2 – Caracterização anatômica da folha de <i>Spirodela polyrhiza</i> em plantas controle e expostas a 0,4 mM L ⁻¹ de manganês (Mn).....	36
Figura 3. Conteúdo de clorofila total, carotenóides e antocianinas em plantas de <i>Spirodela polyrhiza</i> submetidas a 0,4 mM de Mn e plantas controle.....	38
Figura 4. Atividade enzimática da POX e da CAT em plantas de <i>Spirodela polyrhiza</i> submetidas a 0,4 mM de Mn e plantas controle.....	39
Figura 5. Conteúdo de Mn em plantas de <i>Spirodela polyrhiza</i> submetidas a 0,4 mM de Mn e plantas controle.....	39

RESUMO

SANTOS, Claudineia Lizieri dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Acúmulo e toxidez de manganês em macrófitas aquáticas flutuantes livres.** Orientador: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-orientadores: Aristéa Alves Azevedo e Juraci Alves de Oliveira.

A contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo manganês (Mn) está associada, em grande escala, as ações antrópicas como, processos de manufatura de papel, resíduos de mineração e resíduos de esgoto domésticos. A fitorremediação consiste na utilização de plantas, dentre as quais as macrófitas aquáticas, com potencial para remover, degradar ou inativar contaminantes orgânicos e inorgânicos do meio, minimizando seus efeitos sobre os organismos vivos e o ambiente. O presente estudo avaliou o potencial fitorremediador de três espécies de macrófitas aquáticas: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* e *Spirodela polyrhiza* para acumular Mn em solução. O acúmulo de Mn, o crescimento, o conteúdo de clorofila total e carotenóides foram avaliados nas três espécies submetidas a concentrações crescentes (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 mM) de Mn. As três espécies de macrófitas acumularam Mn em seus tecidos e a absorção foi dependente da concentração do metal em solução. As espécies se diferenciam quanto ao potencial para acumular Mn. *Spirodela polyrhiza* apresentou maiores concentrações de Mn acumulado (17,062 mg g⁻¹ MS), seguida por *S. minima* (4,283 mg g⁻¹ MS) e *A. caroliniana* (1,341 mg g⁻¹ MS). O excesso de Mn causou a redução do conteúdo de clorofila total nas três espécies. O conteúdo de carotenóides diminuiu nas plantas de *A. caroliniana* e *S. polyrhiza*. Entretanto, apenas em *S. polyrhiza* o crescimento foi afetado significativamente. A partir destes resultados, a pesquisa buscou avaliar o efeito tóxico do Mn em *S. polyrhiza*, separadamente. O crescimento relativo, o conteúdo de pigmentos clorofila total, carotenóides e antocianinas, a atividade enzimática da catalase (CAT) e das peroxidases (POX) e alterações anatômicas foram avaliadas em plantas de *S. polyrhiza* expostas a concentração 0,4 mM de Mn. O excesso de Mn em solução reduziu o crescimento das plantas, assim como decresceu significativamente os conteúdos de clorofila total, carotenóides e antocianinas. A atividade da CAT também foi reduzida e a atividade da POX não apresentou diferença entre os tratamentos. A microscopia óptica mostrou um desarranjo nas lacunas do aerênquima em plantas expostas ao Mn. O conteúdo de Mn aumentou significativamente em plantas expostas ao metal (0,157 - 15,830 mg g⁻¹MS). Os resultados mostraram que o excesso de Mn em solução acarretou efeitos tóxicos em plantas de *S. polyrhiza*. A alta concentração de Mn acumulada foi a causa dos efeitos tóxicos observados.

ABSTRACT

SANTOS, Claudineia Lizieri dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009.

Accumulation and toxicity of manganese in free floating aquatic macrophytes. Advisor: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-Advisors: Aristéa Alves Azevedo and Juraci Alves de Oliveira.

The contamination of aquatic ecosystems by manganese (Mn) is greatly associated to human actions, such as the manufacturing processes of paper, waste from mining and domestic waste sewage. The phytoremediation consists of utilizing plants, such as aquatic macrophytes, with the potential to remove, degrade or inactivate organic and inorganic contaminants in the environment, minimizing its effects over it and living organisms. The present research evaluated the potential phytoremediator of three species of aquatic macrophytes: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* and *Spirodela polyrhiza* to accumulate Mn in solution. The accumulation of Mn, growth, content of total chlorophyll and carotenoids were measured in three species submitted to increasing concentrations (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 e 0.4 mM) of Mn. The three macrophytes species accumulated Mn in their tissue and the absorption was dependent on the concentration of metal presented in the solution. The species differed one another as for the potential to accumulate Mn. *Spirodela polyrhiza* showed higher concentrations of Mn accumulated (17,062 mg g⁻¹ MS), followed by *S. minima* (4,283 mg g⁻¹ MS) and *A. caroliniana* (1,341 mg g⁻¹ MS). The excess Mn caused a reduction of total chlorophyll content in the three species. The content of carotenoids decreased in the *A. caroliniana* and *S. polyrhiza*. However, growth only significantly affected the *S. polyrhiza*. Based on these results, the research aimed to evaluate the toxic effect of Mn in *S. polyrhiza* separately. The relative growth, the content of pigments total chlorophyll, carotenoids and anthocyanins, enzymatic activity of catalase (CAT) and peroxidases (POX) and anatomical modifications were evaluated in plants of *S. polyrhiza* which were exposed to the concentration of 0.4 mM of Mn. The excess of Mn in the solution reduced the growth of the plants, and significantly decreased the contents of total chlorophyll, carotenoids and anthocyanins. The activity of the CAT was also reduced and the activity of POX did not present differences among the treatments. Optical microscopy showed disarrangement in the gaps of the aerenchyma in plants exposed to Mn. The content of Mn significantly increased in the plants exposed to the metal (0.157 to 15.830 mg g⁻¹ ms). The results showed that the excess of Mn in solution caused toxic effects on plants of *S. polyrhiza*. The high concentration of Mn accumulated was cause of the toxic effects observed.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O manganês (Mn) é um elemento amplamente distribuído na litosfera, hidrosfera e atmosfera. Presente nas rochas ígneas, sedimentares e metamórficas, é o décimo segundo elemento mais abundante na crosta terrestre (Martins e Lima, 2001).

No solo, o Mn está disponível como micronutriente para os vegetais e outros organismos, porém, a sua disponibilidade depende de seu estado de oxidação. Nos sistemas biológicos pode ser encontrado em três níveis de oxidação: Mn^{2+} , Mn^{4+} (formas estáveis) e Mn^{3+} (forma instável) (Marschner, 1995). O Mn reduzido (Mn^{2+}), geralmente é a forma predominante na solução do solo, dependendo das condições de aeração, umidade e pH, sendo a principal forma absorvida pelas raízes das plantas (Mukaopadhyay e Sharma, 1991; Marschner, 1995). Suas concentrações dependem das características geotérmicas, das transformações ambientais dos compostos de manganês naturalmente presentes, das atividades dos microrganismos e da incorporação pelas plantas (Martins e Lima, 2001).

A disponibilidade do Mn no ambiente, além do seu processo natural, também está relacionada, às ações antrópicas. A contaminação do ambiente aquático por Mn é proveniente, na maioria das vezes, dos resíduos domésticos, atividade de mineração, processo de manufatura de metais, papéis, agentes químicos, além de depósitos de resíduos de esgotos (Thornton, 1995). Na atividade mineradora, o Mn é encontrado em grandes concentrações na água de drenagem das minas (Banks et al., 1997). Nas indústrias, além do uso do metal em alguns processos de fabricação de vidro, desinfetantes e outros, o elemento também é encontrado em descartes de resíduos industriais, os quais são muitas vezes despejados em corpos d'água, sem nenhum tratamento prévio, levando a contaminação do ambiente (Martins e Lima, 2001).

O Mn participa dos processos fisiológicos importantes tanto nos vegetais quanto nos animais. Nos vegetais é um elemento essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas, está relacionado aos processos de respiração, na ativação de várias enzimas, na proteção contra o estresse oxidativo, entre outros (Bowler et al., 1994; Büchel et al., 1999). Enquanto que nos animais é um elemento essencial para a formação dos ossos e a função reprodutiva (Thornton, 1995; Pittman, 2005).

No entanto, mesmo sendo o Mn um micronutriente para as plantas, dependendo da concentração no organismo, pode se tornar altamente tóxico (Boucher e Watzin, 1999; Doyle et al., 2003).

A concentração crítica de Mn, no tecido vegetal, necessária para produzir sintomas de toxidez varia entre as espécies e até mesmo entre seus cultivares (Marschner, 1995). Porém, em algumas plantas, os sintomas associados à toxidez de Mn^{2+} incluem alterações às paredes celulares, necrose do caule e das folhas, diminuição da capacidade fotossintética da planta, crescimento retardado, queima das pontas de folhas e flores e encarquilhamento das folhas (Foy, 1984; Lindon et al., 2004).

As informações relacionadas a acidentes ambientais associados à presença do Mn são escassas. Contudo, estudos têm demonstrado problemas causados à saúde humana quando ocorre exposição excessiva a esse minério. Tem sido relatados sintomas semelhantes a Síndrome de Parkinson, além de infertilidade e disfunção do sistema imune (Crossgrove e Zheng, 2004; Dobson et al., 2004; Gwiazda et al., 2007).

A toxidez por Mn^{2+} é, provavelmente, depois da toxidez de Al^{3+} , o segundo maior fator limitante para crescimento de plantas em solos ácidos, sendo que em valores de pH menores que 5,5 ocorre uma combinação com a toxidez do Al^{3+} (Nogueira, 2001).

Objetivando avaliar o efeito do Mn sobre o metabolismo das plantas (crescimento, fotossíntese e o acúmulo nos tecidos), pesquisas vêm sendo conduzidas (Lindon, 2001; Xue, et al, 2004; Li, et al., 2007; Mine et al., 2007) com o propósito de indicar espécies com potencial para serem utilizadas na fitorremediação de ambientes contaminados por Mn.

A recuperação de áreas contaminadas por metais, pode ser feita por meio de métodos convencionais, tais como, escavação dos solos, seguida de tratamento ou redistribuição em aterros, oxidação química, bombeamento e tratamento de águas subterrâneas e outros (Nyer, 1998). Porém tais procedimentos costumam ser dispendiosos. Por outro lado, a fitorremediação pode ser vista como uma técnica atraente, ecologicamente viável e de menor custo (Raskin e Ensley, 2000; Chaney et al., 2000).

A fitorremediação consiste na utilização de espécies vegetais com potencial para remover, degradar ou isolar contaminantes orgânicos e/ou inorgânicos do meio, tanto em ambientes terrestres como aquáticos. A técnica vem sendo uma alternativa promissora visto que tende a minimizar a destruição e desestabilização do ecossistema, causa baixos impactos ambientais e permite a contínua regeneração da biomassa (Cunningham e Ow, 1996; Williams, 2002).

Dentre os processos da fitorremediação, a rizofiltração constitui um tipo específico que utiliza o sistema radicular das plantas para absorver elementos

contaminantes e mitigar ambientes aquáticos poluídos. As plantas aquáticas geralmente apresentam alta taxa de reprodução vegetativa, crescimento rápido e possuem sistema radicular abundante, que propicia uma maior área de contato com o poluente (Dushenkov et al., 1995; Cunningham e Ow, 1996). Dessa forma a técnica da rizofiltração tem sido considerada muito vantajosa para a fitorremediação de ambientes contaminados.

O Brasil é um país favorável à aplicação dessa tecnologia, pois apresenta condições edafoclimáticas propícias, ambientes aquáticos abundantes e alta diversidade de espécies vegetais. Entretanto, são escassos os estudos e aplicações da fitorremediação. Muitas espécies necessitam ser estudadas a fim de conhecer suas potencialidades para seqüestrar contaminantes do ambiente, principalmente no que se refere ao Mn.

Nesse contexto, a pesquisa buscou avaliar o potencial de três espécies de macrófitas aquáticas: *Salvinia minima* (Baker), *Spirodela polyrhiza* (L.) e *Azolla caroliniana* (Willd) em acumular o Mn, com o propósito de oferecer subsídios para mitigação de águas contaminadas por este metal. Avaliou-se também o efeito tóxico do Mn sobre o crescimento, o conteúdo de pigmentos, atividade enzimática e alterações anatômicas em *Spirodela polyrhiza* exposta ao excesso de Mn.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banks, D., Younger, P.L., Arnesen, R.T., Iversen, E.R., Banks, S.B., 1997. Minewater chemistry: the good, the bad and the ugly. *Environ Geol.* 32, 157-174.
- Boucher, A.M., Watzin, M.C., 1999. Toxicity identification evaluation of metal-contaminated sediments using an artificial pore-water containing dissolved organic carbons. *Environ Toxicol Chem.* 18, 509-518.
- Bowler, C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze, D., 1994. Superoxide dismutase in plants. *Crit Ver Plant Sci.* 13, 199-218.
- Büchel C., Barber J., Ananyev G., Eshaghi S., Watt, R., Dismuke, C., 1999. Photoassembly of the manganese cluster and oxygen evolution from monomeric and dimeric CP47-reaction center photosystem II complexes. *Proc Natl Acad Sci.* 96,14288-14293.
- Chaney, R.L., Li, Y.M., Brown, S.L., Homer, F.A., Malik, M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Chin, M., 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. In: Terry, N., Bañuelos, G., Vangronsveld J, eds. *Phytoremediation of contaminated soil and water.* Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers, pp. 129-158.
- Crossgrove, J., Zheng, W., 2004. Manganese toxicity upon over exposure. *NMR in Biomedicine.* 17, 544-553.
- Cunningham, S., Ow, D. W., 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110, 715-719.
- Dobson, A.W., Erikson, K.M.; Aschner, M., 2004. Manganese Neurotoxicity. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1012, 115-128.

- Doyle, C.J., Pablo, F., Lim, R.P., Hyne, R.V., 2003. Assessment of metal toxicity in sediment pore water from Lake Macquarie, Australia. *Environ Contam Toxicol.* 44, 343-350.
- Dushenkov, V., Kumar, P. B. A. N., Motto, H., Raskin, I., 1995. Rizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ Sci Technol.* 29, 1239-1245.
- Foy, C.D., 1984. Physiological effects of hydrogen, alumin and manganese toxicides in acid soil. In: Adams, F. (Ed.), *Soil Acidity and Liming*, second ed. ASA-CSSA-SSSA, WI, USA, Agronomy Monograph No.12. pp. 57-97.
- Gwiazda, R., Lucchini, R., Smith, D., 2007. Adequacy and consistency of animal studies to evaluate the neurotoxicity of chronic low-level manganese exposure in humans. *J Toxicol Environ. Health.* 70, 594-605.
- Li, M.S.; Luo, Y.P.; Su, Z.Y., 2007. Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. *Environ Pollu.* 147, 168-175.
- Lindon, F. C., 2001. Tolerance of rice to excess manganese in the early stages of vegetative growth. Characterisation of manganese accumulation. *J. Plant Physiol.* 158, 1341-1348.
- Lindon, F. C., Barreiro, M. G., Ramalho, J. C., 2004. Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. *J Plant Physiol.* 161, 1235-1244.
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2. ed. London: Academic, 889 p.
- Martins, I., Lima, I. V., 2001. Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. *Caderno de referência ambiental.* v. 7, 121 p.
- Mine, Y., Boqing, T., Meizhen, T., Aoyama, I., 2007. Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Minerals Engin.* 20, 188-190.
- Mukaopadhyay, M.J.; Sharma, A., 1991. Manganese in cell metabolism of higher plants. *Bot. Rev.* 51, 117-149.
- Nogueira, M. A., 2001. Interações entre micorrizas arbuscular, rizobactérias, fósforo e silício na manifestação da toxidez de manganês em soja. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- Nyer, E., 1998. Groundwater and soil remediation - practical methods and strategies. Ann Arbor Press, Chelsea, Michigan, 226 p.
- Pittman, J.K., 2005. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol.* 167, 733-742.
- Raskin, I., Ensley, B.D., 2000. Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. John Wiley and Sons, Inc., New York, 303p.
- Thornton, I., 1995. Metals in the global environment. 1ed. Ottawa: Int. Council on Metal and the Evironment. 53p.
- Xue, S.G., Chen, Y.X., Reeves, R. D., Baker, A. J.M, Lin, Q., Fernando, D., 2004. Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Environ Pollu.* 131, 393-399.
- Williams, J. B., 2002. Phytoremediation in wetland ecosystems: progress, problems, and potencial. *Critical Rev Plant Sci.* 21, 607-635.

**Acúmulo e toxidez de manganês em três macrófitas aquáticas
flutuantes livres: *Azolla caroliniana* Willd, *Salvinia minima*
Baker e *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden**

Acúmulo e toxidez de manganês em três macrófitas aquáticas flutuantes livres: *Azolla caroliniana* Willd, *Salvinia minima* Baker e *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden

Claudineia Lizieri-Santos^a, Rosane Aguiar^a

^a Universidade Federal de Viçosa

Avenida PH Rolfs, S/Nº, Viçosa, MG, Brasil, CEP: 36 570-000.

clau-lizieri@hotmail.com

Resumo

A remoção de metais pesados da água pode ser realizada por diferentes tecnologias. O uso da fitotecnologia que consiste em utilizar plantas para remoção de metais tem aumentado nas últimas décadas. Três espécies de macrófitas aquáticas flutuantes livres: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* e *Spirodela polyrhiza*, foram utilizadas em experimentos de laboratório para avaliar o potencial das mesmas para acumular manganês (Mn). O experimento foi realizado com concentrações crescentes (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 mM) de Mn e duração de 7 dias. As três espécies acumularam Mn em seus tecidos e a absorção foi dependente da concentração do metal em solução. *Spirodela polyrhiza* apresentou as concentrações mais elevadas de Mn acumulado (17,062 mg g⁻¹ MS), seguida por *S. minima* (4,283 mg g⁻¹ MS) e *A. caroliniana* (1,341 mg g⁻¹ MS). O excesso de Mn causou a redução do conteúdo de clorofila total nas três espécies. O conteúdo de carotenóides diminuiu nas plantas de *A. caroliniana* e *S. polyrhiza*. Apenas em *S. polyrhiza* o crescimento foi afetado significativamente. As espécies *A. caroliniana* e *S. minima* toleram excessos de Mn, entretanto, as plantas foram ineficientes para acumular altas concentrações do metal. O elevado conteúdo de Mn acumulado nos tecidos de *S. polyrhiza* sugere que essa espécie possui potencial para acumular Mn, porém uma resposta de sensibilidade foi observada quando plantas foram expostas as concentrações mais elevadas (0,4 mM) de Mn.

Palavras-chave: macrófitas, toxidez, manganês, acúmulo de metal

Abstract

Accumulation and Toxicity of manganese in three free floating aquatic macrophytes: *Azolla caroliniana* Willd, *Salvinia minima* Baker e *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden

The removal of heavy metal in water can be performed by different technologies. The use of phytotechnology, which consist of utilizing plants in order to remove metals, has increased over the decades. Three species of free floating aquatic macrophytes: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* e *Spirodela polyrhiza*, were used in laboratorial experiments to evaluate the potencial in which those can accumulate manganese (Mn). The experiment was conducted with increasing concentrations (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 e 0.4 mM) of Mn, lasting 7 days. The three macrophytes species accumulated Mn in their tissue and the absorption was dependent on the concentration of metal presented in the solution. *S. polyrhiza* showed higher concentrations of Mn accumulated (17,062 mg g⁻¹ MS), followed by *S. minima* (4,283 mg g⁻¹ MS) and *A. caroliniana* (1,341 mg g⁻¹ MS). The excess Mn caused a reduction of total chlorophyll content in the three species. The content of carotenoids decreased in the *A. caroliniana* and *S. polyrhiza*. Growth only in *S. polyrhiza* was significantly affected. The species *A. caroliniana* and *S. minima* tolerate excess of Mn, however, the plants were inefficient to accumulate high concentrations of metal. The high content of Mn accumulated in the tissues of *S. polyrhiza* suggests that the species has potential to accumulate Mn, but a response of sensitivity was observed when plants were exposed to higher concentrations (0.4 mM) of Mn.

Keyword: macrophytes, toxicity, manganese, accumulation metal

1. Introdução

A presença de metais pesados nos ecossistemas aquáticos causa sérios impactos negativos, não somente sobre as comunidades biológicas integrantes desses ambientes, mas também sobre a saúde da população humana em função da biomagnificação dentro da cadeia trófica e dos efeitos tóxicos (Tavares e Carvalho, 1992; Cabana et al., 1994; Mergler et al. 1994; Doyle et al. 2003). Os metais são considerados contaminantes ambientais relevantes, particularmente em áreas onde há pressão antropogênica, devido, principalmente, a alta toxicidade, alta resistência à degradação e conseqüente persistência no ambiente (Di Toppi e Gabbrielli, 1999; Zagatto e Bertoletti, 2006).

O manganês (Mn) é um elemento traço essencial nos processos fisiológicos, tanto vegetais como animais. Contudo, em concentração elevada ($>5,200 \mu\text{g/L}$) este metal pode se tornar tóxico (Mergler et al. 1994; Boucher e Watzin, 1999; Doyle et al. 2003).

A contaminação do ambiente aquático por manganês (Mn) tem despertado a atenção de pesquisadores e de órgãos governamentais em muitos países, em função da intensificação do despejo deste elemento no meio aquático. A contaminação dos ecossistemas aquáticos por Mn, além da sua ocorrência natural, é proveniente das atividades humanas, por meio dos descartes de resíduos industriais envolvendo os processos de manufatura (metal, papel e agentes químicos), resíduos domésticos e das atividades mineradoras (Thornton, 1995, Banks et al., 1997).

O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) estabelece limites de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Mn total para águas de classe 1 (água destinada para consumo humano, após desinfecção), $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para classe 3 (água destinada para consumo humano, após tratamento convencional) e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Mn dissolvido em lançamento de efluentes. Entretanto, pesquisas têm demonstrado que a concentração deste metal encontrada em águas de regiões de garimpo, água de drenagem das minas, assim como, nos efluentes

industriais, ultrapassam as concentrações estabelecidas pelo CONAMA (Banks et al. 1997; Sisinnio, 2003; Guimarães-Silva et al. 2007).

A recuperação de áreas contaminadas por metais pesados, pode ser feita por meio de vários métodos convencionais, porém esses costumam ser dispendiosos. Por esta razão, a fitorremediação, pode ser vista como uma técnica atraente, ecologicamente viável e de menor custo. Além disso, a técnica por ser aplicada *in situ*, causa mínimas perturbações ambientais (Raskin e Ensley, 2000; Chaney et al. 2000).

Nos últimos anos, os estudos sobre as macrófitas aquáticas têm sido intensificados e demonstrados que esses sistemas vegetais apresentam significativa eficiência na absorção e acúmulo de alguns contaminantes aquáticos. Desta forma, espécies vêm sendo estudadas entre elas, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes*, *Spirodela intermedia* e *Ceratophyllum demersum* (Rai et al. 1995; Miretzky et al. 2004) a fim serem empregadas na tecnologia da fitorremediação de águas contaminadas por metais. Este processo tem sido muito vantajoso, considerando que as plantas aquáticas geralmente apresentam alta taxa de reprodução vegetativa, crescimento rápido e fácil manuseio (Dushenkov et al. 1995; Cunningham e Ow, 1996).

Contudo, pouco se conhece sobre a potencialidade de macrófitas de ecossistemas aquáticos brasileiros para acumular Mn e os efeitos tóxicos deste metal sobre o metabolismo e o desenvolvimento dos vegetais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade diferencial de acúmulo de Mn de três macrófitas flutuantes livres, *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* e *Spirodela polyrhiza*. Os efeitos tóxicos deste metal sobre o conteúdo de clorofila total, carotenóides e a taxa de crescimento, também foram avaliados nas três espécies selecionadas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção e aclimação das plantas

As espécies de *S. minima*, *A. caroliniana* e *S. polyrhiza* foram cultivadas em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas – UCP do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Universidade Federal de Viçosa/MG.

Para adaptação às condições experimentais e a obtenção de biomassa, as espécies foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950), com 1/5 de força iônica, pH mantido entre $6,5 \pm 0,5$, em sala de crescimento de plantas, com temperatura e luz controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $230 \mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), fotoperíodo de 12 horas de luz:escuro, durante 15 dias. A solução nutritiva foi renovada a cada três dias.

2.2. Montagem dos experimentos

Os experimentos foram montados nas mesmas condições descritas no item 2.1. Para o início do experimento com as espécies *S. polyrhiza* e *A. caroliniana*, 1,5 g de massa fresca foram utilizados, enquanto que 2,0 g foram empregadas para *S. minima*.

As espécies foram colocadas em vasos de polietileno contendo 350 mL de solução de Hoagland acrescida de doses crescentes de Mn (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 mM) na forma de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. As plantas controle foram mantidas apenas em solução de Hoagland, com cinco repetições, durante sete dias e pH entre $6,5 \pm 0,5$. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

2.3. Sintomatologia visual

A observação da sintomatologia visual das plantas expostas as diferentes concentrações de Mn, foi realizada diariamente, seguida de registro fotográfico utilizando-se uma câmera digital (Sony DSC-S60).

2.4. Análise de crescimento das plantas

No sétimo dia, a partir do início do experimento, as plantas foram removidas dos vasos e lavadas em solução de ácido nítrico 1% com água desionizada, a fim de retirar o excesso de Mn aderido às raízes e folhas. Em seguida as plantas foram pesadas para obtenção da matéria fresca (MF) final e, posteriormente, colocadas em estufa convencional a 80 °C até obtenção de massa seca (MS) final.

A massa seca inicial foi estimada a partir da média obtida de 10 repetições de plantas retiradas do mesmo lote daquelas utilizadas nos experimentos, para cada uma das espécies, sendo o peso de MF correspondente as da utilizada no início do experimento. Os dados de MS foram usados para análise de crescimento das plantas. A taxa de crescimento relativo de cada espécie foi calculada através da equação proposta por Hunt (1978).

2.5. Determinação de pigmentos: clorofila total e carotenóides

Os conteúdos de clorofila total e carotenóides foram determinados em 0,5 g de massa fresca de cada espécie nas diferentes concentrações de Mn, e no grupo de plantas controle. A extração foi feita utilizando acetona 80% v/v adicionando-se o CaCO_3 (Arnon, 1949). A leitura da absorbância foi realizada nos seguintes comprimentos de onda: 470; 646,8 e 663,2 nm, em espectrofotômetro UV Visível (UVmini-1240, Shimadzu, Japão). A partir destes dados, foram calculados os conteúdos de clorofila total e de carotenóides através das equações propostas por Lichthenthaler (1987).

2.6. Determinação do conteúdo de Mn nas plantas

Plantas secas foram submetidas à mineralização úmida em 3 mL de uma mistura nítrico-perclórico (2:1, v/v), à temperatura de 120-140 °C, até a completa oxidação da matéria orgânica (Tedesco, 1995). As amostras mineralizadas foram diluídas em 25 mL de água desionizada. A determinação da concentração de Mn total absorvida pelas

plantas foi feita por espectrometria de absorção atômica (AAS 220 FS, Varian Austrália) comprimento de onda 279,8 nm.

2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados através da ANOVA (nível de significância $p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O software usado para as análises estatísticas foi SAS (SAS Institute, Cary, NC).

3. Resultados

3.1. Sintomatologia

As macrófitas aquáticas *A. caroliniana* e *S. minima* apresentaram sintomas visuais, a partir do quinto dia de experimento. Foi constatado clorose nas frondes, entretanto, apenas em plantas expostas a concentração mais elevada de Mn (0,4 mM). A sintomatologia foi menos evidente em plantas de *A. caroliniana* (Fig. 1A-D). O aparecimento de indivíduos e frondes jovens, em plantas expostas ao Mn não se diferenciou visualmente das plantas controle.

Em plantas de *S. polyrhiza*, os sintomas foram visíveis a partir da concentração de 0,2 mM de Mn, sendo mais acentuados nas concentrações de 0,3 e 0,4 mM. A partir do quarto dia de experimento, as folhas apresentaram clorose, que iniciaram na região basal, estendendo-se gradualmente para região apical até o final do experimento (Fig. 1E-F). O aparecimento de indivíduos e folhas jovens, de plantas expostas ao Mn, foi reduzido comparado às plantas controle.

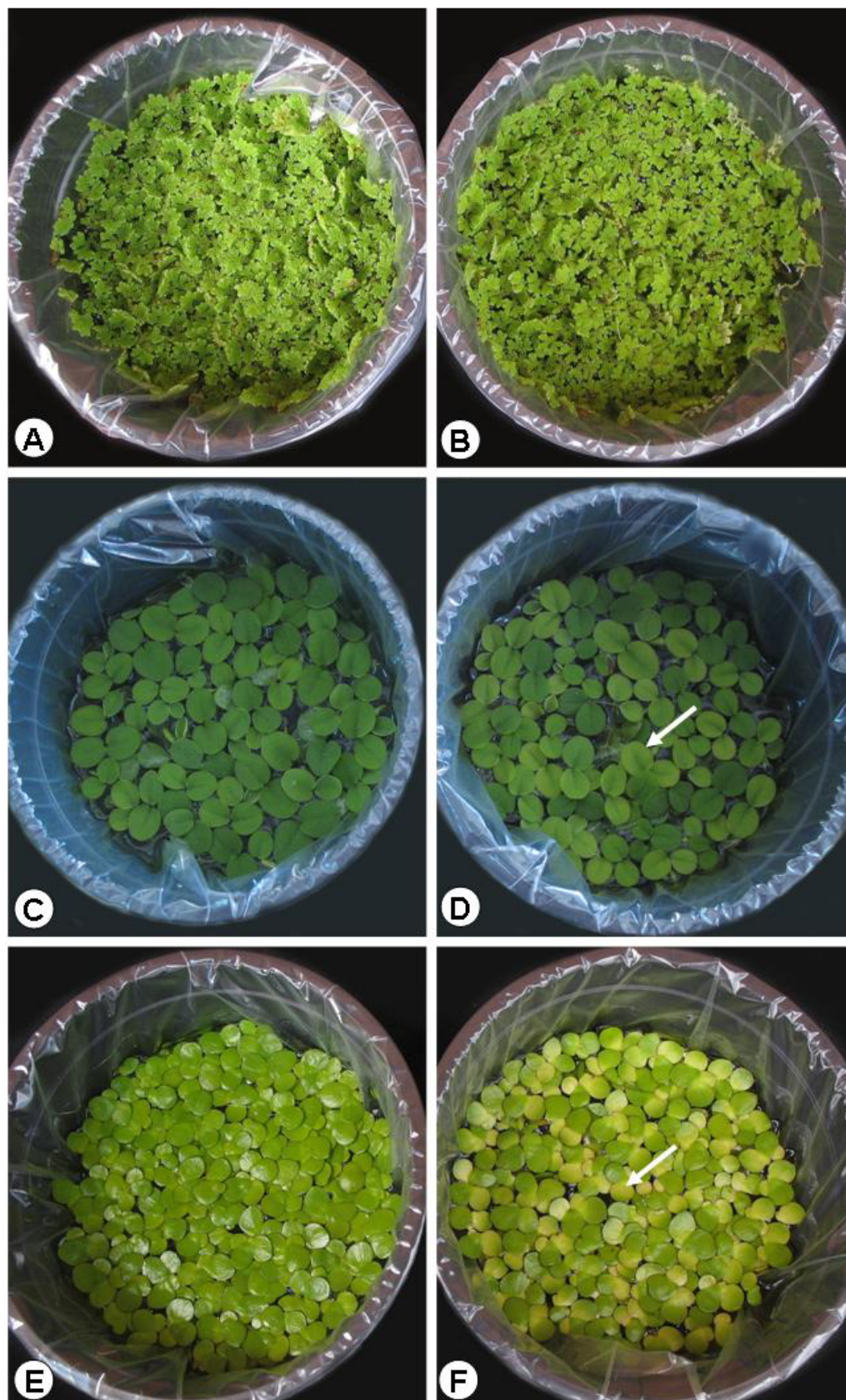


Figura 1. Caracterização da sintomatologia visual das macrófitas aquáticas estudadas. A, C e E - plantas controle; B, D e F - plantas expostas a 0,4 mM de Mn. A - vista geral de plantas de *Azolla caroliniana* controle; B - vista geral de plantas de *Azolla caroliniana* exposta ao Mn; C - vista geral de plantas de *Salvinia minima* controle; D - vista geral das plantas de *Salvinia minima* exposta ao Mn, evidenciando clorose nas frondes (seta); E - vista geral das plantas de *Spirodela polyrhiza* controle; F - vista geral das plantas de *Spirodela polyrhiza* exposta ao Mn evidenciando clorose nas folhas (seta).

3.2. Crescimento das plantas

O excesso de Mn na solução nutritiva não alterou significativamente o crescimento das espécies *A. caroliniana* e *S. minima* (Fig. 2A-B), no entanto, afetou significativamente o crescimento de *S. polyrhiza* ($P < 0,0004$). O crescimento das plantas de *S. polyrhiza* reduziu a partir da concentração de 0,2 mM de Mn, sendo que uma redução mais acentuada foi observada nas concentrações de 0,3 e 0,4 mM (Fig. 2C).

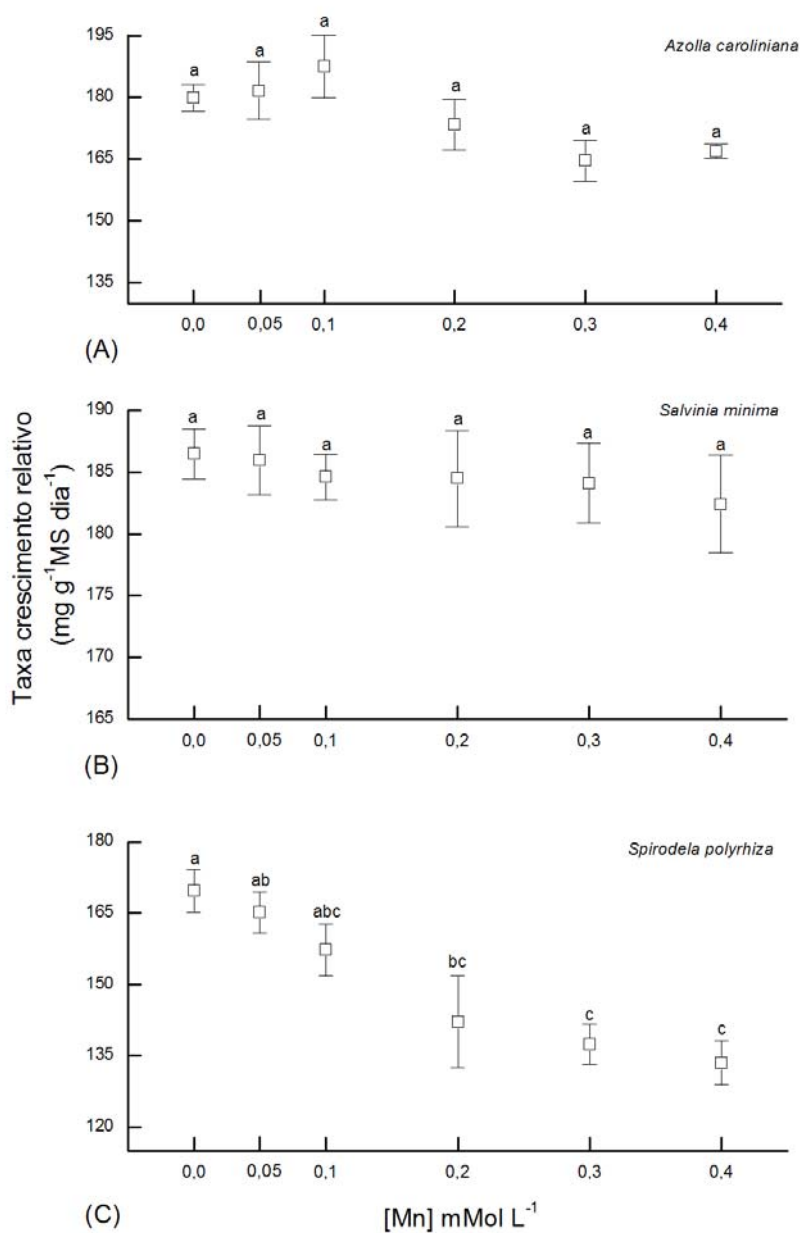


Figura 2. Taxa de crescimento relativo de plantas de *Azolla caroliniana* (A), *Salvinia minima* (B) e *Spirodela polyrhiza* (C), em função de diferentes concentrações de Mn. Pontos representados por diferentes letras (a-c) são significativamente diferentes entre si.

3.3 Conteúdo de pigmentos: clorofila total e carotenóides

O excesso de Mn na solução nutritiva alterou o conteúdo de clorofila total nas três espécies estudadas. Entretanto, as alterações ocorreram de forma diferenciada entre as espécies, bem como entre os tratamentos (Fig. 3A-C).

O conteúdo de clorofila total em *A. caroliniana*, não mostrou diferença estatística entre plantas controle e plantas expostas as concentrações de 0,05 e 0,1 mM de Mn. A partir da concentração 0,2 mM, o teor de clorofila reduziu significativamente ($P < 0,002$) e não diferenciou das concentrações de 0,3 e 0,4 mM (Fig. 3A).

Em plantas de *S. minima* houve redução significativa do conteúdo de clorofila total ($P < 0,001$), somente em plantas expostas a concentração 0,4 mM (Fig. 3B). A Figura 2C mostra que em plantas de *S. polyrhiza*, o conteúdo de clorofila diferenciou-se estatisticamente ($P < 0,0001$) das plantas controle a partir da concentração de 0,2 mM de Mn, com um decréscimo mais acentuado registrado nas concentrações de 0,3 e 0,4 mM.

O excesso de Mn reduziu significativamente ($P < 0,001$) o conteúdo de carotenóides em plantas de *A. caroliniana*, a partir da concentração de 0,2 mM, mas não diferenciou nas concentrações de 0,3 e 0,4 mM (Fig. 4A). Em plantas de *S. minima* não houve decréscimo significativo do conteúdo de carotenóide entre plantas exposta ao Mn e plantas controle (Fig. 4B). Entretanto, as plantas de *S. polyrhiza* apresentaram redução significativa ($P < 0,0001$) do conteúdo de carotenóides nas concentrações de 0,3 e 0,4 mM de Mn (Fig. 4C).

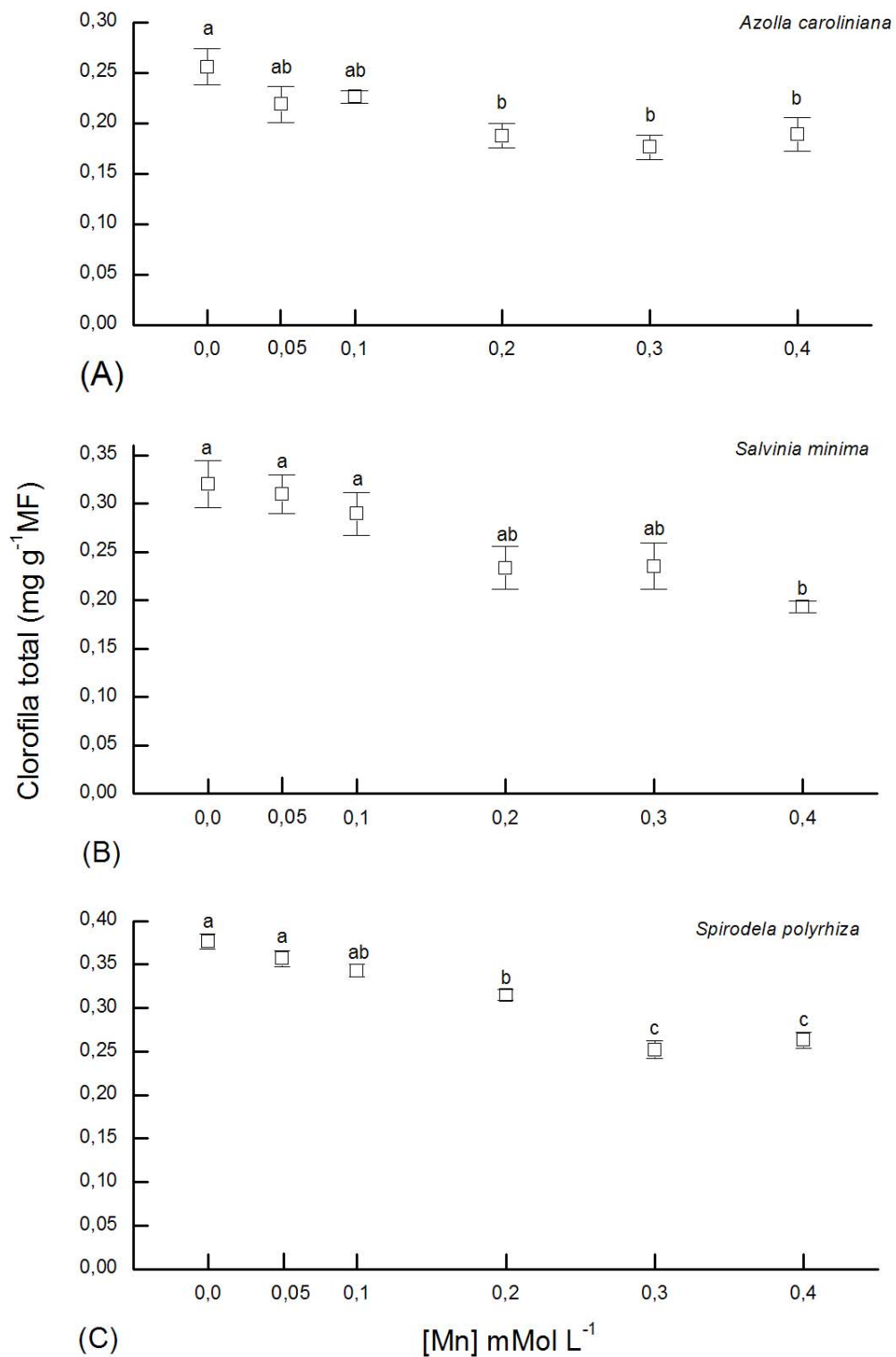


Figura 3. Conteúdo de clorofila total em plantas de *Azolla caroliniana* (A), *Salvinia minima* (B) e *Spirodela polyrhiza* (C), em função de diferentes concentrações de Mn. Pontos representados por diferentes letras (a-c) são significativamente diferentes entre si.

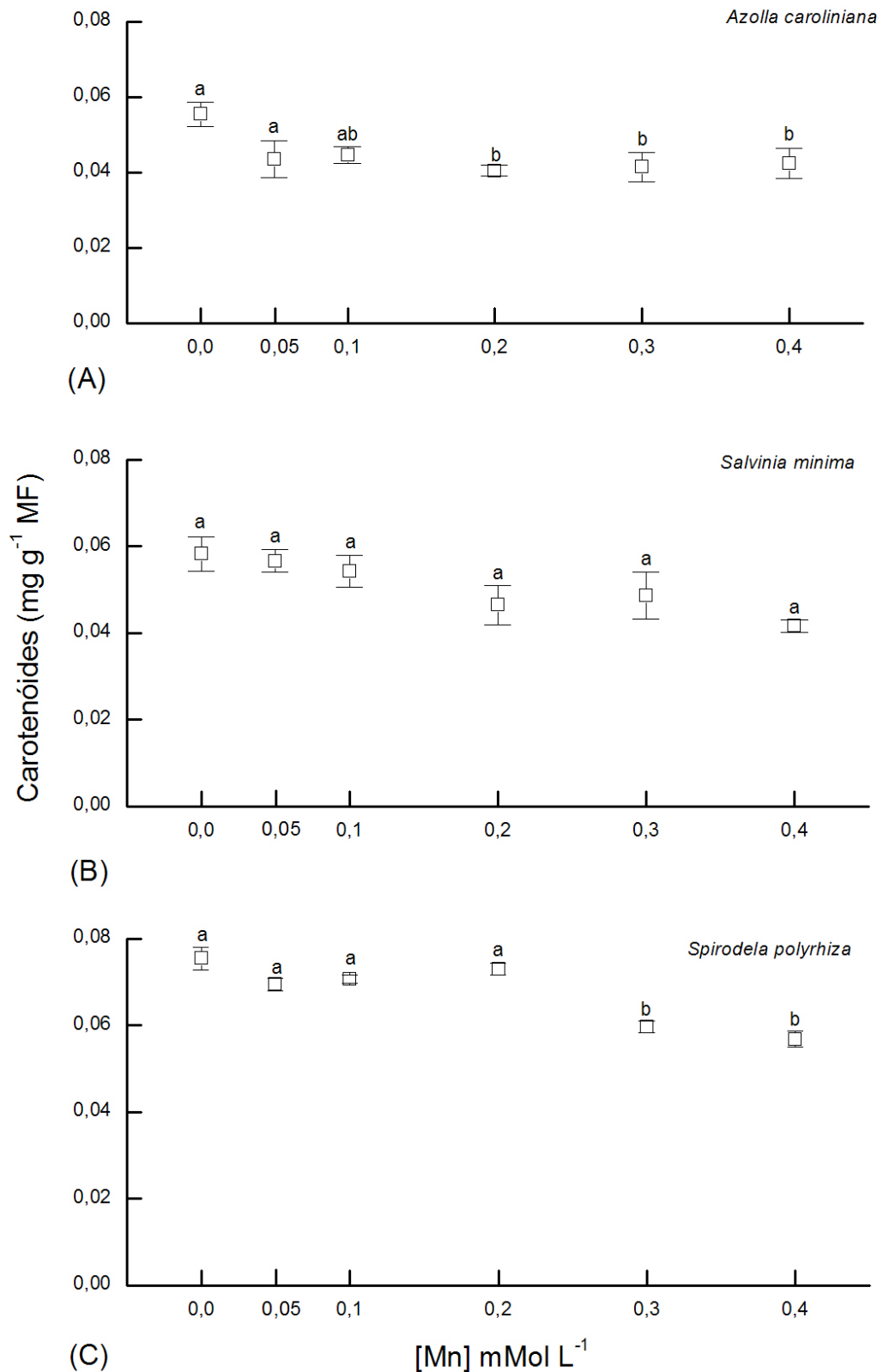


Figura 4. Conteúdo de carotenóides em plantas de *Azolla caroliniana* (A), *Salvinia minima* (B) e *Spirodela polyrhiza* (C), em função de diferentes concentrações de Mn. Pontos representados por diferentes letras (a-b) são significativamente diferentes entre si.

3.4. Acúmulo de Mn nas plantas

O conteúdo de Mn na MS de plantas expostas a diferentes concentrações de Mn foi significativamente alterado ($P < 0,0001$) em relação às plantas controle, para as três espécies estudadas, e aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração do metal na solução.

No entanto, o acúmulo de Mn em plantas de *A. caroliniana*, não diferenciou estatisticamente nos tratamentos 0,05; 0,1 e 0,2 mM, mas aumentou nas concentrações de 0,3 e 0,4 mM (Fig. 5A).

Em plantas de *S. minima*, o Mn acumulado foi similar entre os tratamentos 0,05 e 0,1 mM e aumentou nos tratamentos 0,2, 0,3 e 0,4 mM, entretanto, esses últimos não diferenciaram estatisticamente entre si (Fig. 5B).

Os valores de Mn acumulado em plantas de *S. polyrhiza* aumentaram proporcionalmente às concentrações do metal e apresentaram diferenças significativas entre todas as concentrações de Mn (Fig. 5C).

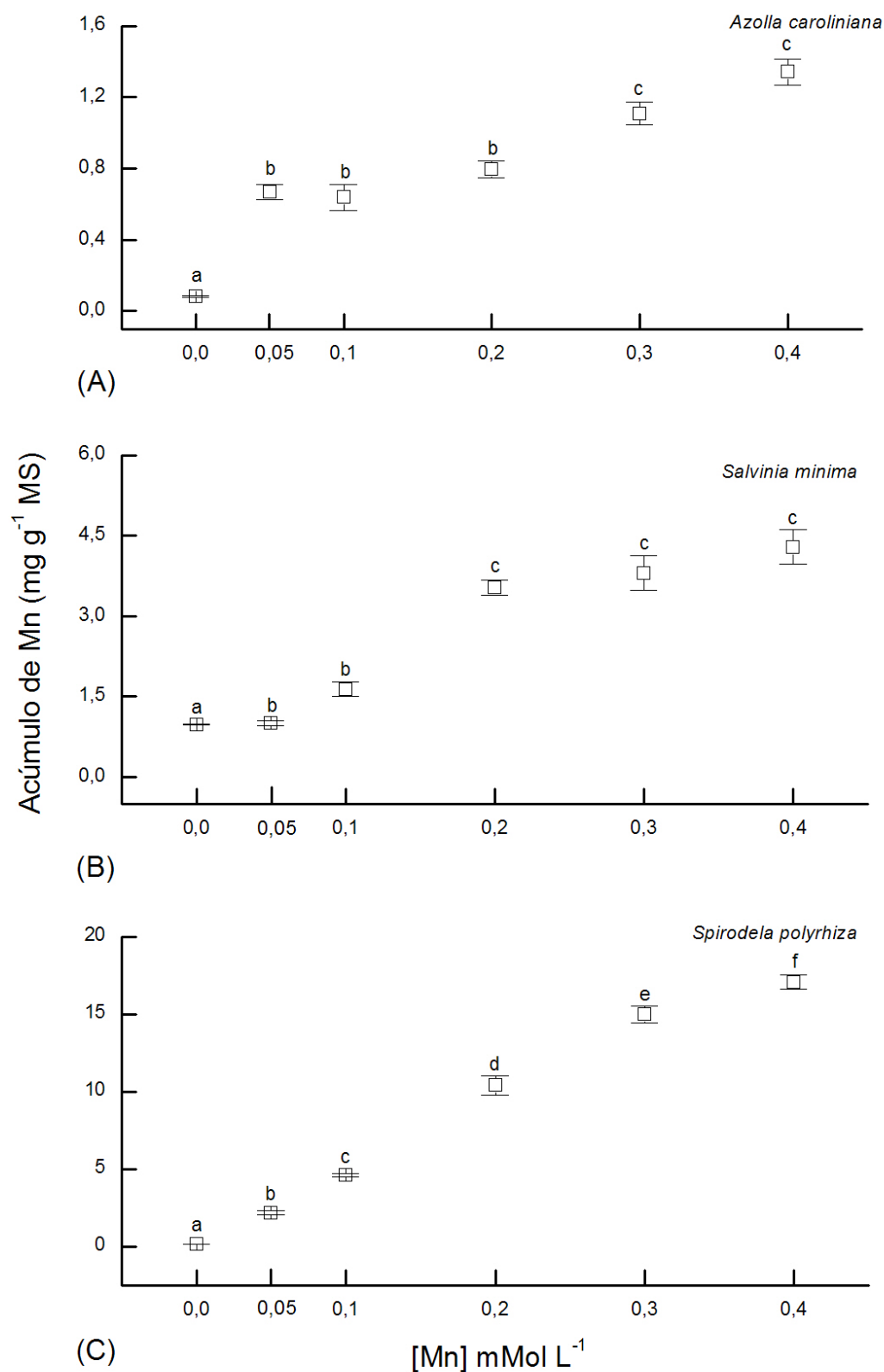


Figura 5. Acúmulo de Mn em plantas de *Azolla caroliniana* (A), *Salvinia minima* (B) e *Spirodela polyrhiza* (C) em função de diferentes concentrações do metal. Pontos representados por diferentes letras (a-f) são significativamente diferentes entre si.

4. Discussão

O conhecimento sobre o mecanismo de absorção e acúmulo de Mn em plantas aquáticas é escasso. A literatura descreve algumas interpretações para espécies de plantas lenhosas ou arbustivas e, principalmente, para as plantas que possuem valor econômico (Memon e Yatazawa, 1980; Caldwell, 1998; Fecht-Christoffers et al. 2003; Fernando et al. 2006).

No presente trabalho foi constatado que as espécies de macrófitas aquáticas *A. caroliniana*, *S. minima* e *S. polyrhiza* acumularam Mn em seus tecidos. No entanto, as espécies se diferenciaram quanto à capacidade para acumular o elemento.

Azolla caroliniana apresentou os valores mais baixos (0,080 - 1,341 mg g⁻¹ MS) de Mn acumulado, em relação às demais espécies estudadas. Trabalhos como de Santos (2006) e Guimarães (2006) avaliaram o potencial de *A. caroliniana* para acumular Arsênio (As) e constataram que esta espécie também apresentou reduzida capacidade para acumular esse metalóide comparado as plantas de *Lemna gibba* e *S. minima*. Este fato sugere que *A. caroliniana* possui algum mecanismo de exclusão do excesso de metal. Consequentemente, a estratégia confere maior tolerância à planta, por evitar acúmulo de metal nos tecidos internos, impedindo a toxidez no metabolismo do vegetal (Reichman, 2002). Entretanto, pesquisas têm considerado esta pteridófita aquática promissora para acumular Cd (Noraho e Gaur, 1996); Ni (Zhao e Duncan, 1998); Hg(II), Cr(III) e Cr(VI) (Bennicelli et al. 2004). A capacidade desta espécie em acumular Mn, é desconhecida na literatura, sendo os resultados deste trabalho, os primeiros dados e informações associados a este metal.

Plantas de *S. minima* apresentaram valores intermediários (0,097 - 4,283 mg g⁻¹ MS) de acúmulo de Mn quando comparada às espécies *S. polyrhiza* e *A. caroliniana*. Informações sobre o potencial de *S. minima* em absorver e acumular Mn são escassas. Respostas de acúmulo e efeitos tóxicos nesta espécie foram observadas em situações de

estresse com Cd (Oliguín et al. 2002), Pb (Hoffmann et al. 2004), Cr (Nichols et al. 2000) As e atrazine (Guimarães, 2006).

A aplicação do gênero *Salvinia* para remoção de metais tem sido considerada promissora por alguns pesquisadores (Oliguín et al. 2002; Hoffmann et al. 2004; Soares et al. 2008). O fato desta espécie apresentar crescimento rápido em diferentes habitats (Whiteman e Room, 1991) torna-se uma característica vantajosa para aplicação em fitorremediação.

A espécie *S. polyrhiza* acumulou as maiores concentrações de Mn (17,062 mg g⁻¹ MS) no tecido vegetal. Sinha et al. (1994) relataram a capacidade dessa espécie em acumular concentrações substanciais de Mn. O potencial de *S. polyrhiza* em acumular diferentes contaminantes é relatado por vários autores (Tripathi e Chandra, 1991; Sinha et al. 1994; Rai et al. 1995; Noraho e Gaur, 1996) e o uso destas espécies em fitorremediação, vem sendo considerado promissor. Rai et al. (1995) verificaram que *S. polyrhiza* foi capaz de reduzir 90% do nível de cobre de uma solução. Sinha et al. (1994) verificou que *S. polyrhiza* acumula quantidades expressivas de ferro (71,0 µmol) em solução, o que foi constatado no presente estudo para o Mn.

A principal característica requerida para utilização de espécies vegetais na técnica de fitorremediação é o bioacúmulo do poluente associado à alta produtividade de biomassa vegetal (Vissottiviseth et al. 2002). No entanto, o acúmulo excessivo de metais em plantas, geralmente é conhecido por produzir respostas fisiológicas e bioquímicas danosas ao metabolismo das plantas, afetando o crescimento e desenvolvimento vegetal (Barceló e Poschenrieder, 1990; Oliveira et al. 2001) e inviabilizando a utilização e emprego da espécie na tecnologia de fitorremediação.

Neste estudo foi verificado que o acúmulo de Mn em plantas expostas às concentrações de 0,2 – 0,4 mM está associado a produção de sintomas de toxicidade nas três espécies estudadas, porém, tais eventos ocorreram de formas diferentes. Verificou-

se redução do conteúdo de clorofila em plantas de *A. caroliniana*, *S. minima*, e uma redução mais acentuada em plantas de *S. polyrhiza*. A redução do conteúdo de clorofila em plantas expostas ao Mn tem sido associada, pelo menos em parte, ao fato deste metal induzir a deficiência de Fe nos tecidos do vegetal, o qual é requerido para a síntese de clorofila (Csatorday et al. 1984; Beale, 1999). Outra hipótese sugere que o Mn pode substituir o íon Mg na molécula de clorofila levando, conseqüentemente à desnaturação desta molécula (Mukaopadhyay e Sharma, 1991; Hauck et al. 2002).

Também foi constatado decréscimo no conteúdo de carotenóides nas plantas de *S. polyrhiza* e *A. caroliniana*. Resultados similares foram encontrados por Caldwell (1998); Lidon et al. (2004) e Asrar et al. (2005) para diferentes espécies terrestres. A redução deste pigmento parece estar relacionada a um desarranjo dos tilacoides causado pelo excesso de Mn. Lindon et al. (2004) verificaram que quanto maior o aumento da concentração de Mn no tecido foliar, maior a concentração deste elemento nos tilacoides. O acúmulo de Mn nos tilacoides, provavelmente, interfere no empilhamento e conteúdo de pigmentos localizados na estrutura. Esta hipótese poderia ser aplicada para a redução do conteúdo de carotenóides observadas em plantas *A. caroliniana* e *S. polyrhiza*, após o aumento das concentrações (0,2 a 0,4 mM) de Mn em solução.

O crescimento das plantas de *A. caroliniana* e *S. minima* não foi inibido significativamente pelo excesso de Mn. Somente em plantas de *S. polyrhiza* foi constatado uma redução do crescimento a partir da concentração 0,2 mM de Mn. Sinha, et al. (1994) estudaram o efeito do Mn no crescimento de *S. polyrhiza*, em concentrações inferiores (0,01 a 0,2 mM de Mn) as utilizadas neste trabalho, e verificaram que a biomassa produzida por *S. polyrhiza* foi inversamente proporcional as concentrações de Mn. Este resultado é similar ao encontrado no presente estudo. A redução do crescimento de plantas *S. polyrhiza* pode ter sido acarretada pelo decréscimo acentuado do conteúdo de clorofila verificado nas plantas, além de um desequilíbrio

nutricional supostamente causado pelo excesso de Mn, como relatado por Alam et al. (2000) e Shi e Zhu (2008).

As respostas ao acúmulo de Mn entre as três espécies estudadas, provavelmente, estão associadas às diferenças de absorção e conteúdo de Mn acumulado nos tecidos das plantas. Os resultados mostraram que, as espécies *A. caroliniana* e *S. minima* toleraram excessos de Mn, entretanto, as plantas foram ineficientes para acumular quantidade elevadas do metal. O alto conteúdo de Mn acumulado nos tecidos de *S. polyrhiza* sugere que essa espécie possui potencial para acumular Mn, porém, uma resposta de sensibilidade foi observada em plantas expostas as concentrações mais elevadas (0,4 mM de Mn). O uso combinado e/ou alternado das espécies estudadas neste trabalho poderá ser uma prática promissora capaz de auxiliar no seqüestro de Mn em ambientes aquáticos controlados. Entretanto, a combinação de macrófitas aquáticas a serem aplicadas em sistemas de áreas alagáveis “wetlands”, exigirá um monitoramento constante, a fim de evitar um desequilíbrio entre as interações ecológicas no ambiente.

Spirodela polyrhiza destacou-se por acumular concentrações elevadas de Mn e, estudos posteriores com essa espécie serão conduzidos para avaliar os efeitos tóxicos do Mn.

5. Referências

- Alam S, Kamei S, Kawai S (2000) Phytosiderophore release from manganese-induced iron deficiency in barley. *J. Plant Nutr.* 23: 1193-1207
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol-oxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15
- Asrar Z, Khavari-Nejad RA, Heidari H (2005) Excess manganese effects on pigments of *Mentha spicata* at flowering stage. *Arch Agronomy Soil Sci.* 51: 101-107
- Banks D, Younger PL, Arnesen RT, Iversen ER, Banks SB (1997) Minewater chemistry: the good, the bad and the ugly. *Environ Geol.* 32: 157-74
- Barceló J, Poschenrieder C (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J Plant Nutri.* 13: 1-37
- Beale SI (1999) Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.* 60: 43-73
- Bennicelli R, Stezpniewska Z, Banach A, Szajnocha K, Ostrowski J (2004) The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals Hg(II), Cr(III), Cr(VI) from municipal waste water. *Chemosphere* 55: 141-146
- Boucher AM, Watzin MC (1999) Toxicity identification evaluation of metal-contaminated sediments using an artificial pore-water containing dissolved organic carbons. *Environ Toxicol Chem.* 18: 509-518
- Cabana G, Tremblay A, Kaff J, Rasmussen JB (1994) Pelagic food chain Structure in Ontario Lakes: A determinant of mercury levels in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Can J Fish Aquat Sc.* 51: 381-389
- Caldwell, CR (1998) Effect of elevated manganese on the ultraviolet and blue light-absorbing compounds of cucumber cotyledon and leaf tissues. *J Plant Nutr.* 21: 435-445
- Csatorday K, Gombos Z, Szalontai B (1984) Mn^{2+} and Co^{2+} toxicity in chlorophyll biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 476-478
- Chaney RL, Li YM, Brown SL, Homer FA, Malik M, Angle JS, Baker AJM, Reeves RD, Chin M (2000) Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. In: Terry N, Bañuelos GS (ed) *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publishers, Boca Raton, EUA, pp.129-158
- Conselho Nacional Do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.crq4.org.br/downloads/resolucao357.pdf>> acesso: 22 de fevereiro de 2009
- Cunningham S, Ow D W (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110: 715-719
- Di Toppi LS, Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Experim Bot.* 41: 105-130
- Doyle CJ, Pablo F, Lim RP, Hyne, RV (2003) Assessment of metal toxicity in sediment pore water from lake Macquarie, Australia. *Arch Environ Contam Toxicol* 44: 343-350
- Dushenkov V, Kumar PBAN, Motto H, Raskin I (1995) Rizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ Sci Technol.* 29: 1239-1245
- Fecht-Christoffers MM, Maier P, Horst WJ (2003) Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. *Physiol. Plant.* 177: 237-244

- Fernando DR, Bakkaus EJ, Perrier N, Baker AJM, Woodrow IE, Batianoff GN, Collins RN (2006) Manganese accumulation in the leaf mesophyll of four tree species: a PIXE/EDAX localization study. *New Phytol.* 171: 751-758
- Guimarães FP (2006) Potencial de macrofitas para Remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG
- Guimarães-Silva AK, Machado DA, Nalini HA, Lena JC (2007) A qualidade das águas na região dos garimpos de topázio imperial na sub-bacia do rio da Ponte, Ouro Preto-MG. *R. Esc. Minas, Ouro Preto* 60: 603-611
- Hauck M, Mulack C, Paul A (2002) Manganese uptake in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *Environ. Exp. Bot.* 48:107-117
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Bulletin 347. California Agricultural Experiment Station. 37p
- Hoffmann T, Kutter C, Santamaría J (2004) Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Eng. Life Sci.* 4: 61-65
- Hunt R (1978) Plant growth analysis. London, Edward Arnold Publishers Limited. 67p.
- Lichthenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick SP, Kaplan NO (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, 148: 350-382
- Lidon FC, Barreiro MG, Ramalho JC (2004) Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. *J. Plant Physiol.* 161: 1235-1244
- Memon AR, Yatazawa M (1980) Distribution of manganese in leaf tissues of manganese accumulator: *Acanthopanax sciadophyllioides* as revealed by electron probe X-ray microanalyzer. *J Plant Nutr.* 2: 457-476
- Mergler D, Huel G, Bowler R, Iregren A, Belanger S, Baldwin M, Tardif R, Smargiassi A, Martin L (1994) Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese. *Environ Res.* 64: 151-180
- Miretzky P, Saralegui A, Cirelli AF (2004) Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere* 57: 997-1005
- Mukaopadhyay MJ, Sharma A (1991) Manganese in cell metabolism of higher plants. *Bot. Rev.* 51: 117-149
- Noraho N, Gaur JP (1996). Cadmium adsorption and intracellular uptake by two macrophytes, *Azolla pinnata* and *Spirodela polyrrhiza*. *Arch Hydrobiol.* 136: 135-144
- Nichols PB, Couch JD, Al Hamdani SH (2000) Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquat Bot.* 68: 313-319
- Olguín EJ, Hernández E, Ramos I (2002) The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnol.* 22: 121-131
- Oliveira JA, Cambraia J, Cano MAO, Jordão CP (2001) Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. *Rev Bras Fisiol Veg.* 13: 329-341
- Rai UN, Sinha S, Ripathi RD, Chandra P (1995) Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: Removal of heavy metals. *Ecol Eng.* 5: 5-12
- Raskin I, Ensley BD (2000) Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. John Wiley and Sons, New York, 303 p
- Reichman SM (2002) The Responses of Plants to Metal Toxicity : A review focusing on copper, manganese and zinc. Australian Minerals and Energy Environment Foundation, Melbourne, pp. 14-59

- Santos GV. (2006) Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao arsênio. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG
- Sisinno, CLS (2003) Disposição em aterros controlados de resíduos sólidos industriais não-inertes: avaliação dos componentes tóxicos e implicações para o ambiente e para a saúde humana. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 19: 369-374
- Soares DCF, Oliveira EF, Silva GDF, Duarte LP, Pott VJ, Vieira Filho SA (2008) *Salvinia auriculata*: Aquatic bioindicator studied by instrumental neutron activation analysis (INAA). Appl Radiat Isotop 66: 561-564
- Shi Q, Zhu Z (2008) Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. Environ Experim Bot. 63: 317-326
- Sinha S, Rai UN, Chandra P (1994) Accumulation and toxicity of iron manganese in *Spirodela polrrhiza* (L.) Schleiden. Environ Contam Toxicol. 53: 610-617
- Tavares TM, Carvalho FM (1992) Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplo do Recôncavo Baiano. Química Nova 15: 147-154
- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ (1995) Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS, 174p
- Thornton I (1995) Metals in the global environment, 1 ed. Ottawa: Int. Council on Metal and the Evironment. 53 p
- Tripathi RD, Chandra P (1991) Chromium uptake by *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden in relation to metal chelators and pH. Environ Contam Toxicol. 447: 767-769
- Vissettiviseth P, Francesconi B, Ridokchana W (2002) The potencial of *Thai indigenous* plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. Environ Pollution. 118: 453-461
- Whiteman JB, Room PM (1991) Temperatures lethal to *Salvinia molesta* Mitchel. Aquat Bot. 40: 27-35
- Zagatto A, Bertolotti E (2006) Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. Rima, São Carlos, 478 p
- Zhao M, Duncan JR (1998) Removal and recovery of nickel from aqueous solution and electroplating rinse effluent using *Azolla filiculoides*. Process Biochem. 33: 249–255

**Efeitos tóxicos de manganês em *Spirodela polyrhiza* (L.)
Schleiden (Lemnaceae)**

Efeitos tóxicos de manganês em *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden (Lemnaceae)

Claudineia Lizieri-Santos^a, Rosane Aguiar^a

^a Universidade Federal de Viçosa

Avenida PH Rolfs, S/Nº, Viçosa, MG, Brasil, CEP: 36 570-000.

clau-lizieri@hotmail.com

Resumo

A toxidez por manganês (Mn) tem sido considerada um importante estresse abiótico. O crescimento (biomassa), o conteúdo de pigmentos clorofila total, carotenóides e antocianina, a atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidases (POX), o conteúdo de Mn no tecido vegetal e as alterações anatômicas foram estudadas neste trabalho em plantas de *Spirodela polyrhiza* expostas a concentração de 0,4 mM de Mn (MnCl₂), em solução nutritiva. O excesso de Mn em solução reduziu o crescimento das plantas, assim como, levou a um decréscimo significativo do conteúdo de clorofila total, carotenóides e antocianinas. A atividade da CAT também foi reduzida e a atividade da POX não apresentou diferenças entre os tratamentos. A microscopia óptica mostrou um desarranjo nas lacunas do aerênquima em plantas expostas ao Mn, e o conteúdo de Mn aumentou significativamente em plantas expostas ao metal (0,157 - 15,830 mg g⁻¹MS). Os resultados mostraram que o excesso de Mn em solução acarretou efeitos tóxicos nas plantas de *S. polyrhiza*. A alta concentração de Mn acumulada foi a causa dos efeitos deletérios observados.

Palavra-chave: *Spirodela polyrhiza*, toxidez por manganês, alterações anatômicas, macrófita aquática

Abstract

Toxic effect of manganese in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden (Lemnaceae)

The toxicity of Manganese (Mn) has been considered an important abiotic stress. The growth of plants, content of pigments total chlorophyll, carotenoids and anthocyanins, enzymatic activities of catalase (CAT) and peroxidase (POX), contents of Mn in the plant tissue and anatomic modifications were studied in *Spirodela polyrhiza* plants exposed to a concentration of 0,4 mM of Mn (MnCl₂) in a solution. The excess of Mn in the solution reduced the growth of plants also leading to a significative decreasing in the content of total chlorophyll, carotenoids and anthocyanins. The CAT activity was also reduced and the activity of POX did not present any difference among the concentrations. Optical microscopy showed disarrangement in the gaps of the aerenchyma in plants exposed to Mn and the Mn content significantly increased in the plants exposed to the metal (0.157 to 15.830 mg g⁻¹MS). The results showed that the excess of Mn in solution caused toxic effects on plants of *S. polyrhiza*. The high concentration of Mn accumulated was the cause of the deleterious effects observed.

Keyword: *Spirodela polyrhiza*, manganese toxicity, anatomic modifications, aquatic macrophytes

1. Introdução

O Manganês (Mn) é um micronutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento de plantas (Mukaopadhyay e Sharma, 1991). Este elemento participa de numerosos processos metabólicos e está associado às reações oxido-redução. O Mn é requerido como cofator de enzimas envolvidas no processo de proteção contra o estresse oxidativo, além de ser um componente do complexo enzimático envolvido na fotólise da água (Bowler et al., 1994; Gonzáles et al., 1998; Büchel et al., 1999).

Embora o Mn seja um elemento constituinte da nutrição de plantas, pesquisas têm reportado que o acúmulo excessivo deste metal causa efeitos tóxicos. Implica nas alterações do metabolismo de isoprenóides, clorofilas, carotenóides, inibição da fotossíntese, alteração na respiração entre outros (Foy, 1984; Houtz, 1988; Wilkinson e Ohki, 1988; Macfie e Taylor, 1992; Macfie, et al., 1994; Hauck et al., 2003).

Sintomas como clorose, necrose, alterações na morfologia foliar, surgimento de pontos marrons nas folhas e retardamento no crescimento também foram observados em plantas expostas ao excesso de Mn (Wissemeier e Horst, 1992; Sinha et al., 1994).

Estudos também sugerem que o excesso de Mn induz o estresse oxidativo (Gonzáles et al., 1998; Lidon e Teixeira, 2000). De maneira geral os efeitos tóxicos dos metais pesados, tanto os essenciais como os não essenciais no metabolismo das plantas, estão relacionados na produção de radicais livres (De Vos e Schat, 1991; Ficht-Christoffers et al., 2003).

A produção excessiva de radicais livres danifica as biomoléculas como lipídios de membrana, proteínas, pigmentos em cloroplastos, enzimas, ácidos nucléicos, etc. (Mishra e Singhal, 1992). Entretanto, as plantas sintetizam enzimas antioxidantes e substâncias antioxidantes como mecanismo de proteção contra os danos e os efeitos destes radicais (Arora et al., 2002). Geralmente, as enzimas antioxidantes têm a síntese ou a atividade aumentada em plantas expostas às situações de estresse. Quando há aumento da atividade enzimática é relatado um aumento da tolerância ao estresse (Santandrea et al., 2000; Ficht-Christoffers et al., 2003). No entanto, não são todas as espécies vegetais que possuem tal mecanismo de tolerância.

As antocianinas são pigmentos que pertencem à família dos flavonóides (Dangles et al., 1992) e também atuam como antioxidante contra a ação de radicais livres (Foot et al., 1996; Ishii et al., 1996). Pesquisas demonstram que o conteúdo de antocianinas podem aumentar em resposta a vários estresses, como, a exposição à radiação UV (Li et al., 1993), a deficiência hídrica (Do e Cornier, 1990) e a metalóides (Guimarães, 2006; Santos, 2006). O aumento deste pigmento em plantas é um

mecanismo que confere aos vegetais, maior tolerância quando submetidos às situações de estresse (Foot et al., 1996; Ishii et al., 1996).

Vários trabalhos já investigaram o efeito e o acúmulo de Mn em plantas vasculares (Memon e Yatazawa, 1980; Clairmont et al., 1986; Kitao et al., 2001; Fecht-Christoffers et al., 2003; Asrar et al., 2005; Fernando et al., 2006). No entanto, são raros os estudos relacionados às plantas aquáticas. O interesse maior tem sido pelas plantas de valor econômico (Caldwell, 1998; Fecht-Christoffers et al., 2003; Fernando et al., 2006).

A espécie *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden é uma planta aquática flutuante livre, pertencente à família Lemnaceae (Pott e Pott, 2000) que foi selecionada para este estudo por já ter sido relatado, o potencial de espécies de diferentes gêneros da família, para acumular metais pesados (Schreinemakers, 1984; Tripathi e Chandra, 1991; Sharma e Gaur, 1995; Li e Xiong, 2004; Dhir et al., 2004). Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos do Mn em *S. polyrhiza*. Sinha et al. (1994) estudaram o acúmulo e a toxidez de Mn, nesta espécie, porém, o experimento foi conduzido com concentrações menores do que as utilizadas no presente estudo e poucos parâmetros fisiológicos foram avaliados pelos referidos autores.

Foi constatado, em pesquisa anterior desenvolvida no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, que plantas de *S. polyrhiza* quando expostas as diferentes concentrações de Mn (0,0 e 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 mM), pode acumular elevadas concentrações do metal em seus tecidos e mostraram tolerância quando expostas as concentrações inferiores a 0,2 mM de Mn. Neste estudo, observou-se que plantas expostas as concentrações acima de 0,2 mM de Mn apresentaram respostas de sensibilidade ao metal, reduzindo o crescimento, o conteúdo de clorofila total e carotenóides.

Com base nos dados anteriores, o excesso de Mn em solução causa efeitos tóxicos em plantas de *S. polyrhiza*. O presente trabalho objetivou analisar parâmetros fisiológicos (pigmentos e enzimas) e morfo-antômicos, em plantas de *S. polyrhiza* expostas ao Mn, buscando compreender os efeitos deletérios do Mn no metabolismo desta macrófita aquática.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção e aclimação das plantas

A espécie aquática *S. polyrhiza* foi cultivada em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas – UCP, do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Universidade Federal de Viçosa/UFV.

Para adaptar às condições experimentais e obter biomassa suficiente para condução dos experimentos, as plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950), com 1/5 de força iônica, durante 15 dias, em sala de crescimento de plantas, com temperatura e luz controladas (25 ± 1 °C, $230 \mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), sob fotoperíodo de 12 horas de luz:escuro. A solução nutritiva renovada a cada três dias e o pH mantido entre $6,5 \pm 0,5$.

2.2. Montagem do experimento

O experimento foi montado nas mesmas condições descritas no item 2.1. No início do experimento foram utilizados 1,5 g de massa fresca de plantas de *S. polyrhiza* e 350 mL de solução de Hoagland acrescida de Mn ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) na concentração 0,4 mM. Plantas controle foram mantidas apenas em solução de Hoagland e o pH a $6,5 \pm 0,5$. O experimento foi conduzido durante sete dias, com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado.

2.3. Sintomatologia visual

A observação da sintomatologia visual das plantas expostas ao Mn foi realizada diariamente, mediante observações em microscópio estereoscópio e registro fotográfico, utilizando-se uma câmera digital (Sony DSC-S60).

2.4. Alterações morfo-anotômicas das folhas

Para a caracterização estrutural, as folhas de plantas tratadas com Mn e plantas controle, foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 h. Em seguida, as folhas foram lavadas em tampão cacodilato a cada 30 minutos, durante 2 h, seguidas de lavagens em água destilada. Posteriormente, foram desidratadas em série etílica e armazenadas em álcool etílico 70%. O material foi incluído em historresina e seccionado a $6 \mu\text{m}$ de espessura, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo

RM 2155, Leica). Cortes transversais e longitudinais foram feitos nas folhas de plantas controle e plantas expostas ao Mn. Os cortes foram corados com azul de Toluidina (O'Brien et al., 1964) e montados em Permount.

Observações do tecido epidérmico foram realizadas através da técnica de diafanização. O material (folhas) foi submetido a uma solução de hidróxido de sódio a 10%, por 2 horas, e posteriormente mergulhados em solução de hipoclorito de Sódio a 20%, até o clareamento (Johansen, 1940) e corado com Safranina.

As observações e documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical) acoplado com sistema U-Photo, no laboratório de Anatomia Vegetal do DBV/UFV.

2.5. Análise de crescimento das plantas

No sétimo dia, após o início o experimento, as plantas foram removidas da solução nutritiva e lavadas em solução de ácido nítrico 1%, seguida de lavagens em água desionizada, a fim de retirar o excesso de Mn aderido as raízes e folhas. Em seguida, todas as plantas foram pesadas para obtenção da matéria fresca final (MF). Posteriormente, as plantas foram colocadas em estufa convencional a 80 °C para obtenção da massa seca (MS) final.

A matéria seca inicial foi estimada a partir da média obtida de 10 repetições de plantas retiradas do mesmo lote das plantas utilizadas no experimento, sendo o peso de MF correspondente aquele utilizado no início do experimento (1,5 g). Os dados de MS foram utilizados para analisar a taxa de crescimento relativo das plantas, calculada através da equação proposta por Hunt (1978).

A determinação da área foliar (cm²) e do comprimento das raízes (mm) foram feitas em cinco plantas de cada repetição (controle e tratamento). A área foliar foi mensurada através de um medidor de área foliar (Delta-T Devices, England) e o comprimento das raízes foi mensurado com o auxílio de uma régua milimetrada.

2.6. Determinação de pigmentos: clorofila total, carotenóides e antocianinas

Os conteúdos de clorofila total e carotenóides foram extraídos a partir de 0,5 g de MF de plantas, utilizando acetona 80% (v/v) e acrescentando-se CaCO₃ (Arnon, 1949). A leitura da absorbância foi feita nos comprimentos de onda, 470, 646,8 e 663,2 nm, em espectrofotômetro UV Visível (UVmini-1240, Shimadzu, Japão). Os cálculos foram realizados de acordo com as fórmulas propostas por Lichthenthaler (1987).

O conteúdo de antocianina foi extraído a partir de 0,3 g de MF plantas, usando-se 7 ml de metanol-HCl (99:1, v/v). As amostras foram deixadas em refrigerador por 12 h. A absorbância dos extratos foi mensurada no comprimento de onda 525 nm (Craker, 1973). Os resultados foram expressos em densidade óptica $\text{mL}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF.

2.7. Extração de enzimas

Para a extração de enzimas foram utilizados 0,3 g de massa fresca das plantas obtidas nos diferentes tratamentos. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e, posteriormente, adicionados 2 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio ($0,1 \text{ Mol L}^{-1}$), pH 6,8, EDTA ($0,1 \text{ mMol L}^{-1}$), PMSF (1 mMol L^{-1}) e PVPP 1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg, por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado como extrato bruto para determinação da atividade das enzimas catalase e peroxidase (Peixoto et al., 1999)

2.8. Atividade das Peroxidases (POX)

A atividade das POXs foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio (25 mMol L^{-1}), pH 6,8, pirogallol (20 mMol L^{-1}) e H_2O_2 (20 mMol L^{-1}) (Kar e Mishra, 1976). A atividade foi mensurada com o acréscimo da absorbância a 420 nm durante o primeiro minuto de reação e calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mMol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955)

2.9. Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 300 μL do extrato enzimático bruto a 2,7 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio (50 mMol L^{-1}), pH 7,0 e H_2O_2 ($12,5 \text{ mMol L}^{-1}$) (Havir e McHale, 1987). A atividade enzimática foi mensurada com o declínio da absorbância a 240 nm, durante o primeiro minuto de reação e calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995).

2.10. Determinação do conteúdo de Mn nas plantas

As plantas secas foram submetidas à mineralização úmida em 3 ml de uma mistura nítrico-perclórico (2:1, v/v), à temperatura de 120-140 °C, até a completa digestão da matéria orgânica (Tedesco, 1995). As amostras mineralizadas foram diluídas com água desionizada (25 ml). A determinação da concentração de Mn total, absorvido pelas plantas, foi feita por espectrometria de absorção atômica (AAS 220 FS, Varian Austrália) no comprimento de onda 279,8 nm.

2.11. Análise estatística

Os dados foram analisados através da ANOVA (nível de significância $p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O software usado para as análises estatísticas foi SAS (SAS Institute, Cary, NC).

3. Resultados

3.1. Sintomatologia

A partir do quarto dia de experimento observou-se em plantas expostas ao Mn, pontos marrons na face abaxial das folhas e início de clorose na região basal. No final do experimento, plantas inteiras foram observadas em microscópio estereoscópio, e foi constatado que tanto as raízes (coifa) quanto as folhas apresentavam manchas de coloração marrom alaranjada (Fig. 1B, D e F). Também foi verificada a presença de microalgas epifíticas aderidas as folhas e raízes das plantas controle e tratamento com Mn. Nas plantas expostas ao Mn, as microalgas apresentavam a mesma coloração marrom/alaranjada identificada nas raízes (Fig. 1B e F).

3.2. Caracterização das alterações anatômicas das folhas

A observação anatômica de folhas de *S. polyrhiza* evidenciou os estômatos presentes apenas na face adaxial, sendo, portanto a folha classificada como epiestomática. Os estômatos são do tipo actinocítico e ciclocítico, com predominância do tipo ciclocítico. Nestes, ocorrem cerca de seis células subsidiárias que estão no mesmo nível das demais células epidérmicas. Em vista frontal, as células epidérmicas das faces abaxial e adaxial apresentam paredes levemente sinuosas (Fig. 2A-B). A epiderme de ambas as faces da folha é uniestratificada e possui células de formato irregular (Fig. 2C-G).

Abaixo da epiderme observa-se a presença de parênquima clorofiliano. Na região mediana da folha ocorre um aerênquima, com lacunas proeminentes (Fig. 2C-E).

Os feixes vasculares ocorrem em série, próximos a região mediana do mesófilo e estão conectados aos septos do aerênquima (Fig. 2D - E). Em algumas regiões do aerênquima é possível observar idioblastos cristalíferos contendo ráfides, e a presença de drusas localizadas no parênquima clorofiliano (Fig. 2-C).

Plantas tratadas com Mn não apresentaram alterações no tecido epidérmico. Os estômatos e as células subsidiárias apresentaram-se semelhantes as plantas controle. Contudo, o excesso de Mn parece levar a um desarranjo do aerênquima. Foi observado que as lacunas do aerênquima, em plantas expostas a 0,4 mM de Mn estavam maiores e desorganizadas nas proximidades dos feixes vasculares quando comparadas com as plantas controle (Fig. 2E).

Através dos cortes anatômicos, foi possível observar também, na região da epiderme abaxial das folhas, a presença das microalgas. Nas plantas expostas ao Mn, além da presença das microalgas foi verificada a ocorrência de uma massa mucilaginosa de coloração semelhante a observada nas coifas das raízes, (Fig. 2F-G).

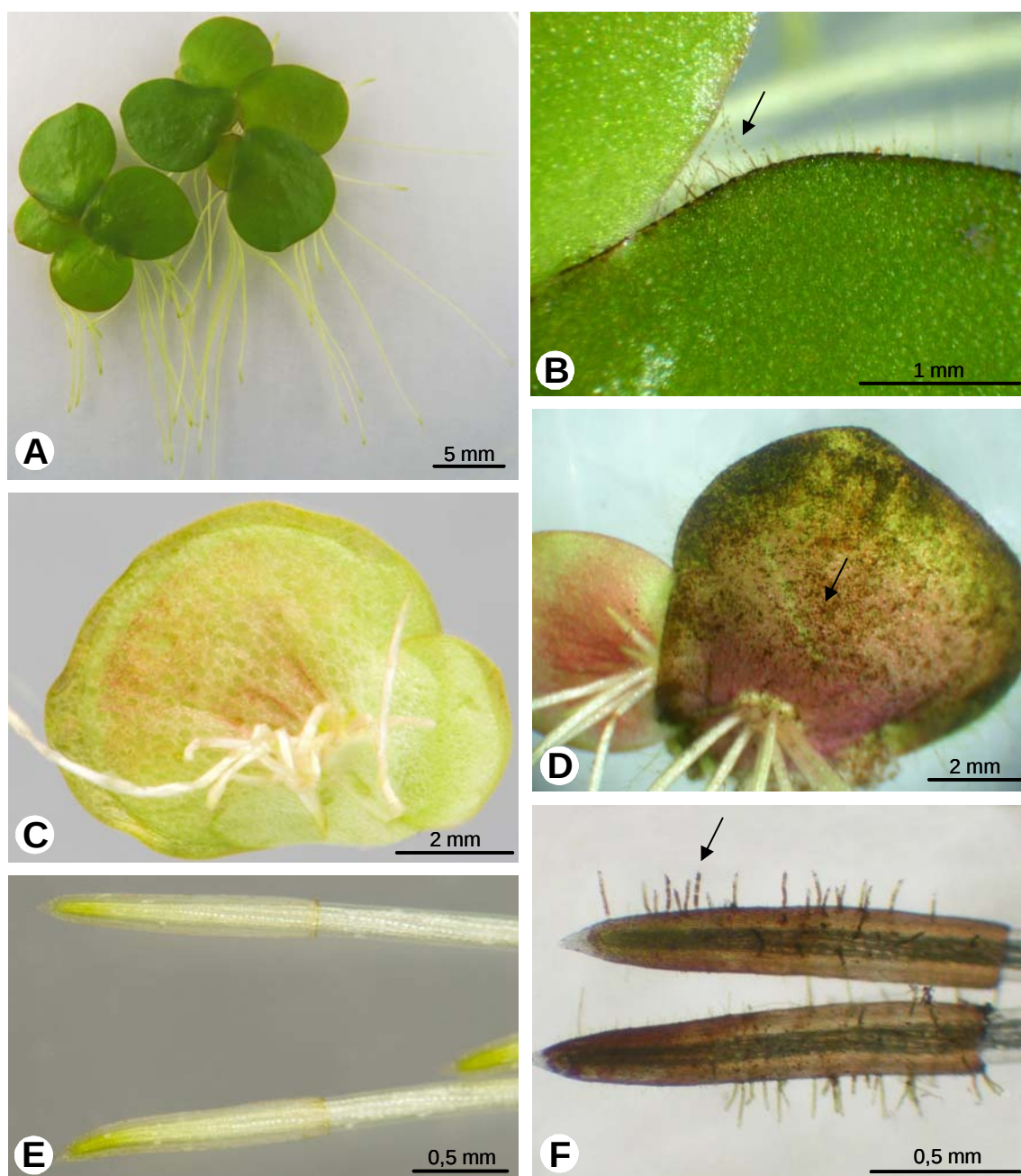


Figura 1. *Spirodela polyrhiza*: plantas controle (A, C e E) e plantas expostas a 0,4 mM de Mn (B, D e F). A - vista geral da planta controle; B - detalhe da face adaxial de plantas expostas ao Mn, seta indicando a borda com coloração marrom e a presença de microalgas epífitas; C - face abaxial da folha de plantas controle; D - face abaxial da folha de plantas expostas ao Mn, com numerosas manchas marrons (seta); E - raiz de plantas controle; F - raiz de plantas expostas ao Mn mostrando a coifa com coloração laranja/amarronzado e a presença de microalgas associadas (seta).

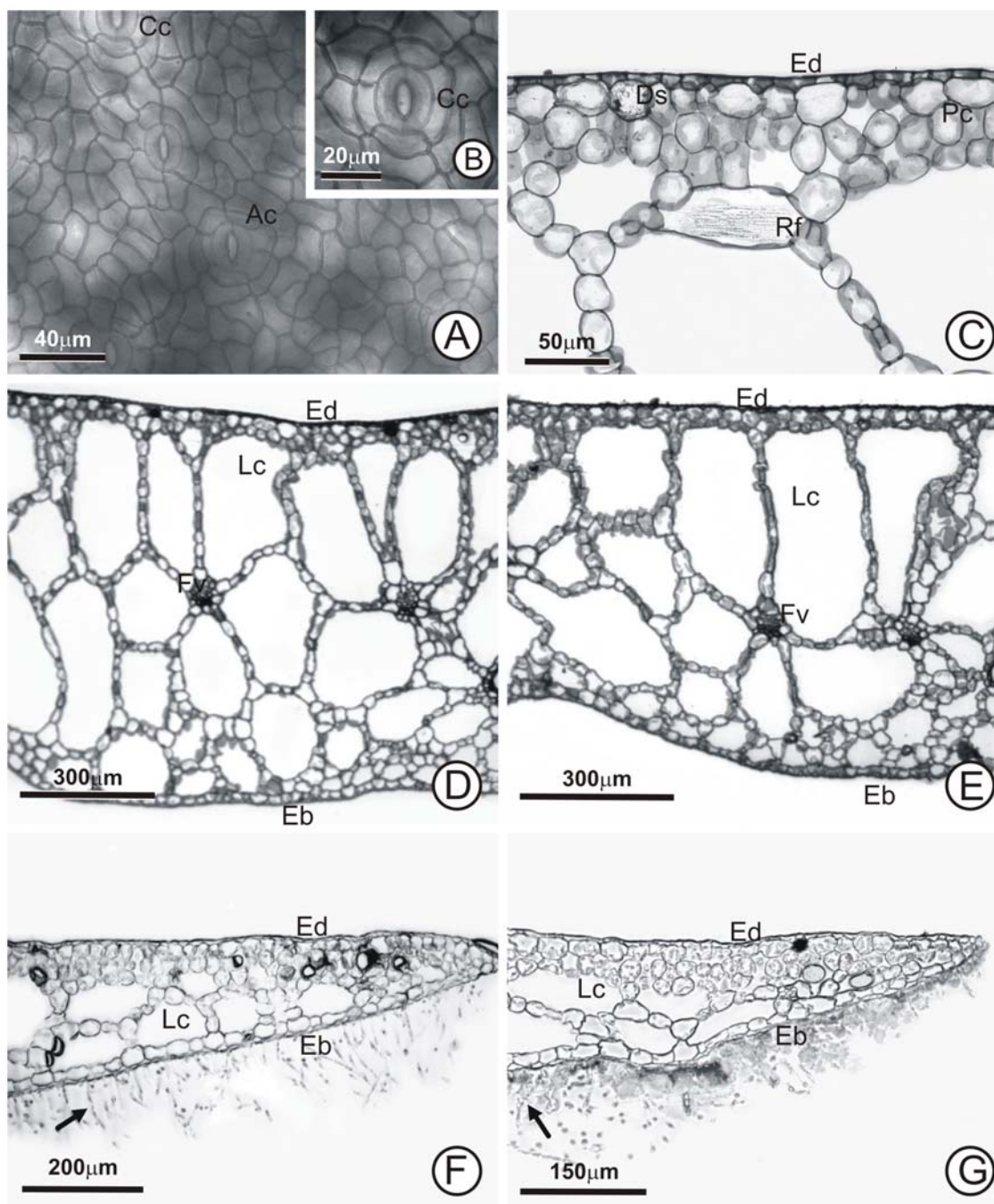


Figura 2 – Caracterização anatômica da folha de *Spirodela polyrhiza* em plantas controle e expostas a $0,4 \text{ mM L}^{-1}$ de Mn. A - Vista frontal da folha diafanizada, evidenciando estômatos do tipo actinocítico (Ac) e ciclocítico (Cc); B - Detalhe do estômato tipo ciclocítico; C a G - Cortes transversais; C - Detalhe do mesofilo evidenciando a presença de drusa (Ds) e ráfides (Rf); D - vista geral do mesofilo evidenciando lacunas (Lc) do aerênquima, em plantas controle; E - vista geral do mesofilo evidenciando lacunas (Lc) do aerênquima, em plantas expostas ao Mn. Notar o desarranjo do aerênquima nas proximidades dos feixes vasculares; F - vista geral da epiderme abaxial mostrando a presença de microalgas (setas) em plantas controle; G - vista geral da epiderme abaxial de plantas tratadas com Mn, mostrando a presença de massa mucilaginosa e microalgas (seta) aderidas.

3.3. Crescimento das plantas

Os resultados mostraram que houve redução de 5% no crescimento das plantas de *S. polyrhiza* expostas a 0,4 mM de Mn. Embora este percentual tenha sido relativamente baixo, os dados indicam que o excesso de Mn em solução causou inibição no crescimento das plantas ($P < 0,05$). Entretanto, a área foliar e o comprimento das raízes de plantas expostas ao Mn não apresentaram diferenças em relação às plantas controle. Os valores médios da taxa de crescimento relativo, da área foliar e do comprimento das raízes, segundo o teste de Tukey, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Taxa de crescimento relativo (TCR), área foliar e comprimento de raiz de plantas controle e expostas a 0,4 mM de Mn

Tratamento (mMol L ⁻¹)	TCR (mg g ⁻¹ MS)	Área foliar (cm ²)	Comprimento raiz (mm)
0,0	187,475 a ± 1,66	1,28 a ± 0,37	22,12 a ± 0,50
0,4	180,457 b ± 1,33	1,30 a ± 0,70	22,04 a ± 0,62

Os dados são médias de cinco repetições ± SD. Valores em cada coluna representados por letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

3.4. Conteúdo de pigmentos

O excesso de Mn alterou significativamente o conteúdo de clorofila total ($P < 0,02$), de carotenóides ($P < 0,03$) e antocianinas ($P < 0,01$). As plantas expostas ao Mn apresentaram redução, em média de 13% do conteúdo de clorofila total, 10% de carotenóides e 19% de antocianina quando comparados aos valores obtidos para as plantas controle (Fig. 3 A-C).

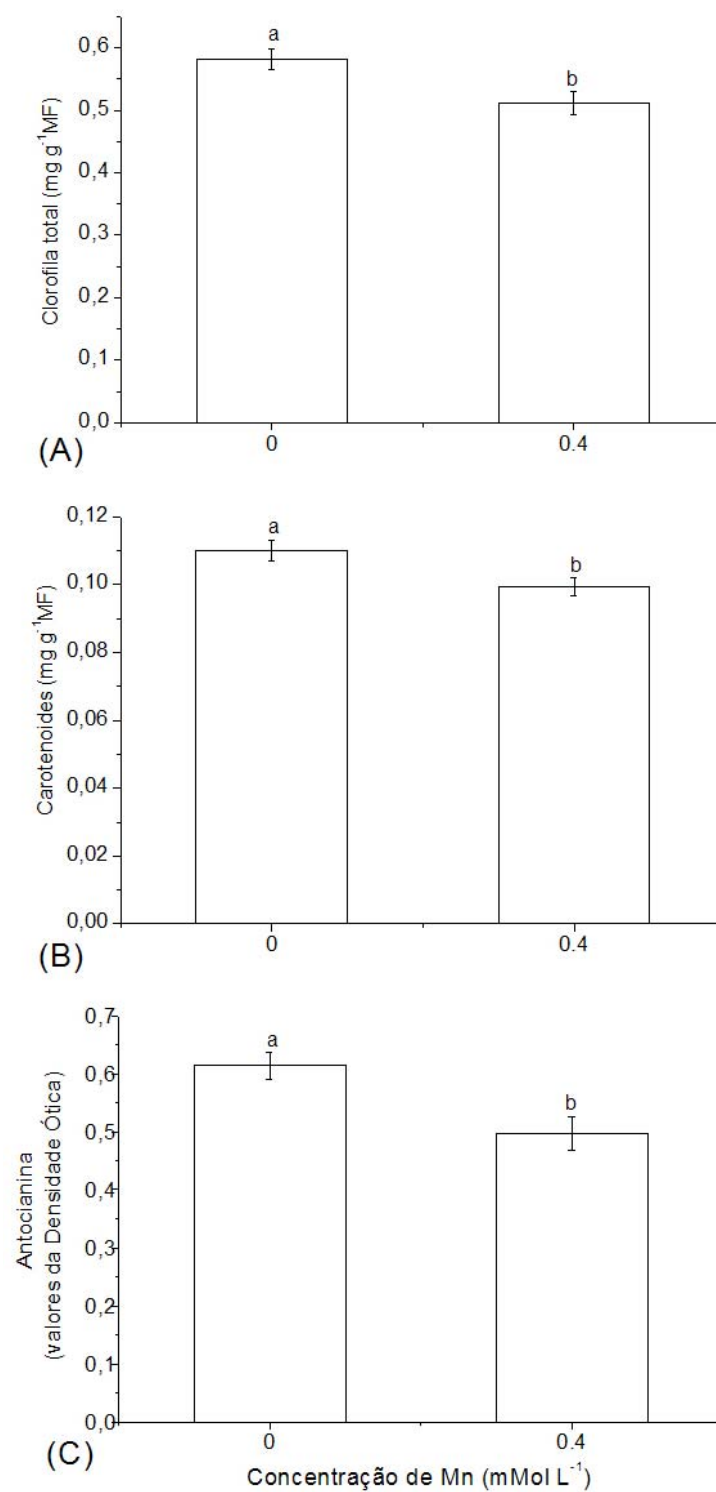


Figura 3. Conteúdo de clorofila total (A), carotenóides (B) e antocianinas (C) em plantas de *Spirodela polyrhiza* controle e submetidas a 0,4 mM de Mn. Os valores são médias de 5 repetições. Barras representam $\pm$ S.D. Valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

3.5. Atividade das enzimas Peroxidases (POX) e Catalase (CAT)

A atividade da POX não foi alterada significativamente entre plantas controle e expostas ao Mn (Fig. 4A). Porém, o excesso de Mn reduziu a atividade da catalase ($P < 0,04$) (Fig. 4B).

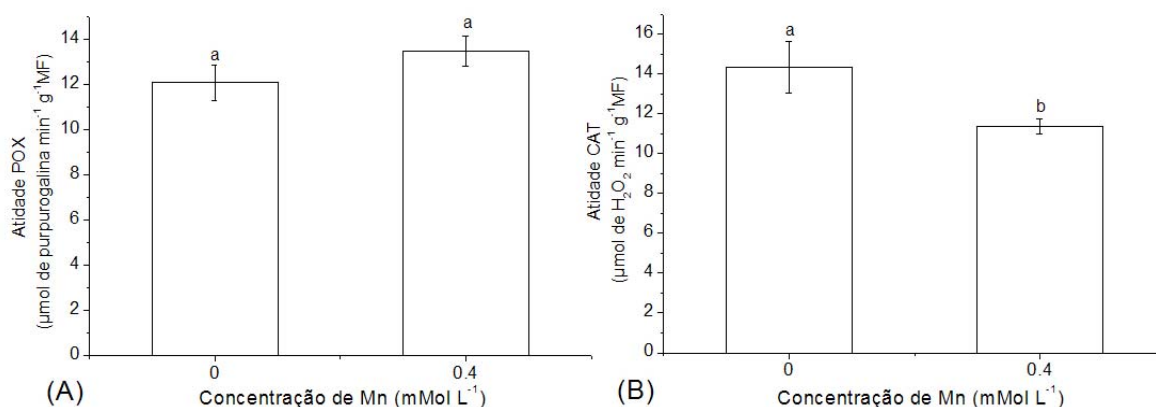


Figura 4. Atividade enzimática da POX (A) e CAT (B) em plantas de *Spirodela polyrhiza* controle e submetidas a 0,4 mM de Mn. Os valores são médias de 5 repetições. Barras representam $\pm$ S.D. Valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

3.6. Acúmulo de Mn nas plantas

O conteúdo de Mn em plantas de *S. polyrhiza* submetidas à concentração 0,4 mM de Mn foi significativamente maior do que nas plantas controle ($P < 0,0001$) (Fig. 5). Plantas expostas ao Mn, apresentaram em média 15,830 mg g⁻¹MS de Mn em seus tecidos e plantas controle 0,157 mg gMS⁻¹.

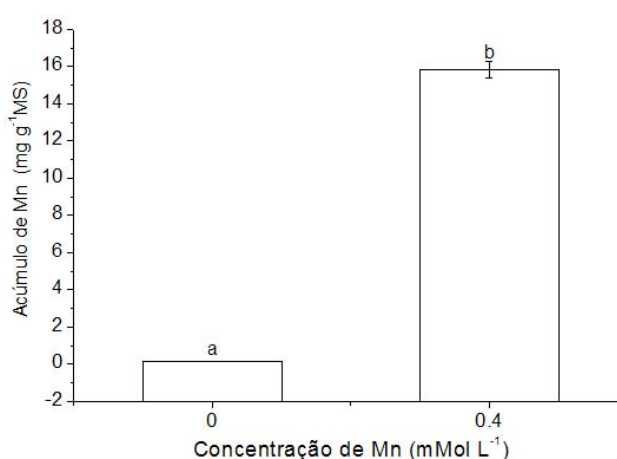


Figura 5. Acúmulo de Mn em plantas de *Spirodela polyrhiza* controle e submetidas a 0,4 mM de Mn. Os valores são médias de 5 repetições. Barras representam $\pm$ S.D. Valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

4. Discussão

O manganês (Mn) tem sido considerado um sério problema ambiental, em função das concentrações elevadas do metal no ambiente, principalmente no meio aquático (Martins e Lima, 2001). A presença de Mn afeta processos fisiológicos e bioquímicos associados ao crescimento e desenvolvimento dos vegetais (Shi et al. 2006).

No presente estudo, plantas de *S. polyrhiza* expostas ao Mn apresentaram clorose e pontos marrons nas folhas. Estes sintomas têm sido relatados por Wissemeier e Horst, (1992) e Kitao et al. (2001), como sendo sintomas específicos de toxidez por Mn. O surgimento de clorose nas folhas, pode estar associado a redução do conteúdo de clorofila, o que foi constatado nas plantas de *S. polyrhiza*. Pontos marrons têm sido indicados em plantas terrestres, como sendo Mn oxidado (Wissemeier e Horst, 1992; Kitao et al. 2001). A expressão dos sintomas de toxicidade de Mn, provavelmente, depende do estado fisiológico, relacionado com a idade foliar, bem com a distribuição de Mn e a concentração dentro da folha (Kitao et al., 2001).

O excesso de Mn, aparentemente, também causou um desarranjo no aerênquima das folhas de *S. polyrhiza*. Fowler e Morgan (1972) e Morgan et al. (1976) apresentaram uma hipótese de que o excesso de Mn no tecido vegetal causa um desequilíbrio na concentração de auxina, que por sua vez estimula o aumento das concentrações de etileno nas células. O aumento do etileno nos tecidos vegetais acelera a atividade de enzimas que degradam a parede celular, e levam a formação de lacunas que constituem o aerênquima (He et al., 1996). Portanto, a presença excessiva de etileno nas células de plantas tratadas com Mn, pode ter acarretado as alterações no padrão de disposição das lacunas do aerênquima observadas neste estudo.

Apesar de não ter sido observado alterações na área foliar das plantas em resposta ao Mn, verificou-se que houve redução na produção de matéria seca, a qual pode estar relacionada com o aumento das lacunas do aerênquima nas plantas tratadas. A perda de camadas de células do mesofilo dando lugar à formação de lacunas juntamente com o decréscimo do conteúdo de clorofila pode ter resultado na diminuição da biomassa das plantas. A inibição do crescimento das plantas de *S. polyrhiza* induzida pelo Mn, parece ter sido menos afetada do que a inibição da síntese de clorofila e dos outros pigmentos.

O conteúdo de clorofila total foi reduzido significativamente em plantas exposta ao metal. Vários trabalhos têm demonstrado que o excesso de Mn reduz o conteúdo de clorofila (Clairmont, et al., 1986; Sinha, et al., 1994; Gonzáles et al., 1998). Acredita-se

que este processo ocorra envolvendo mais de um mecanismo (Hauck et al., 2003) e pode ser interpretado como sendo um processo tanto de atuação direta como indireta do Mn sobre a molécula de clorofila.

O Mn induz a deficiência de Ferro (Fe) e esse mecanismo se dá pela competição do Mn pelo mesmo sítio de ação do Fe (Csatorday et al., 1984). O Fe é essencial na biossíntese da clorofila e está presente no processo de conversão da protoporfirina em protoclorofila (Csatorday et al., 1984; Beale, 1999). A deficiência de Fe durante este processo de biossíntese da clorofila, leva ao acúmulo de protoporfirina e, concomitantemente, acarreta retardamento na síntese de clorofila (Csatorday et al., 1984). Assim, tem sido sugerido que o decréscimo de clorofila em plantas expostas as altas concentrações de Mn ocorra em parte, em função da deficiência de Fe (Csatorday et al., 1984; Sinha, 1994; Hauck et al., 2003). Outra hipótese apresentada para explicar o efeito do Mn sobre o decréscimo do conteúdo de clorofila, está ligada ao fato de que o Mn reduz o Mg^{2+} intracelular, substituindo-o na molécula de clorofila (Mukaopadhyay e Sharma, 1991; Hauck et al., 2002a) o que inevitavelmente promoverá a desnaturação desta molécula.

Plantas de *S. polyrhiza* expostas ao Mn, também apresentaram uma redução do conteúdo de carotenóides. Resultado semelhante foi obtido por Caldwell (1998); Lidon et al. (2004) e Asrar et al. (2005) em diferentes espécies terrestres. A redução do conteúdo de carotenóides tem sido explicada, pelo fato de que o acúmulo de Mn no tecido foliar parece causar um dessaranjo nos tilacóides, que por sua vez, interfere no conteúdo de pigmentos localizados nestas estruturas (Hauck, 2002b; McQuattie e Schier, 2000 e Lindon et al., 2004). Lindon et al. (2004) constataram que o aumento da concentração de Mn no tecido foliar, acarretou o aumento desse elemento nos tilacóides. O acúmulo de Mn nos tilacoides provavelmente interfere no empilhamento e no conteúdo de pigmentos. Este fato poderia explicar a redução do conteúdo de carotenóides constatado em plantas *S. polyrhiza*, associado ao decréscimo do conteúdo de clorofila total.

O conteúdo de antocianina nos tecidos de *S. polyrhiza* também foi reduzido em resposta a exposição ao Mn. Informações relativas ao efeito do excesso de Mn sobre a síntese de antocianina são escassas. Entretanto, baseando-se no processo de biossíntese da molécula de antocianina proposto por Wilmouth et al. (2002), sugere-se que o Mn pode estar inibindo a produção de antocianina pelo mesmo processo que promove a inibição da síntese de clorofila. Provavelmente, este fato também está relacionado com a deficiência de Fe, causada pelo excesso de Mn na solução.

Enzimas que requerem o Fe como cofator, catalizam reações envolvidas no processo de conversão de moléculas que antecedem a formação da antocianina (Wilmouth et al., 2002). Acredita-se que a deficiência de Fe ou a substituição do íon Fe pelo íon Mn levaria a desnaturação destas enzimas. As enzimas perderiam sua atividade catalítica no processo de biossíntese e, conseqüentemente, promoveriam o decréscimo na produção de antocianina.

Enzimas como a catalase (CAT), a peroxidase (POX) e outras, participam do mecanismo de proteção contra os danos causados pela presença de radicais livres. Geralmente, a atividade das enzimas antioxidantes é aumentada em situações de estresse, conferindo proteção às plantas (Mishra e Singhal, 1992; Santandrea et al., 2000; Shah et al., 2001; Fecht-Christoffers et al., 2003).

A POX é amplamente distribuída nas células vegetais e tem a função de eliminar do metabolismo celular as moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formadas (Arora, et al., 2002). No presente estudo, os resultados mostraram que o excesso de Mn não alterou a atividade das peroxidases. Trabalhos realizados com plantas arbóreas e herbáceas (Panda et al., 1986; Shi et al., 2006), demonstraram que o excesso de Mn levou a peroxidação de lipídios, indicando aumento na produção das espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, um aumento da atividade das peroxidases.

Resultados não diferenciados na atividade das peroxidases, em plantas de *S. polyrhiza* exposta ao Mn e plantas controle, associado ao decréscimo do conteúdo de carotenóides e antocianinas, podem estar relacionados a um baixo mecanismo de defesa nestas plantas. Além disso, também foi constatado redução na atividade da catalase, em resposta a exposição de Mn. Shi et al. (2006) verificaram redução na atividade da catalase em *Cucumis sativus* exposta ao Mn. O decréscimo na atividade da CAT tem sido interpretado também, pela deficiência de Fe induzida pelo Mn (Morgan et al. 1976; Csatorday et al., 1984; Sinha, et al., 1994). O ferro é um componente da enzima catalase (Quail, 1979), e a atividade desta enzima tende a diminuir sob condições de deficiência de Fe.

O efeito tóxico do íon Mn parece, pelo menos em parte, estar relacionado a influencia desse íon sobre os íons Fe e Mg. No presente experimento, o conteúdo de Fe e Mg nas plantas expostas ao excesso de Mn não foi avaliado. Contudo, observa-se em outros estudos decréscimos significativos na concentração de íons de Fe e Mg em plantas expostas a excesso de Mn (Sinha, et al., 1994; Shi et al., 2006).

As alterações encontradas no metabolismo de *S. polyrhiza*, provavelmente estão relacionadas ao elevado valor de Mn acumulado nos tecidos dessas plantas (15,830 mg

g⁻¹MS). Os cortes anatômicos sugerem que o Mn pode ter sido adsorvido pela face abaxial das folhas, as quais estão diretamente em contato com a solução contendo Mn, o que levaria ao aumento da concentração de Mn nos tecidos das plantas. Outros trabalhos têm sugerido que o mecanismo predominante para a remoção de metais por macrófitas aquáticas tem sido através do processo de adsorção e, posteriormente, acúmulo intracelular (Noraho e Gaur, 1996; Oliguín et al., 2005).

A existência de grande número de microalgas epífitas aderidas à superfície das folhas e das raízes, provavelmente tenham contribuído para aumentar o acúmulo de Mn. A coloração laranja/amarronzada observada no interior das microalgas sugere que esses microrganismos também tenham absorvido Mn, ou que pelo menos em parte, contribuíram para a adsorção do Mn na superfície das folhas.

Concluiu-se que o excesso de Mn em solução nutritiva causou efeitos tóxicos no metabolismo das plantas de *S. polyrhiza*, levando a redução do crescimento, do conteúdo de pigmentos e da atividade da catalase, além de promover o desarranjo do aerênquima. Entretanto, a espécie estudada pode ser considerada uma boa acumuladora de Mn, por ter acumulado valores elevados do metal em seus tecidos e este fato foi a causa dos efeitos deletérios observados nas plantas.

Pesquisas deverão ser conduzidas, posteriormente, para investigar os mecanismos que conferem a esta espécie a capacidade para acumular elevadas concentrações de Mn. Assim como, estudos sobre a anatomia foliar de *S. polyrhiza*, a fim de compreender melhor o papel do Mn no desarranjo do aerênquima. Pretende-se também, avaliar as interações da ocorrência das microalgas com plantas de *S. polyrhiza*, no processo de sequestro de Mn. A elucidação das vias metabólicas envolvidas no processo de acúmulo e resposta ao Mn possibilitará a adequação e o uso desta espécie como fitorremediadora e/ou bioindicadora de ambientes aquáticos impactados pelo Mn.

5. Referencias bibliograficas

- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R., 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109, 1247-1257.
- Arnon, D. I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol-oxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- Arora A., Sairam R. K., Srivastava G. C., 2002. Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Curr. Sci.* 82, 1227- 1238.
- Asrar, Z., Khavari-Nejad, R.A., Heidari, H., 2005. Excess manganese effects on pigments of *Mentha spicata* at flowering stage. *Arch Agronomy Soil Sci.* 51, 101-107.
- Beale, S.I., 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.* 60, 43-73.

- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D., 1994. Superoxide dismutase in plants. *Crit Ver Plant Sci.* 13, 199-218.
- Büchel, C., Barber, J., Ananyev, G., Eshaghi, S., Watt, R., Dismuke, C., 1999. Photoassembly of the manganese cluster and oxygen evolution from monomeric and dimeric CP 47-reaction center photosystem II complexes. *Proc Natl Acad Sci.* 96, 14288-14293.
- Caldwell, C.R., 1998. Effect of elevated manganese on the ultraviolet and blue light-absorbing compounds of cucumber cotyledon and leaf tissues. *J Plant Nutr.* 21, 435-445.
- Chance, B., Machley, A.L., 1955. Assays of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764-775.
- Clairmont, K. B., Hagar, W. G., Davis, E. A., 1986. Manganese toxicity to chlorophyll synthesis in *Tobacco Callus*. *Plant Physiol.* 80, 291-293.
- Cracker, L. E., Wetherbee, P. J., 1973. Ethylene, light, and anthocyanin synthesis. *Plant Physiol.* 51, 436-438.
- Csatorday, K., Gombos, Z., Szalontai, B., 1984. Mn^{2+} and Co^{2+} toxicity in chlorophyll biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 476-478.
- Dangles, O., Wigand, M. C., Brouillard, R., 1992. Anthocyanin anti-copigment effect. *Phytochemistry* 31, 3811-3812.
- De Vos, C.H.R., Schat, S., 1991. Free radicals and heavy metal tolerance. In: Rozeman, J. and Verkleij, J.A.C. (Ed.), *Ecological response to environmental stress*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp. 22-30.
- Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P. P. 2004. Hydrophytes lack potential to exhibit cadmium stress induced enhancement in lipid peroxidation and accumulation of proline. *Aquatic Toxicol.* 66, 141-147.
- Do, C., Cornier, F., 1990. Accumulation of anthocyanin enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell* 9, 143-146.
- Fecht-Christoffers, M.M., Maier, P., Horst, W.J., 2003. Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. *Physiol. Plant* 177, 237-244.
- Fernando, D. R., Bakkaus, E. J., Perrier, N., Baker, A. J.M., Woodrow, I. E., Batianoff, G. N., Collins, R. N., 2006. Manganese accumulation in the leaf mesophyll of four tree species: a PIXE/EDAX localization study. *New Phytol.* 171, 751-758.
- Foy, C.D., 1984. Physiological effects of hydrogen, alumin and manganese toxicides in acid soil. In: Adams, F. (Ed.), *Soil Acidity and Liming*, second ed. ASA-CSSA-SSSA, WI, USA, Agronomy Monograph No.12. pp. 57-97.
- Foot, J. P., Caporn, S. J. M., Lee, J. A., Ashenden, T. W., 1996. The effect of long-term ozone fumigation on the growth, physiology and frost sensitivity of *Calluna vulgaris*. *New Phytol.* 133, 503-511.
- Fowler, J. L., Morgan, P.W., 1972. The relationship of the peroxidase indoleacetic acid oxidase system to *in vivo* ethylene synthesis in cotton. *Plant Physiol.* 49, 555-559.
- González, A., Steffen, K.L., Lynch, J.P., 1998. Light and excess manganese. *Plant Physiol.* 118, 493-504.
- Guimarães, F.P., 2006. Potencial de macrófitas aquáticas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Hauck, M., Mulack, C., Paul, A., 2002a. Manganese uptake in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *Environ. Exp. Bot.* 48, 107-117.
- Hauck, M., Paul, A., Mulack, C., Fritz, E., Runge, M., 2002b. Effects of manganese on the viability of vegetative diaspores of the epiphytic lichen *Hypogymnia physodes*. *Environ. Exp. Bot.* 47, 127-142.

- Hauck M., Paul, A., Cross, S., Raubuch, M., 2003. Manganese toxicity in epiphytic lichens: chlorophyll degradation and interaction with iron and phosphorus. *Environ. Exp. Bot.* 49,181-191.
- Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO². *Plant Physiol.* 89, 952-957.
- He, C.J., Morgan, P.W., Drew, M.C., 1996. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiol.* 112, 463-472.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Bulletin 347. California Agricultural Experiment Station. 37p.
- Houtz, R. L., Nable, R. O., Cheniae, G.M., 1988. Evidence for effects on the “in vivo” activity of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase during development of Mn toxicity in tobacco. *Plant Physiol.* 86, 1143-1149.
- Hunt, R., 1978. Plant growth analysis. London, Edward Arnold Publishers Limited. 67p.
- Ishii, G., Mori, M., Umemura, Y., 1996. Antioxidative activity and food chemical properties of anthocyanins from the colored tuber flesh of potatoes. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 43, 962-966.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 423p.
- Karnovsky, M. J., 1965. A formaldehydegutaldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137-138.
- Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57, 315-319.
- Kitao, M., Lei, T. T., Nakamura, T., Koike, T. 2001. Manganese toxicity as indicated by visible foliar symptoms of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. japonica). *Environ Pollution* 111, 89-94.
- Li, J., Ou-Lee, T., Raba, R., Amundson, R.G., Last, R.L., 1993. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell.* 5, 171-179.
- Li, T.Y., Xiong, Z.T., 2004. Cadmium-induced colony disintegration of duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) and as biomarker of phytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 174-179.
- Lichthenthaler, H. K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick, S. P., and Kaplan, N. O. *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego pp. 350-382.
- Lidon, F.C., Teixeira, M.G., 2000. Oxy radicals production and control in the chloroplast of Mn-treated rice. *Plant Sci.* 152, 7-15.
- Lidon, F. C., Barreiro, M. G., Ramalho, J. C., 2004. Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. *J. Plant Physiol.* 161, 1235-1244.
- Macfie, S. M., Taylor, G.J., 1992. The effects of excess manganese on photosynthetic rate and concentration of chlorophyll in *Triticum aestivum* grown in solution culture. *Physiol Plant.* 85, 467-475.
- Macfie, S. M., Cossins, E.A., Taylor, G.J., 1994. Effects of manganese excess on production of organic acids in Mn-tolerant and Mn-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L(wheat). *J Plant Physiol.* 143, 135-144.
- McQuattie, C., Schier, G.A., 2000. Response of sugar maple (*Acer saccharum*) seedling to manganese. *Can. J. For. Res.* 30, 456-467.
- Martins, I., Lima, I. V., 2001. Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. *Caderno de referência ambiental.* v. 7, 121 p.
- Memon, A.R., Yatazawa, M., 1980. Distribution of manganese in leaf tissues of manganese accumulator: *Acanthopanax sciadophylliodes* as revealed by electron probe X-ray microanalyzer. *J Plant Nutr.* 2, 457-476.

- Mishra, R. K, Singhal, G.S., 1992. Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of lipids. *Plant Physiol.* 98, 1- 6.
- Morgan, P. W., Taylor, D. M., He, C. J., 1976. Manipulation of IAA-oxidase activity and auxin-deficiency symptoms in intact content plants with manganese nutrition. *Physiol Plant.* 31, 149-156.
- Mukaopadhyay, M.J., Sharma, A., 1991. Manganese in cell metabolism of higher plants. *Bot. Rev.* 51, 117-149.
- Noraho N., Gaur, J.P., 1996. Cadmium adsorption and intracellular uptake by two macrophytes, *Azolla pinnata* and *Spirodela polyrrhiza*. *Arch Hydrobiol.* 136, 135-144.
- O'brien, T.P.; Feder, N.; McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59, 368-373.
- Olguín, E.J., Sánchez-Galván, G., Pérez-Pérez, T., Pérez-Orozco, A., 2005. Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb (II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32, 577- 586.
- Panda S., Mishra, A.K., Biswal, U.C., 1986. Manganese-induced modification of membrane lipid peroxidation during aging of isolated wheat chloroplast. *Phytobiochem Photobiophys* 13, 53-61.
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'ana, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A., 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on actives of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev Bras Fisiol Veg.* 11, 137-143.
- Pott, V. J., Pott, A., 2000. Plantas Aquáticas do Pantanal. EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá, MS. 404p.
- Quail, P.H., 1979. Plant cell fractionation. *Annu Ver Plant Physiol.* 30, 425-484.
- Santandrea, G., Pandolfini, T., Bennici, A., 2000. A physiological characterization on of Mn-tolerant tobacco plants selected by "in vitro" culture. *Plant Sci.* 150, 163-177.
- Santos, G.V., 2006. Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao arsênio. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S., Dubey, R.S., 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion geration and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedling. *Plant Sci.* 161, 1135-1144.
- Sharma, S.S., Gaur, J.P., 1995. Potential of *Lemna polyrrhiza* for removal of heavy metals. *Ecol. Eng.* 4, 37- 45.
- Schreinemakers, W.A.C., 1984. Efeccts of metal íons on growth and íon absorbtion by *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. Efeccts of iron, magnesium and zinc. *Z. Pflanzenphysiol.* 114, 123-129.
- Shi, Q., Zhu, Z., Xu, M., Quian, Q., Yu, J., 2006. Effect of excess manganese on the antioxidant system in *Curcumis sativus* L, under two light intensties. *Environ and Exp. Bot.* 58, 197-205.
- Sinha, S., Rai, U.N., Chandra, P., 1994. Accumulation and toxicity of iron manganese in *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. *Environ. Contam. Toxicol.* 53, 610-617.
- Tedesco, M. J., Gianello, C., Bissani, C. A., Bohnen, H., Volkweiss, S. J., 1995. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS, 174 p.
- Tripathi, R. D., Chandra. P., 1991. Chromium uptake by *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden in relation to metal chelators and pH. *Environ Contam Toxicol.* 447, 767-769.
- Wilkinson, R. E.; Ohki, K., 1988. Influence of manganese deficiency and toxicity on isoprenoid syntheses. *Plant Physiol.* 87, 841-846.

- Wilmouth, R. C, Turnbull, J.J. Welford, R.W.D., Clifton, I. J. Prescott, A. G., Schofield, C. J., 2002. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* 10, 93–103.
- Wissemeier, A.H., Horst, W.J., 1992. Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant Soil* 143, 299-309

CONCLUSÃO GERAL

Dentre as três macrófitas aquáticas estudadas no presente trabalho: *A. caroliniana*, *S. minima* e *S. polyrhiza* a espécie *S. polyrhiza* demonstrou a maior capacidade para acumular Mn em solução. Entretanto, esta espécie apresentou sintomas de toxidez quando exposta as concentrações mais elevadas de Mn (0,3 e 0,4 mM). A utilização dessa espécie em fitorremediação pode se tornar promissora, principalmente, em ambientes onde as concentrações de Mn não são elevadas.

Trabalhos futuros, com abordagem proteômica e análises ultraestruturais serão conduzidos, a fim de elucidar os mecanismos de resposta e acúmulo de Mn por *S. polyrhiza*. O melhor entendimento deste processo e a correta identificação dos componentes desta via permitirão a adequação e o uso da espécie como fitorremediadora e/ou bioindicadora, além de, contribuir para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem o aprimoramento dos mecanismos de tolerância ao Mn nesta e outras espécies aquáticas.

Estudos que buscam avaliar o potencial de diferentes espécies de plantas aquáticas para acumular Mn e a utilização dessas plantas na tecnologia de fitorremediação são escassos. Pesquisas com essa abordagem precisam ser incentivadas, visto que a toxidez por Mn tem se tornado um importante problema ambiental, principalmente no estado de Minas Gerais, onde o metal ocorre em abundância na rocha matriz.