



**KATIÚCIA DIAS FERNANDES**

**UTILIZAÇÃO DE CAPIM-ARROZ  
(*Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv.) PARA  
FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO  
EVIDENCIADO POR *SPECKLE* LASER  
DINÂMICO E MODIFICAÇÕES  
ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS**

**Lavras – MG**

**2014**

**KATIÚCIA DIAS FERNANDES**

**UTILIZAÇÃO DE CAPIM-ARROZ (*Echinochloa crusgalli* (L.) P.  
*Beauv.*) PARA FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO EVIDENCIADO  
POR *SPECKLE* LASER DINÂMICO E MODIFICAÇÕES  
ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.**

**Orientador**

**Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro**

**Lavras – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Fernandes, Katiúcia Dias.

Utilização de capim-arroz (*Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv.)  
para fitorremediação de cádmio evidenciado pelo speckle laser  
dinâmico e modificações anatômicas e fisiológicas / Katiúcia Dias  
Fernandes. – Lavras : UFLA, 2014.

85 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. Fitotecnologia. 2. Metal pesado. 3. Raiz. 4. Morfologia interna.  
5. Gramíneas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.20889

**KATIÚCIA DIAS FERNANDES**

**UTILIZAÇÃO DE CAPIM-ARROZ (*Echinochloa crusgalli* (L.) P.  
*Beauv.*) PARA FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO EVIDENCIADO  
POR *SPECKLE* LASER DINÂMICO E MODIFICAÇÕES  
ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.**

APROVADA em 21 de novembro de 2014.

Prof. Dra. Dalva Graciano Ribeiro – UFG

Prof. Dr. João Argenta – UNILAVRAS

Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior – UFLA

Prof. Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme – UFLA

Prof. Dra Vânia Helena Techio - UFLA

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro  
Orientador

**Lavras – MG**

**2014**

Ao meu marido e companheiro, Adler, por seu amor e incentivo, mesmo à distância, lembrando-me sempre de que posso mais do que imagino;

A minha filha, Yasmin, que está a caminho;

A toda minha família, meus pais, irmãos, sogros e cunhados por me apoiarem, me incentivarem nessa jornada.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTO

A Deus e a Nossa Senhora da Guia, que me protegeram e encorajaram nesses anos longe de casa e na estrada.

Ao meu marido, Adler, pelo apoio, dedicação e amor em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Eva e Ênio, e a meus irmãos Kássio Henrique e Mara, pelo apoio e incentivo.

A minha madrinha, Josefina, que sempre me incentivou a estudar e sempre quis que eu fosse doutora.

Ao meu orientador, Prof. Evaristo Mauro de Castro, pela orientação e pela confiança demonstrada durante esse tempo de aprendizado.

Aos professores do programa Botânica Aplicada, pelos conhecimentos adquiridos, em especial, aos professores Fabricio José Pereira e Adriana Nakamura, pelos ensinamentos e conselhos.

Aos amigos do programa Botânica Aplicada, em especial, a primeira turma de mestrado e doutorado. Foram muitas trocas de experiências, novas amizades e incentivos mútuos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao departamento de Biologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao prof. Roberto Alves Júnior, pela prontidão, auxílio, coorientação e por permitir o acesso ao Laboratório do Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada à Agropecuária (CEDIA/DEG). Ao mestrando Renan, pela prontidão e auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos, possibilitando-me realizar este doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento ao trabalho, permitindo sua condução.

Aos membros da banca, pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Ao Instituto Rio-grandense do Arroz por ceder as sementes de *Echinochloa crusgalli* utilizadas nesta pesquisa.

A todos do Laboratório de Anatomia Vegetal, em especial, aos doutorandos e amigos Juliana, Marines, Luiz, Márcio e ao laboratorista Ítalo, pela troca de informações e ajuda com análises.

Aos estagiários, em especial, Heloísa e Fernanda, por todo acompanhamento e auxílio na condução dos trabalhos.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Obrigada!

## RESUMO

Conhecer a capacidade que algumas plantas têm de sobreviver e predominar em ambientes ricos em metais pesados é essencial para o desenvolvimento de estratégias de fitorremediação. Porém, na maioria das vezes, para estudar a estrutura e o funcionamento das plantas, são aplicadas técnicas que demandam tempo e custo. Assim, esse trabalho teve como objetivo conhecer a atividade biológica evidenciada pelo *biospeckle* laser associada à morfologia da ponta da raiz de capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*) cultivada em solução com cádmio, além de avaliar suas características morfofisiológicas. As mudas de *Echinochloa crusgalli* foram mantidas por 15 dias em casa de vegetação, em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). Utilizou-se DIC com 8 tratamentos e 4 repetições, 10 plantas por repetição e 2 repetições por bandeja. As concentrações utilizadas nos tratamentos foram: tratamento controle (0); 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L<sup>-1</sup> de cádmio na forma de Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O. As plantas de *Echinochloa crusgalli* de cada repetição foram colocadas em tubo de ensaio contendo 150 ml de meio de cultivo simples à base de Ágar-Ágar. As imagens dos padrões de “*speckle*” foram capturadas em 128 imagens por raiz, com uma taxa de 10 imagens por segundo. Amostras de folhas e raízes foram fixadas em FAA (formaldeído ácido acético e álcool 70%) e, posteriormente, conservadas em álcool 70° GL. Em seguida, foram utilizadas técnicas habituais em laboratórios de anatomia vegetal para o corte e a coloração das secções. Para cada tratamento, foram feitas 4 repetições e foram fotomicrografadas três secções por repetição. A técnica do *biospeckle* foi eficiente para evidenciar a atividade biológica de raízes de *E. crusgalli*, sendo possível concluir que altas concentrações de cádmio reduzem a atividade biológica da raiz. É possível afirmar que o crescimento e o desenvolvimento de *Echinochloa crusgalli* nas concentrações crescentes de Cd são afetados negativamente a partir da concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Concentrações acima de 1 mg L<sup>-1</sup> modificaram o córtex, a formação dos aerênquimas e a endoderme. A espécie tem características anatômicas que contribuem para a sua sobrevivência em ambiente aquático, contaminado com cádmio e tem potencial para ser utilizada em programas de fitorremediação até a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Em concentrações superiores a 1 mg L<sup>-1</sup> de Cd, *Echinochloa crusgalli* são mais apropriadas para a utilização na bioindicação da contaminação por Cd, devido aos sintomas ocasionados pelo metal.

Palavras-chave: Metal pesado. Endoderme. Raiz. Morfologia interna. Gramíneas

## Abstract

In order to develop phytoremediation strategies, it is essential to know that some plants have capacity to survive and prevail in environments rich in heavy metals. However, in most cases, in order to study the structure of plants, costly and time consuming techniques are applied. Thus, this study aimed at assessing the biological activity evidenced by laser biospeckle associated with the morphology of the root tip of barnyard grass root (*Echinochloa crusgalli*) grown in solution with cadmium and evaluate their morphological, physiological and chemical characteristics. The seedlings of *Echinochloa crusgalli* were maintained for 15 days in a Hoagland and Arnon's nutrient solution (1950) at a greenhouse. The completely randomized design was used with 8 treatments and 4 replications, 10 plants per repetition and 2 repetitions per tray. The concentrations used in the treatments were control (0); 0.01; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 and 8.0 mg L<sup>-1</sup> of cadmium as Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. Plants of *Echinochloa crusgalli* from each replicate were placed in a test tube containing 150 ml of culture medium based on simple agar. The images of the speckle pattern were captured in 128 frames per root, at a 10 frame rate per second. Leaf and root samples were fixed in FAA (Formalin-Acetic-Acid-Alcohol) and 70% ethanol and then preserved in alcohol 70 ° GL. Next standard techniques for plant anatomy laboratory were used for cutting and staining sections. For each treatment, four replicates were performed and three sections per replicate were photomicrographed. The remainder was dried and homogenized for assessing the content and Cd accumulation. The dynamic speckle technique was effective to demonstrate the biological activity of *E. crusgalli* roots, and it is possible conclude that high concentrations of cadmium reduce the biological activity of barnyard grass. With increasing concentrations of Cd, it can be argued that growth and development of *Echinochloa crusgalli* are negatively affected from an initial concentration of 0.1 mg L<sup>-1</sup>. Concentrations above 1 mg L<sup>-1</sup> modified the cortical parenchyma, aerenchyma and the endoderm formation. The species has anatomical features that contribute to their survival in the aquatic environment, contaminated with cadmium and has the potential to be used in phytoremediation programs up to a concentration of 0.5 mg L<sup>-1</sup> Cd. In concentrations higher than 1 mg L<sup>-1</sup> Cd, *Echinochloa crusgalli* are more appropriate for use as bioindicators of contamination by cadmium, due to the symptoms caused by metal.

Keyword: Heavy Metal. Endoderm. Root. Morphology. Barnyard grass.

## LISTA DE TABELAS

### **ARTIGO 1- ATIVIDADE BIOLÓGICA DE RAÍZES COM CÁDMIO EVIDENCIADO PELO SPECKLE LASER DINÂMICO**

Tabela 1. Médias da atividade biológica em cada região na ponta da raiz de *E. crusgalli*.....30

Tabela 2. Atividade biológica da ponta da raiz de *E. crusgalli* .....31

### **ARTIGO 2 - MODIFICAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE FOLHA E RAIZ DE CAPIM-ARROZ (*Echinochloa Crusgalli*) CULTIVADO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO**

Tabela 1 – Características fotossintéticas para diferentes concentrações de cádmio em folhas de *Echinochloa crusgalli*.....51

Tabela 2 – Modificações foliares de plantas de *Echinochloa crusgalli* cultivado em solução com diferentes concentrações de Cd.....54

Tabela 3 – Características anatômicas da raiz na zona pilífera para plantas de *Echinochloa crusgalli* cultivadas em diferentes concentrações de cádmio. .56

## LISTA DE FIGURAS

### 2. REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1– Aparato para obtenção das imagens. ....16
- Figura 2 - Imagem de ponta de raiz com as regiões selecionadas para análise. Região 1= Centro quiescente; Região 2= Região de divisão e expansão; Região 3= Região parcialmente diferenciada. ....18

### ARTIGO 1- ATIVIDADE BIOLÓGICA DE RAÍZES COM CÁDMIO EVIDENCIADO PELO SPECKLE LASER DINÂMICO

- Figura 1 – Aparato para obtenção das imagens. ....26
- Figura 2- Imagem de ponta de raiz de *E. crusgalli* com as regiões selecionadas para análise. Região 1= Centro quiescente; Região 2= Região de divisão e expansão; Região 3= Região parcialmente diferenciada. ....28
- Figura 3- Matriz de ocorrência (MOC) da ponta da raiz de *E. crusgalli* cultivadas em solução com Cd. A = 0 mg L<sup>-1</sup>, B= 0,5 mg L<sup>-1</sup>. ....32
- Figura 4 – Imagens do método de Desvio Padrão (A e C) mostrando atividade biológica real em comparação com a morfologia das raízes (B e D) na presença de Cd. A e B= 0 mg L<sup>-1</sup>; C e D= 8 mg L<sup>-1</sup> .....34
- Figura 5 - Fotomicrografias longitudinais da ponta da raiz de *E. crusgalli* em solução com Cd. A= 0, B= 0,01 C= 0,1 D= 0,5 E= 1 F= 2 G= 4 H= 8 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Barra= 50 µm. ....35
- Figura 6 – Plantas de *Echinochloa crusgalli* cultivadas em solução nutritiva com a presença de Cd em diferentes concentrações. ....36

### ARTIGO 2 - MODIFICAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE FOLHA E RAIZ DE CAPIM-ARROZ (*Echinochloa Crusgalli*) CULTIVADO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO

- Figura 1- Plantas de *Echinochloa crusgalli* cultivadas em solução nutritiva com a presença de Cd em diferentes concentrações. A- controle; 0,01; 0,1 mg L<sup>-1</sup>. B- controle; 1; 2; 4 mg L<sup>-1</sup>. C- controle e 8 mg L<sup>-1</sup> .....51

Figura 2– Secção transversal de folha de <i>Echinochloa crusgalli</i> . A- Nervura central. B- Limbo foliar. AD=Epiderme da face adaxial AB=Epiderme da face abaxial. ....	52
Figura 3 – Secções transversais de raízes de <i>E. crusgalli</i> sob concentrações de Cd em solução nutritiva, detalhando endoderme. A- 0,0; B- 8 mg L <sup>-1</sup> . Barra: 50 µm. EN= Endoderme; CX= Córtex. ....	55
Figura 4 - Secções transversais de raízes de <i>E. crusgalli</i> sob concentrações de Cd em solução nutritiva. Cx= Córtex, Aer= Aerênquima. A- Controle. B- 0,1 mg L <sup>-1</sup> C- 4 mg L <sup>-1</sup> .....	57

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	2
2.1. Fitorremediação .....	2
2.1.1. Classificação de fitorremediação .....	4
2.2. O Cádmio (Cd).....	6
2.3. Contaminação de ambientes aquáticos .....	7
2.4. Uso de gramíneas na fitorremediação.....	8
2.4.1. <i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) P. Beauv.....	8
2.5. <i>Biospeckle</i> .....	10
3 OBJETIVO .....	11
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4 METODOLOGIA GERAL.....	12
4.1. Análises morfo-anatômicas.....	14
4.2. Análise de trocas gasosas.....	15
4.3. <i>Biospeckle</i> .....	15
4.4. Análise estatística .....	18
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	18
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
SEGUNDA PARTE.....	20
<b>ARTIGO 1- ATIVIDADE BIOLÓGICA DE RAÍZES COM CÁDMIO EVIDENCIADA PELO <i>SPECKLE</i> LASER DINÂMICO .....</b>	<b>20</b>

1	INTRODUÇÃO .....	23
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	25
1.1.	Cultivo das plantas.....	25
1.2.	<i>Biospeckle</i> da raiz .....	25
1.3.	Anatomia da Raiz.....	28
1.4.	Análise Estatística.....	29
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
3.1.	Laser .....	29
3.2.	Anatomia da Raiz.....	33
4	CONCLUSÃO .....	37
	<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	38
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38
	<b>ARTIGO 2 - MODIFICAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE FOLHA E RAIZ DE CAPIM-ARROZ (<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) P. Beauv.) CULTIVADO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO</b> .....	43
1	INTRODUÇÃO .....	46
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	47
2.1.	Cultivo das plantas.....	47
2.2.	IRGA.....	48
2.3.	Anatomia de folhas e raízes .....	48
2.4.	Análise Estatística.....	50
3	RESULTADOS .....	50
4	DISCUSSÃO .....	57

5	CONCLUSÃO.....	62
	<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

Com o crescimento da população mundial, crescem também os resíduos humanos, agrícolas e industriais gerados para atender às necessidades e à demanda dessa população. Assim, todos os anos, vultosos recursos financeiros e muito tempo são dispendidos com a despoluição do solo e da água em todo o mundo.

Uma das consequências desse processo é a contaminação dos ecossistemas por metais poluentes como mercúrio, chumbo, cádmio, arsênio, por exemplo, ocasionando graves problemas ambientais. Entre os metais poluentes, o cádmio é considerado um dos mais agressivos à natureza. Apesar de sua toxicidade para quase toda a biota, a sua natureza não-degradável e a sua mobilidade química, o cádmio pode passar através das cadeias alimentares e causar várias doenças aos seres vivos, incluindo os seres humanos.

Em ecossistemas aquáticos contaminados, a recuperação pode ser realizada por processos químicos, físicos e/ou biológicos. Dentre os processos biológicos, a fitotecnologia ou o uso de plantas para recuperação desses ecossistemas aquáticos tem se destacado. A fitotecnologia tem crescido no mundo inteiro, com bons resultados para remediação de áreas contaminadas com metais pesados.

A capacidade que algumas plantas têm de sobreviver e predominar em ambientes ricos em metais pesados, onde a grande maioria das plantas não sobreviveria, oferece um sistema modelo no qual se pode detectar o maior número possível de mecanismos que contribuem para a sua tolerância (GUIMARÃES et al., 2008).

Identificar espécies com potencial de remediação em ambiente aquático e seus mecanismos de tolerância é essencial para o desenvolvimento de estratégias de fitorremediação. No entanto, a pesquisa é dispendiosa, com a utilização de aparelhos, reagentes, análises, além do tempo necessário para se identificar esse potencial.

Como estratégia inovadora, uma das propostas desta tese foi a de testar o *biospeckle* laser dinâmico em raízes que cresceram em meio contaminado com cádmio para, em seguida, identificar os mecanismos de tolerância que essas plantas desenvolveram através de sua anatomia vegetal. Comparando os dados do *biospeckle* laser à anatomia das plantas, foi possível propor um protocolo, eliminando, assim, várias etapas laboratoriais rotineiras e onerosas, além de favorecer uma identificação das espécies que crescem em meio contaminado com metal pesado, direcionando o estudo com mais eficiência.

A espécie *Echinochloa crusgalli* tem sido identificada como tolerante a metais como Cu e As (EZAKI et al., 2008; SULTANA; KOBAYASHI, 2011). No entanto, são escassos os relatos acerca de suas características de plasticidade anatômica e fisiológica. A constatação deste fato ressalta a importância de seu estudo a fim de que suas estratégias de tolerância ao Cd sejam mais bem entendidas.

Sendo assim, o presente trabalho avaliou os efeitos de diferentes concentrações de Cd sobre características anatômicas e fisiológicas de plantas de *Echinochloa crusgalli*, assim como a atividade biológica nas pontas de suas raízes, utilizando o *biospeckle* laser dinâmico, com o objetivo de detectar aspectos de plasticidade anatômica e fisiológica relacionados à tolerância da espécie ao Cd.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1.Fitorremediação**

Quando a presença de seres vivos é a principal responsável pela remediação, o processo é denominado biorremediação. Nos casos em que as plantas representam o principal mecanismo da biorremediação ou são essenciais para desencadear o processo, denomina-se remediação natural pela vegetação ou fitorremediação (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2007).

De acordo com Sharma, Singh e Manchanda (2014), a literatura disponível revela que esta técnica é uma forma eficaz, econômica, versátil e ecológica de limpeza do ambiente, sendo uma alternativa para a descontaminação de ambientes poluídos (GRATÃO et al., 2005). A fitorremediação pode ser vista como uma tecnologia socialmente justa, ecologicamente aceitável, economicamente desejável e completamente sustentável (LOPES, 2010).

A real origem da fitorremediação e a sua aplicação são controversas. É provável que a prática tenha se desenvolvido em períodos diferenciados nas várias partes do mundo. Muitos autores afirmam que sua aplicação teve início através da observação de melhorias ambientais naturalmente decorrentes da presença de plantas em locais contaminados, o que demonstrou o potencial de sua utilização para esse fim. Entretanto, o uso do termo *phytoremediation* ainda é muito recente (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2007).

A fitorremediação pode ser usada para limpar metais, pesticidas, solventes, explosivos, petróleo bruto, hidrocarbonetos poliaromáticos e lixiviados dos aterros (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, OFFICE OF SOLID WASTE AND EMERGENCY RESPONSE, 1998).

É uma técnica eficaz em termos de custos e não requer equipamentos dispendiosos, além de não ser necessário um cuidado especial no crescimento das plantas nos locais contaminados. Esta técnica de reparação requer, no entanto, um longo período para a remoção dos contaminantes,

diferentemente do que ocorre com os métodos químicos de remoção. Além disso, a fitomassa contaminada ainda é um problema. Mas, mesmo assim, é uma boa opção de remediação por ser ecologicamente viável e de baixo custo (SHARMA; SINGH; MANCHANDA, 2014).

Sabendo que a resposta apresentada pelas espécies é muito variável quando submetidas a ambientes contaminados por metais pesados, torna-se necessário testar o comportamento de cada espécie frente à contaminação, bem como entender, por exemplo, a fisiologia, a bioquímica e a absorção das plantas empregadas (GONZAGA; SANTOS; MA, 2006).

### **2.1.1. Classificação de fitorremediação**

Existem diversas maneiras de se fazer a fitorremediação e, em função disso, ela também pode ser classificada em relação à forma como os metais pesados são absorvidos pelas plantas. Entre as principais formas de fitorremediação estão a fitoextração, a fitoestabilização e a rizofiltração.

A fitoextração envolve a absorção dos contaminantes pelas raízes e seu transporte e acúmulo ocorrem na parte aérea (LOPES, 2010; GRATÃO et al., 2005). É uma tecnologia relativamente nova e muito dependente de certas plantas e fatores do solo como adequação para o crescimento de plantas, profundidade da contaminação e a urgência da remediação (GONZAGA; SANTOS; MA, 2006; TACK; MEERS, 2010). Consiste na absorção e acumulação de metais pesados na parte aérea de plantas hiperacumuladoras que crescem no solo. De acordo com Ucer, Uyanik e Kutbay (2013), as plantas hiperacumuladoras têm capacidade para acumular/tolerar concentrações > 100 mg kg de Cd nas folhas e acumulam mais metais na parte aérea do que nas raízes. Resultados apresentados por Fawzy et al. (2012) indicam que o Cd pode ser acumulado em todas as partes (folhas, rizoma e raízes) das plantas estudadas. Comparadas às plantas que não são hiperacumuladoras, as plantas hiperacumuladoras toleram alto teor

de Cd através das adaptações diferenciais contra o estresse oxidativo induzido por Cd conforme descrito por Tian et al. (2012). As plantas que crescem no meio contaminado são colhidas e incineradas ou destinadas à reciclagem de metais pesados. Quando as plantas são incineradas, as cinzas devem ser eliminadas em um aterro de resíduos perigosos e o volume de cinzas será menor do que 10% do volume original (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998).

Na fitoestabilização, os contaminantes orgânicos e inorgânicos são incorporados ao húmus do solo de forma insolúvel (GRATÃO et al., 2005; TACK; MEERS, 2010). Os microrganismos imobilizam os poluentes, liberando substâncias quelantes tais como os ácidos orgânicos que formam complexos com os metais. A fitoestabilização reduz o risco dos contaminantes irem para a cadeia trófica, através do uso de compostos que induzem a formação de espécies químicas insolúveis, sendo estas consideradas menos susceptíveis a lixiviação e menos interativas do ponto de vista biológico. Silva, Siqueira e Soares (2006) observaram que fungos micorrízicos arbusculares favorecem o crescimento de *Brachiaria decumbens* e, como consequência, aumentam a extração de metais do solo.

A rizofiltração é semelhante à fitoextração, mas pode ser definida como a utilização de raízes de plantas para absorver, acumular e/ou precipitar os metais nocivos ou poluentes a partir de soluções aquosas (SHARMA; SINGH; MANCHANDA, 2014). A rizofiltração está associada ao tratamento de águas residuais. As macrófitas (submersas e flutuantes) têm um potencial imenso de remediação para purificar os recursos hídricos (SHARMA; SINGH; MANCHANDA, 2014; OLIVEIRA, 2013; PEREIRA et al., 2014). De acordo com USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998), girassóis foram usados com sucesso para remover os contaminantes radioativos da água da lagoa de teste de Chernobyl, na Ucrânia.

## 2.2. O Cádmiu (Cd)

Atividades humanas como mineração, operações de fundição e muitas outras indústrias, como usinas termelétricas e indústrias de baterias contribuem majoritariamente para a pesada contaminação por elementos-traço, de acordo com Sharma, Singh e Manchanda (2014). Além disso, mesmo uma contaminação leve por metais pesados na água potável pode levar a potenciais riscos à saúde humana no longo prazo.

O conhecimento de certos elementos-traço para o crescimento e desenvolvimento de plantas vem do século passado. De acordo com Kabata-Pendias e Mukherjee (2007), o termo "elementos-traço" nunca foi definido com precisão. Esse termo tem sido usado em geoquímica, com elementos químicos que ocorrem na crosta terrestre em quantidades menores que 0,1% e também em ciências biológicas, com elementos em concentrações semelhantes. Portanto, alguns dos elementos que são um "traço" em materiais biológicos não são um "traço" no solo (por exemplo, o ferro). O termo "elementos-traço" está relacionado a sua abundância e inclui elementos de várias propriedades químicas: metais e metaloides. O teor médio de Cd é dado para a crosta da Terra como  $0,1-0,2 \text{ mg kg}^{-1}$

O cádmio é considerado um dos metais mais ecotóxicos, com efeitos adversos sobre todos os processos biológicos de seres humanos, animais e plantas. A partir de 1940, o aumento do uso das baterias de níquel e cádmio contribuiu para um aumento significativo da contaminação ambiental por Cd. Outros usos industriais do Cd, como a fabricação de pigmentos, reagentes para a fabricação de plásticos, atividades de mineração de cobre, níquel e zinco. A produção de fertilizantes e a queima de combustíveis fósseis também contribuíram para esta contaminação antrópica. A utilização de resíduos de tratamentos de esgotos para a adubação também contribui para esta contaminação (GUIMARÃES et al., 2008). O Cd está no grupo dos elementos-traço que se fixam em grandes moléculas, onde se armazenam ,

sendo transportado para parte aérea ou influenciando funções ainda desconhecidas (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

O Cd é um metal que possui número atômico 112,4 e, de acordo com Clemens (2001), está associado à poluição ambiental e à toxicidade dos seres vivos. Em grandes quantidades, é considerado um poluente tóxico de preocupação ambiental e ocupacional devido à diversidade de seus efeitos tóxicos. Tem meia vida biológica prolongada (cerca de 20-30 anos, nos seres humanos), baixa taxa de excreção pelo organismo e armazenamento predominantemente em tecidos moles (principalmente, fígado e rins) (RANI et al., 2014).

É considerado um elemento não essencial para os processos metabólicos, sendo eficientemente absorvido pelas raízes e folhas das plantas. O efeito mais significativo ao excesso desse metal é o dano no aparato fotossintético que envolve uma série de alterações biológicas (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

### **2.3. Contaminação de ambientes aquáticos**

A contaminação de ambientes aquáticos por elementos tóxicos tem sido considerada um sério problema ambiental (LOPES, 2010; GONZAGA; SANTOS; MA, 2006), pois além de inviabilizar o uso de recursos hídricos, aumenta o risco da entrada destes elementos bioacumulativos na cadeia trófica (OLIVEIRA et al., 2006). Águas residuais não tratadas podem causar sérios problemas ambientais já que metais pesados e outros compostos tóxicos podem causar intoxicação e bioacumulação em seres vivos (BEASCOECHEA, 2005).

De acordo com a resolução n° 357/05, alterada pela resolução 410/09 e pela 430/11, há um valor máximo permitido para parâmetros inorgânicos, como o cádmio. O valor máximo permitido (VMP) total para lançamento em corpos d'água doce, na classe 1, é de 0,001 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Na

classe 2, aplicam-se as mesmas condições e padrões da classe 1 e, para a classe 3, o valor máximo permitido é de 0,01 mg L<sup>-1</sup> de Cd (BRASIL, 2005).

Já a resolução nº 430/2011 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes afirma que o valor máximo para lançamentos de efluentes é de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de Cd (BRASIL, 2011).

#### **2.4. Uso de gramíneas na fitorremediação**

As gramíneas geralmente apresentam elevada diversidade, facilidade de semeadura, rápido crescimento e estabelecimento, garantem a cobertura e proteção do solo e, por isso, destacam-se como plantas com potencial para a revegetação de áreas contaminadas por metais pesados (SILVA; SIQUEIRA; SOARES, 2006). De acordo com Fawzy et al. (2012), *Echinochloa pyramidalis* está entre as plantas que poderiam ser utilizadas em programas de biomonitoramento devido ao seu potencial fitorremediador. Silva, Siqueira e Soares (2006) observaram que fungos micorrízicos arbusculares favorecem o crescimento de *Brachiaria decumbens* e, como consequência, aumentam a extração de metais do solo. Trabalhando com efeito de diferentes níveis de contaminação de metais no solo com *Brachiaria decumbens*, Gomes et al. (2011) observaram diversas variações anatômicas e fisiológicas nessas plantas e que o metal pesado absorvido se acumula principalmente nas raízes.

##### **2.4.1. *Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv**

Plantas do gênero *Echinochloa* são anuais, herbáceas, eretas, com 20–120 cm de altura, possuindo colmos densamente perfilhados, folha com bainha glabra e lígula ausente, o que é um caráter marcante do gênero.

Existem três espécies de *Echinochloa* comuns em várzeas e margens de cursos d'água (LEITÃO FILHO; BACCHI; ARANHA, 1972).

*Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv. Ess. Agrost., também conhecida popularmente como capim-arroz, capim-da-colônia e Capim-jaú é uma planta anual, herbácea, ereta, com 50–80 cm de altura. Possui colmo verde-claro, bastante perfilhado, formando touceiras. Folha com bainha esverdeada, estriada, glabra, bordos serreados e eventualmente com pigmentação de antocianina. O capim-arroz (*Echinochloa* spp.) é uma planta com metabolismo C<sub>4</sub>, necessitando de alta intensidade de luz devido, principalmente, ao custo da fixação das moléculas de CO<sub>2</sub> (CONCENÇO et al., 2008; PERRY; GALATOWITSCH, 2004).

*Echinochloa crusgalli* é uma espécie daninha a diversas culturas de áreas baixas, ou de áreas irrigadas, principalmente em cultivos de arroz. Ocorre em várzeas, margens de cursos d'água e lugares úmidos, onde é invasora problemática em função de sua capacidade reprodutiva (LEITÃO FILHO; BACCHI; ARANHA, 1972). Devido às semelhanças morfofisiológicas, à vasta distribuição em lavouras e aos altos níveis de infestação que possui, o controle é feito com uso de herbicidas (CONCENÇO et al., 2008). A reprodução é feita por sementes, com ciclo de 100 a 120 dias. Sultana e Kobayashi (2011) observaram que *Echinochloa crusgalli*, quando cultivado em solo com diferentes concentrações de arsênio, apresentou maior biomassa, quando comparado ao arroz. Os autores sugerem ainda a *Echinochloa crusgalli* como planta potencial para remediação de arsênio em solos contaminados, mas destacam que pouco se sabe sobre a *Echinochloa crusgalli* em relação à fitorremediação. Poucos são os trabalhos que relatam a capacidade do *Echinochloa crusgalli* na fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por cádmio. Sendo assim, não se conhecem os mecanismos anatômicos e fisiológicos que garantem o seu potencial de sobrevivência, podendo essa espécie ser utilizada na fitorremediação.

## 2.5. *Biospeckle*

Quando uma superfície opticamente rugosa é iluminada com luz de elevado grau de coerência, tal como a de um laser, a luz difusa apresenta uma distribuição de intensidade especial, fazendo a superfície parecer ser coberta com uma estrutura granular fina, chamada *speckle* (GAGGIOLI; POMARICO, 2009). O fenômeno do *speckle*, que muda ao longo do tempo, está relacionado à mudança de grandezas físicas na amostra iluminada com uma luz coerente. A mudança ocorrida no material iluminado pode ser causada por uma variação do índice de refração, a posição física, dispersão, etc. Quando aplicado em amostras biológicas é denominado *biospeckle*. O aspecto visual da imagem é um salpico semelhante ao de um líquido em ebulição (TRIVI, 2009). Desde a invenção do laser nos primeiros anos da década de 60, tem havido um interesse renovado pelo *speckle* e muitas aplicações têm sido propostas (ARIZAGA, 2009). Na Botânica Aplicada, por exemplo, as imagens do *biospeckle* laser podem significar um novo sistema para obtenção de informações dos tecidos vegetais, pois, na maioria das vezes, são aplicadas técnicas que demandam muito tempo, com alto custo de aparelhagem e reagentes para estudar a estrutura e funcionamento das plantas.

De acordo com Arizaga (2009), a análise dinâmica dos padrões de *speckle* de materiais ativos apresenta o desafio de correlacionar essa informação ao fenômeno a ser monitorado. A atividade biológica expressa na dinâmica do padrão do *speckle* não apresenta uma definição clara de qual fenômeno está sendo analisado, porém pode ser entendida como uma série de processos ocorridos no tecido em análise, como o desenvolvimento e processos de divisão celular, movimentação de organelas, fluxo de citoplasmas ou reações bioquímicas, ou seja, a atividade biológica é o resultado de movimentos moleculares e de estruturas (BRAGA et al., 2009). A técnica do *biospeckle* foi aplicada para vários fenômenos biológicos para, por exemplo, identificar a taxa de deformação de raízes (RATHNAYAKE et

al., 2008), detectar fungos em sementes de feijão (BRAGA; RABELO; GRANATO, 2005) e para quantificar a atividade *biospeckle* de raízes de *Zea Mays*, *Jatropha curcas* e *Citrus limonia* crescidas em cultura de tecidos (BRAGA et al., 2009a; RIBEIRO et al., 2014).

Na maioria dos casos, a luz do laser passa através das camadas superficiais e entra na amostra. É importante manter a profundidade atingida pela iluminação constante para todas as amostras, assim filtros podem ser usados para controlar a intensidade da iluminação. Além disso, durante os experimentos usando *biospeckle*, podem ocorrer ruídos (alguns ruídos não podem ser evitados). Existem múltiplas fontes de ruídos como a temperatura, as variações de umidade, entre outros (BRAGA et al., 2009a).

Embora a natureza biológica do sinal *biospeckle* não esteja diretamente correlacionada, a técnica pode ser usada para triagem de grandes populações de plantas de forma não destrutiva, para avaliação do desenvolvimento ou respostas aos parâmetros ambientais. O equipamento é relativamente barato e portátil, a análise pode ser automatizada e a técnica proporciona um ensaio rápido e funcional (RIBEIRO et al., 2014).

### 3 OBJETIVO

Os objetivos dessa tese são:

- Identificar o potencial de *Echinochloa crusgalli* para remediação de ambientes aquáticos contaminados com cádmio.
- Conhecer a eficiência do uso do *biospeckle* laser relacionado à análise da atividade biológica na morfologia da ponta da raiz de *Echinochloa crusgalli* cultivada em diferentes concentrações de cádmio.

- Identificar as modificações na estrutura e funcionalidade de *Echinochloa crusgalli* na presença de cádmio em solução nutritiva.

### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Verificar a estrutura anatômica de raízes e folhas de *Echinochloa crusgalli* a fim de determinar as variações nas dimensões anatômicas e na frequência de estômatos, visando mostrar a plasticidade anatômica de acordo com os níveis de contaminação a que estão submetidas.
- Verificar a atividade biológica das raízes com o auxílio de *speckle* laser dinâmico, na presença do cádmio.
- Observar o potencial do *Echinochloa crusgalli* como fitorremediadora ou bioindicadora em ambientes aquáticos contaminados com cádmio.

## 4 METODOLOGIA GERAL

Amostras de sementes de *Echinochloa crusgalli* foram obtidas no Instituto Rio-grandense de Arroz e levadas para a casa de vegetação no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA para produção de mudas. A implantação e condução do experimento ocorreram em casa-de-vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras-UFLA.

As sementes foram submetidas a um teste de germinação, sendo distribuídas em bandejas contendo vermiculita umedecida. A germinação ocorreu após o 5º dia e, após  $\pm 20$  dias, foi possível obter as mudas. Mudas

com cerca de 8 cm foram selecionadas e transferidas para bandejas contendo 3l da solução nutritiva para adaptação por 7 dias. Utilizou-se solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) n<sup>o</sup>2, modificada, com 40% da força iônica, em água destilada, contendo os seguintes sais:  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Fe EDTA.

Após o período de adaptação, as plantas foram submetidas a concentrações crescentes de Cd na forma de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Os valores das concentrações de Cd utilizadas nos diferentes tratamentos foram sete: 0,01; 0,1; 0,5; 1; 2; 4; 8  $\text{mg L}^{-1}$  de Cd e o tratamento controle, representando a ausência de Cd (0  $\text{mg L}^{-1}$  de Cd) na solução nutritiva.

Os valores das concentrações de Cd utilizadas para os diferentes tratamentos foram obtidos com base nos padrões de qualidade de água encontrados na resolução 357/05, alterada pela resolução 410/09 e pela 430/11 (BRASIL, 2005) e também de acordo com Oliveira (2013) e Silva, Siqueira e Soares (2006).

As plantas foram submetidas aos tratamentos por um período de 15 dias para que pudessem se desenvolver sob o estresse causado pelo Cd e, assim, apresentar modificações causadas por seu efeito sobre as plantas de *Echinochloa crusgalli*. Foram utilizadas bandejas de 3l e a solução nutritiva foi trocada semanalmente. Ao fim desse período, foram realizadas as análises e a avaliação morfológica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por oito tratamentos com quatro repetições. Cada parcela experimental foi composta por 10 plantas. Para as análises anatômicas, utilizou-se uma planta por repetição. O restante foi levado para a realização de análises químicas para a determinação do teor e acúmulo do metal.

Todo resíduo gerado durante o experimento foi encaminhado para o Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos do Programa de Gerenciamento de Produtos Químicos da UFLA para tratamento e/ou destinação adequada.

#### 4.1. Análises morfo-anatômicas

Após 15 dias de exposição, as raízes e a terceira folha completamente expandida das plantas foram utilizadas para a caracterização anatômica. Ambas foram fixadas em formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70% (F.A.A.<sub>70%</sub>) por um período de 72 horas e posteriormente conservadas em etanol 70° G.L. (JENSEN, 1962).

Amostras da região pilífera das raízes, assim como o seu ápice, foram emblocadas em historresina Leica<sup>®</sup>, seguindo metodologia proposta por O'brien, Feder; Mccully (1964). Foram realizadas secções transversais na zona pilífera das raízes, bem como secções longitudinais no ápice radicular, com o auxílio do micrótomo rotatório. Após a realização das secções, estas foram coradas com azul de toluidina 0,5%, seguindo os métodos descritos por Kraus e Arduin (1997).

Para a parte aérea, secções transversais foram obtidas na região mediana de folhas com o auxílio do micrótomo manual. As mesmas foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e submetidas ao processo de coloração com a mistura de Azul de Astra-safranina, seguindo os métodos descritos por Kraus e Arduin (1997). Também foram realizados moldes da superfície adaxial e abaxial das folhas, com o uso de adesivo da marca Super Bonder<sup>®</sup> na região mediana da folha.

Com o material devidamente corado, foram confeccionadas lâminas semipermanentes em gelatina glicerinada que, em seguida, foram vedadas com resina de nitrocelulose incolor.

Para o estudo da anatomia quantitativa, foram feitas fotomicrografias com o auxílio de uma câmera digital Olympus U-TV1X-2, acoplada ao microscópio Olympus CX41 e com o auxílio do software Carl Zeiss Vision AxioVision Viewer 4.8. Posteriormente, utilizou-se o software ImageJ 1.45s para análise das imagens, nas quais foram contabilizadas três secções por

lâmina, tendo sido montada uma lâmina para cada uma das repetições experimentais e três medições por secção.

#### **4.2. Análise de trocas gasosas**

Para os parâmetros fisiológicos, utilizou-se o analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA), modelo LI-6400. Para isso, em cada parcela, utilizou-se a terceira folha completamente expandida. A área da folha analisada pela câmara do IRGA foi corrigida mediante a sua medição, uma a uma, com o auxílio de uma régua, visto que as folhas não preenchem toda a câmara, necessitando assim da correção. Foram obtidos resultados em relação à fotossíntese ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a condutância ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

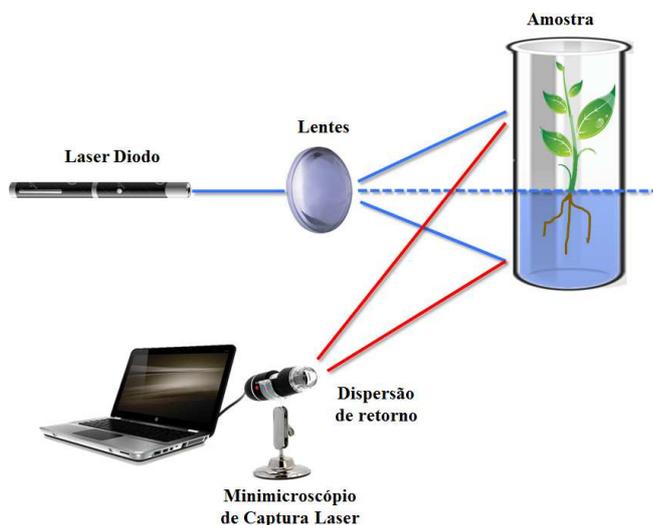
#### **4.3. Biospeckle**

Uma planta de *Echinochloa crusgalli* de cada repetição foi colocada em tubo de ensaio contendo 150 ml de meio de cultivo simples, à base de Ágar-Ágar. Para evitar sobreposição, as raízes foram cortadas, restando apenas duas raízes para serem iluminadas com o laser. Foram selecionadas raízes que cresceram na solução contaminada com cádmio e que tinham entre 1 e 8 cm. A parte aérea foi mantida durante todo o processo.

A preparação das amostras foi feita no laboratório de Anatomia Vegetal no Departamento de Biologia da UFLA, sendo a sua leitura conduzida no laboratório do Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada à Agropecuária (CEDIA) no Departamento de Engenharia da UFLA.

Foram utilizado um laser de diodo de 632 nm, uma lente de dispersão do feixe e um sistema de aquisição digital de imagem, composto de uma câmara CCD (*charged coupled device*) montada em um minimicroscópio com ajuste

de imagem; microcomputador, processador de imagens Scilab. A Figura 2 apresenta o esquema básico de iluminação com todo o aparato necessário para a obtenção das imagens.



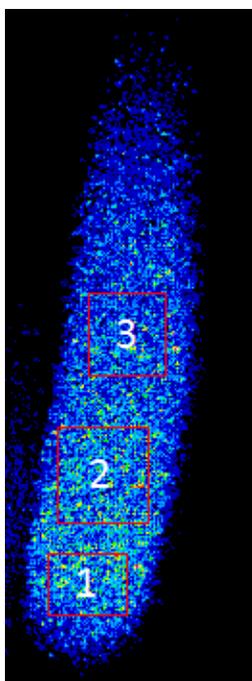
**Figura 1**– Aparato para obtenção das imagens.

As imagens dos padrões de *speckle* foram capturadas a uma taxa de 10 segundos, totalizando 150 imagens por raiz, mas apenas 128 foram utilizadas, eliminando, assim, as primeiras e as últimas imagens. As imagens passaram por um conjunto de testes para identificar a melhor área e técnica de análise da atividade biológica. Foram realizados os testes de qualidade de saturação, contraste e homogeneidade (MOREIRA, 2013). O teste de saturação consiste em mostrar os pixels que atingiram o limite máximo de luminosidade, o que pode causar perda de informação; os de contraste identificam se o *speckle* possui atividade acima da capacidade de captura da câmera, pois isso também pode gerar perda de informação nessa área. Quando a área possui alto contraste, ela possui baixa atividade e quando possui baixo contraste, ela possui alta atividade que pode estar acima da capacidade de captura da câmera (MOREIRA, 2013). O teste de homogeneidade calcula quão homogênea é uma área da imagem do *speckle* dinâmico em relação às áreas vizinhas. Para isso, utiliza-se o valor do desvio

padrão da atividade biológica das janelas de uma vizinhança (CARDOSO; BRAGA; RABAL, 2012).

Uma análise foi realizada em seguida usando o método do desvio padrão (SD). O SD é um método que apresenta uma comparação entre as imagens do conjunto, selecionando cada pixel da imagem e comparando-os a seus correspondentes no conjunto. Os valores utilizados são baseados na escala dos tons de cinza. Como resultado, obtém-se uma nova imagem em bits com a distribuição da atividade biológica (NOTHDURFT; YAO, 2005; WESTRUP; MCEVOY, 2013).

Os pontos da imagem foram escolhidos aleatoriamente dentro de três regiões de interesse (ROI), de acordo com a Figura 2. A técnica *Absolute Value of Difference* (AVD) (BRAGA et al., 2011) foi utilizada nas análises numéricas provenientes das histórias temporais do *speckle* dinâmico, associado à normalização dos dados, de acordo com Cardoso, Braga e Rabal (2012).



**Figura 2** - Imagem de ponta de raiz com as regiões selecionadas para análise.  
Região 1= Centro quiescente; Região 2= Região de divisão e expansão;  
Região 3= Região parcialmente diferenciada.

Após esse procedimento, as raízes e a parte aérea foram lavadas em água corrente e encaminhadas para obtenção de matéria seca.

#### **4.4. Análise estatística**

As análises estatísticas foram feitas no software SISVAR (FERREIRA, 2011). As variáveis obtidas foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro Wilk. Os dados foram transformados quando não seguiam uma distribuição normal. Em seguida, foram feitas as análises de variância. A fim de verificar a diferença entre os tratamentos para as características, foi realizada a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott a 5%.

## **5 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O método do biospeckle foi eficiente para evidenciar a atividade biológica de raízes de *E. crusgalli* podendo concluir que altas concentrações de cádmio reduzem a atividade biológica da raiz. Esse método torna o processo de identificação do potencial dessa planta para fitorremediação mais rápido e menos oneroso, mas necessita de testes em mais espécies vegetais.

Não foi observado mortalidade das plantas no tempo do experimento e concentrações de Cd testadas, sugerindo que esta espécie é tolerante a este metal, embora o seu crescimento e desenvolvimento seja afetado nas concentrações elevadas de Cd.

Portanto, é possível afirmar que o crescimento e desenvolvimento de capim arroz nas concentrações crescentes de Cd, a partir da concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> são afetados negativamente. Os dados de fotossíntese, condutância e transpiração corroboram com essa afirmação, no entanto, a maioria das modificações favoráveis observadas nas características anatômicas visa compensar as modificações anatômicas negativas causadas pela toxicidade do metal nesta espécie.

A espécie tem características anatômicas que contribuem para a sua sobrevivência em ambiente aquático contaminado com cádmio e tem potencial para ser utilizada em programas de fitorremediação, até a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de Cd. A partir de 1 mg L<sup>-1</sup> de Cd, a mesma é mais apropriada para a utilização na bioindicação da contaminação por Cd, devido as sintomas ocasionados pelo metal .

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for cadmium**. Atlanta: Department of Health and Human Services, 2007. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=15>>. Acesso em: 04 dez. 2012.

ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. **Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental**. São Paulo: Oficina de Textos, 2007.

ARIZAGA, R. Methods of dynamic speckle analysis statistical analysis. In: RABAL, H. J.; BRAGA, R. A. **Dynamic laser speckle and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2009. Cap. 4, p. 95-114.

BEASCOECHEA, E. M. Las águas residuales normativas. In: GONZALEZ, J. F. (Coord.). **Manual de fitodepuración. Filtros de macrófitas em flotación**. Madrid: [s.n], 2005. Cap. 1, p. 13-30.

BRAGA, R. A. et al. Applications in biological samples. In: RABAL, H. J.; BRAGA JÚNIOR, R. A. **Dynamic laser speckle and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2009a. Cap. 8, p. 181-231.

BRAGA, R. A. et al. Evaluation of activity through dynamic laser speckle using the absolute value of the differences. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 646-650, Jan. 2011.

BRAGA, R. A. et al. Live *biospeckle* laser imaging of root tissues. **European Biophysics Journal**, New York, v. 38, n. 5, p. 679–686, June 2009.

BRAGA, R. A.; RABELO, G. F.; GRANATO, L. R. Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique. **Biosystems Engineering**, London, v. 91, n. 4, p. 465–469, Aug. 2005.

BRASIL. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 53, 18 mar. 2005. p. 58-63.

BRASIL. Resolução nº 430/2011, 16 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 92, 16 maio 2011. p. 89.

CARDOSO, R. R.; BRAGA, R. A.; RABAL, H. J. Alternative protocols on dynamic speckle laser analysis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SPECKLE METROLOGY, 5., 2012, Vigo. **Proceedings...** Vigo: [s.l.], 2012. v. 8413, p. 1-6. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84880069973&partnerID=40&md5=a342e51d6fae86293b376d4f35ab65f6>>. Acesso em: 10 set. 2012.

CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, Berlin, v. 212, n. 4, p. 475-486, Mar. 2001.

CONCENÇO, G. et al. Competitiveness of *Echinochloa* biotypes resistant and susceptible to quinclorac. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 195-202, jan./mar. 2008.

EZAKI, N. et al. Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 5, p. 951–961, May 2008.

FAWZY, M. A. et al. Heavy metal biomonitoring and phytoremediation potentialities of aquatic macrophytes in River Nile. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 184, n. 3, p. 1753–1771, Mar. 2012.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./dez. 2011.
- GAGGIOLI, N. G.; POMARICO, J. A. The speckle phenomenon. In: RABAL, H. J.; BRAGA JÚNIOR, R. A. **Dynamic laser speckle and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2009. Cap. 1, p. 01-18.
- GOMES, M. P. et al. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 566-573, set./out. 2011.
- GONZAGA, M. I. S.; SANTOS, J. A. G.; MA, L. Q. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 90-101, jan./fev. 2006.
- GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 53-64, Jan./Mar. 2005.
- GUIMARÃES, M. A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Viçosa, v. 3, n. 1, p. 58-65, 2008.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water**: culture method for growing plants without soil. Califórnia: Califórnnia Agricultural Experimental Station, 1950.
- JENSEN, W. **Botanical histochemistry**: principle and practice. San Francisco: W. H. Freeman, 1962.
- KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer, 2007.
- KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997.
- LEBLANC, J.-C. et al. **Etude de l'alimentation totale française**: mycotoxines, minéraux et éléments traces. Paris: Inra, 2004.
- LEITÃO FILHO, H. F.; BACCHI, O.; ARANHA, C. Família gramineae. In: BACCHI, O. et al. **Plantas invasoras de culturas**: volume 1. São Paulo: HUCITEC, 1972. p. 28-42.
- LOPES, D. Plantas nativas do cerrado: uma alternativa para fitorremediação. **Estudos**, Goiânia, v. 37, n. 3-4, p. 419-437, mar./abr. 2010.

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

MOREIRA, J. **Desenvolvimento de uma ferramenta computacional de livre acesso para o processamento de imagens do speckle laser dinâmico**. 2013. 153 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

NOTHDURFT, R.; YAO, G. Imaging obscured subsurface inhomogeneity using laser speckle. **Optics Express**, Washington, v. 13, n. 25, p. 10034-10039, Dec. 2005.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cellular wall by toluidine blue. **Protoplasma**, New York, v. 59, n. 1, p. 368-373, July 1964.

OLIVEIRA, C. **Mecanismos anatômicos, citológicos e fisiológicos de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Robert) para a recuperação de ambientes aquáticos contaminados por cádmio e chumbo**. 2013. 219 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

OLIVEIRA, D. M. et al. **Fitorremediação: o estado da arte**. Rio de Janeiro: CETEM, 2006.

PEREIRA, F. J et al. Lead tolerance of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart. – (Pontederiaceae) as defined by anatomical and physiological traits. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1423-1433, Sept. 2014.

PERRY, L. G.; GALATOWITSCH, S. M. The influence of light availability on competition between *Phalaris arundinacea* and a native wetland sedge. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 170, n. 1, p. 73-81, Jan. 2004.

RANI, A. et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. **International Journal of Environmental Health Research**, London, v. 24, n. 4, p.378–399, Aug. 2014.

RATHNAYAKE, A. P. et al. Novel optical interference technique to measure minute root elongations of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Seibold & Zucc.) seedlings infected with ectomycorrhizal fungi. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford v. 64, n. 3, p. 314–321, Dec. 2008.

RIBEIRO, K. M. et al. Continuous, high-resolution *biospeckle* imaging reveals a discrete zone of activity at the root apex that responds to contact with obstacles. **Annals of Botany**, Oxford, v. 113, n. 3, p. 555–563, Feb. 2014.

SHARMA, S.; SINGH, B.; MANCHANDA, V. K. Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, Oct. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25277712>>. Acesso em: 13 nov. 2014.

SILVA, S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Mycorrhizal fungi influence on brachiariagrass growth and heavy metal extraction in a contaminated soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p.1749-1757, dez. 2006.

SULTANA, R.; KOBAYASHI, K. Potential of barnyard grass to remediate arsenic-contaminated soil. **Weed Biology and Management**. New York, v. 11, n. 1, p. 12-17, Mar. 2011.

TACK, F. M. G.; MEERS, E. Assisted phytoextraction: helping plants to help us. **Elements**, Denver, v. 6, n. 6, p. 383–388, 2010.

TIAN, S. K. et al. Root adaptations to cadmium-induced oxidative stress contribute to Cd tolerance in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 56, n. 2, p. 344-350, June 2012.

TRIVI, M. Dynamic speckle: origin and features. In: RABAL, H. J.; BRAGA, R. A. (Ed.). **Dynamic laser speckle and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 21-52.

UCER, A.; UYANIK, A.; KUTBAY, H. G. Removal of heavy metals using *Myriophyllum verticillatum* (whorl-leaf water milfoil) in a hydroponic system. **Ekoloji**, Ondokuz Mayıs, v. 22, n. 87, p. 01–09, May 2013.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, OFFICE OF SOLID WASTE AND EMERGENCY RESPONSE. **A citizen's guide to bioremediation**. London: EPA, 1998. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oswer/greenercleanups/principles.html>>. Acesso em: 17 out. 2014.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3051 A**: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. Washington: USEPA, 1998.

WESTRUP, U.; MCEVOY, F. J. Speckle tracking echocardiography in mature Irish Wolfhound dogs: technical feasibility, measurement error and reference intervals. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 55, n. 1, p. 41, May 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680023>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

**SEGUNDA PARTE**

**ARTIGO 1- ATIVIDADE BIOLÓGICA DE RAÍZES COM CÁDMIO  
EVIDENCIADA PELO *SPECKLE* LASER DINÂMICO**

## RESUMO

Diversas espécies de gramíneas têm sido identificadas como promissoras para fitorremediação do cádmio e conhecer a capacidade que algumas plantas têm de sobreviver e predominar em ambientes ricos em metais pesados é essencial para o desenvolvimento de estratégias de fitorremediação. Porém, na maioria das vezes, para estudar a estrutura e o funcionamento das plantas, são aplicadas técnicas custosas e que demandam tempo. As análises das imagens do *biospeckle* laser representam uma nova técnica para a obtenção de informações sobre tecidos vegetais. Esse estudo objetivou conhecer a atividade biológica evidenciada pelo *biospeckle* laser, associada à morfologia da ponta da raiz de capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*), cultivado em solução com cádmio. As plantas foram mantidas por 15 dias em casa de vegetação, em solução nutritiva. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 8 tratamentos e 4 repetições, 10 plantas por repetição e 2 repetições por bandeja. As concentrações utilizadas nos tratamentos foram: tratamento controle (0); 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg L<sup>-1</sup> de cádmio. As raízes de *Echinochloa crusgalli* de cada repetição foram colocadas em tubo de ensaio contendo 150 ml de meio de cultivo simples à base de Ágar-Ágar. Foram capturadas 128 imagens dos padrões de “*speckle*” por raiz. Em seguida, as amostras de raízes foram emblocadas em historresina Leica® e secções longitudinais foram realizadas com micrótomo rotativo semiautomático até a região mediana da raiz. A técnica do *biospeckle* foi eficiente para evidenciar a atividade biológica de raízes de *E. crusgalli*, tendo sido possível concluir que altas concentrações de cádmio reduzem a atividade biológica da raiz de *Echinochloa crusgalli*. Essa técnica torna o processo de identificação do potencial dessa planta para fitorremediação mais rápido e menos oneroso, comparada a outras técnicas. No entanto, esta técnica necessita ser confirmada através de testes em um número maior de espécies.

Palavra-chave: *Biospeckle*. *Echinochloa crusgalli*. Metal pesado, Fitotecnologia. Raiz

## ABSTRACT

### **BIOLOGICAL ACTIVITY OF ROOTS WITH CADMIUM SHOWN BY DYNAMIC SPECKLE**

Several grass species have been identified as promising for phytoremediation of cadmium and know the capacity that some plants have to survive and prevail in environments rich in heavy metals is essential for the development of phytoremediation strategies. However, in most cases, in order to study the structure of plants, costly and time consuming techniques are applied. Analyses of the laser biospeckle images represent a new technique to obtain information on plant tissue. This study investigated the biological activity evidenced by laser biospeckle associated with the morphology of the tip of barnyard grass root (*Echinochloa crusgalli*), grown in solution containing cadmium. The plants were kept for 15 days in a greenhouse, in a nutrient solution. The experimental design was completely randomized with 8 treatments and 4 replications, 10 plants per repetition and 2 repetitions per tray. The concentrations used in the treatments were control (0); 0.01; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 mg L<sup>-1</sup> of cadmium. The roots of *Echinochloa crusgalli* from each replicate were placed in a test tube containing 150 ml of culture medium based on simple agar and 128 images of speckle patterns by root were captured. Then, the samples were embedded in the root historesin Leica® type and longitudinal sections were made with semi-automatic microtome until the middle region of the root. The biospeckle technique was efficient to show the biological activity of *E. crusgalli* roots. It was possible to conclude that high concentrations of cadmium reduce the biological activity of *Echinochloa crusgalli* root. The biospeckle technique was efficient to show the biological activity of *E. crusgalli* roots. It was possible to conclude that high concentrations of cadmium reduce the biological activity of *Echinochloa crusgalli* root. This technique makes the process of identifying the potential of this plant faster and less costly for phytoremediation, compared to other techniques. However, this technique needs to be confirmed by testing a larger number of species.

Keyword: *Biospeckle. Echinochloa crusgalli. Heavy metal. Phytotechnology. Root.*

## 1 INTRODUÇÃO

Os elementos-traço estão presentes em águas naturais e suas origens estão associadas a cada processo natural ou atividade antrópica. A fonte antropogênica dos elementos-traço na água é associada, principalmente, à mineração e às águas residuais domésticas. A poluição das águas por elementos-traço é um fator importante tanto no ciclo geoquímico desses elementos quanto na saúde ambiental (KABATA-PEDIAS; MUKHERJEE, 2007).

Os elementos-traço mais perigosos na água, são o arsênio, o bário, o cromo, o chumbo, o mercúrio e o cádmio. A contaminação da água pode ocorrer por disposição e derrame proposital ou acidental de resíduos. Na estação chuvosa, o rompimento de lagoas de contenção de efluentes industriais ou rejeitos de mineração muitas vezes transporta metais pesados para o corpo dos rios e eles entram na cadeia alimentar, além de contaminar diretamente a água, limitando seus usos (CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO, 2013).

O cádmio é um metal pesado de alta toxicidade presente no meio ambiente, mas tem sido mais distribuído por vias antropogênicas. Este metal tem origem antropogênica a partir do refino do zinco, cobre e chumbo sendo muito utilizado em galvanoplastia, plásticos, pigmentos e baterias (GUIMARÃES et al., 2008). Sabe-se que ele não apresenta ação benéfica a nenhum sistema vivo, produzindo efeitos tóxicos agudos e crônicos nos organismos expostos. Em humanos, os órgãos/sistemas mais atingidos são o fígado, rins, pulmões e ossos (MARQUES; AGUIAR; SILVA, 2011).

Conhecer a capacidade que algumas plantas apresentam de sobreviver e predominar em ambientes ricos em metais pesados, onde a grande maioria das plantas não sobreviveria, é essencial para o

desenvolvimento de estratégias de fitorremediação (GUIMARÃES et al., 2008).

As gramíneas geralmente apresentam elevada diversidade, facilidade de semeadura, rápido crescimento e estabelecimento e, por isso, destacam-se como potenciais para utilização em áreas contaminadas por metais pesados (SILVA; SIQUEIRA; SOARES, 2006). Diversas espécies de gramíneas têm sido identificadas como promissoras para fitorremediação do cádmio: *Oriza sativa* (FUJIMAKI et al., 2010; PEREIRA et al., 2011); *Brachiaria decumbens* (SILVA; SIQUEIRA; SOARES, 2006); *Zea mays* (NOCITO et al., 2002) e *Echinochloa crusgalli* para fitorremediação de arsênio (SULTANA; KOBAYASHI, 2011).

Para estudar a estrutura e funcionamento das plantas são aplicadas na maioria das vezes técnicas laboriosas, demoradas e que demandam alto custo de aparelhos e reagentes. Braga et al. (2009) utilizaram o *biospeckle* laser para permitir a aquisição de sinais a partir de raízes desenvolvidas em géis. *Speckle* é um fenômeno óptico que ocorre quando um material rugoso é iluminado por um laser (RABAL; BRAGA, 2009). E o *speckle* se torna dinâmico quando os dispersores de luz presentes no material iluminado mudam sua posição ao longo do tempo. A análise desse fenômeno dinâmico é conhecida como *speckle* laser dinâmico, ou *biospeckle* laser (BRAGA et al., 2011). As análises das imagens do *biospeckle* podem ser uma nova forma para obtenção de informações dos tecidos vegetais. A técnica do *biospeckle laser* foi aplicada para vários fenômenos biológicos como a taxa de deformação da raiz (RATHNAYAKE et al., 2008), detecção de fungos em sementes de feijão (BRAGA; RABELO; GRANATO, 2005) e quantificar atividade *biospeckle* de raízes crescidas em cultura de tecidos de *Zea Mays*, *Jatropha curcas*, *Citrus limonia* (BRAGA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2014). A relação dos fenômenos histológicos, químicos e físicos que resultam no fenômeno do *biospeckle* ainda é um desafio. Alguns trabalhos relacionam o fenômeno aos processos biológicos, incluindo a maturação do

tecido, a divisão celular, o movimento de organelas, a corrente citoplasmática e as reações bioquímicas (BRAGA et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi o de conhecer a atividade biológica, evidenciada pelo *biospeckle* laser, associada à morfologia externa e interna da ponta da raiz do capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*) cultivado em solução com cádmio.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1. Cultivo das plantas

As mudas de *Echinochloa crusgalli* Biotipo 26 (Capim-Arroz) foram produzidas a partir de sementes colocadas em bandejas plásticas, contendo substrato vermiculita. As sementes foram fornecidas pelo Instituto Rio-grandense do Arroz/RS. Após 30 dias, as mudas foram colocadas em solução completa de Hoagland e Arnon (1950) n°2, diluída a 40% de sua força iônica, em bandejas com capacidade 3 l, fixadas por meio de uma placa de isopor de 30 cm de diâmetro e 4,0 cm de espessura. A solução nutritiva foi trocada a cada 7 dias. No intervalo de renovação das soluções, o volume das bandejas foi completado com água deionizada sempre que necessário. O experimento foi mantido por 15 dias em casa de vegetação com tela de sombreamento 50%. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 8 tratamentos em 4 repetições, sendo 10 plantas por repetição e 2 repetições por bandeja. Os referidos tratamentos consistiram das concentrações 0; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg L<sup>-1</sup> de cádmio.

### 1.2. *Biospeckle* da raiz

Uma muda de *Echinochloa crusgalli* de cada repetição foi colocada em tubo de ensaio contendo 150 ml de meio de cultivo simples à base de Ágar-Ágar. Para evitar a sobreposição no tubo de ensaio, as raízes foram cortadas deixando apenas duas raízes para serem iluminadas com o laser. Foram selecionadas aquelas raízes que cresceram na solução contaminada com cádmio e que apresentavam entre 1 e 8 cm de comprimento. A parte aérea foi mantida durante todo o processo de leitura.

Foram utilizados: um laser de diodo de 632 nm, uma lente de dispersão do feixe, um sistema de aquisição digital de imagem composto de uma câmara CCD (*charged coupled device*), montada em um minimicroscópio com ajuste de foco e um microcomputador, com processador de imagens Scilab. A figura 1 apresenta o esquema básico de iluminação com todo o aparato necessário para a obtenção das imagens.

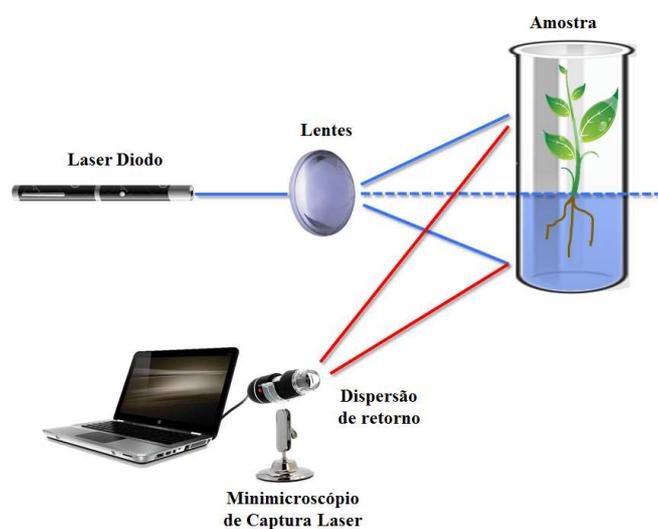


Figura 1 – Aparato para obtenção das imagens.

As imagens dos padrões de “*speckle*” foram capturadas a uma taxa de 10 segundos, totalizando 128 imagens por raiz, as quais passaram por um conjunto de testes para identificar a melhor área e o método mais adequado

para análise da atividade biológica. Foram realizados os testes de qualidade de saturação, contraste e homogeneidade (MOREIRA, 2013). Os testes de saturação consistem em mostrar os pixels que atingiram o limite máximo de luminosidade, o que pode causar perda de informação. Os testes de contraste identificam se o *speckle* possui atividade acima da capacidade de captura da câmera, pois isso também pode gerar perda de informação nessa área. Quando a área possui alto contraste, ela possui baixa atividade e quando possui baixo contraste; possui alta atividade, o que também pode estar acima da capacidade de captura da câmera (MOREIRA, 2013). Os testes de homogeneidade calculam quão homogênea é a área da imagem do *speckle* dinâmico em relação às áreas vizinhas. Para isso, utiliza-se o valor do desvio padrão da atividade biológica das janelas de uma vizinhança (CARDOSO; BRAGA; RABAL, 2012). Em seguida, realizou-se uma análise usando o método do desvio padrão (SD). O SD é um método que apresenta uma comparação entre as imagens do conjunto, selecionando cada pixel da imagem e comparando-a com seus correspondentes no conjunto por meio do desvio padrão. Os valores utilizados são baseados na escala dos tons de cinzas. Como resultado, obtém-se uma nova imagem, em bits, com a distribuição da atividade biológica (NOTHDURFT; YAO, 2005; WESTRUP; MCEVOY, 2013).

Os pontos da imagem foram escolhidos aleatoriamente dentro de três regiões de interesse (ROI), de acordo com a Figura 2. As análises numéricas das histórias temporais do *speckle* dinâmico foram realizadas através da técnica *Absolute Value of Difference (AVD)* (BRAGA et al., 2011) associada à normalização dos dados de acordo com Cardoso, Braga e Rabal (2012).

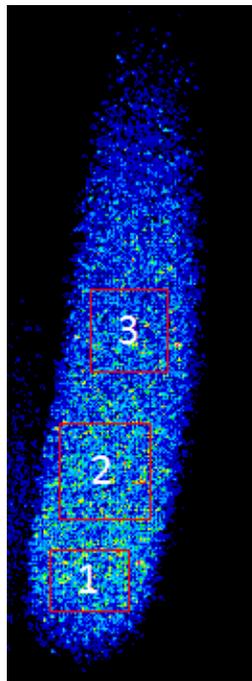


Figura 2- Imagem de ponta de raiz de *E. crusgalli* com as regiões selecionadas para análise. Região 1= Centro quiescente; Região 2= Região de divisão e expansão; Região 3= Região parcialmente diferenciada.

Após esse procedimento, as raízes foram usadas para a obtenção das secções longitudinais.

### 1.3. Anatomia da Raiz

As raízes foram coletadas e fixadas em FAA (Formaldeído, Ácido acético e Álcool 70%) e, posteriormente, conservadas em álcool 70%. As amostras de raízes foram emblocadas em historresina Leica® e secções longitudinais foram realizadas com micrótomo rotativo semiautomático até a região mediana da raiz. Em seguida, as secções foram submetidas ao processo de coloração com a mistura de azul de toluidina 0,5 %, seguindo os métodos descritos por Kraus e Arduin (1997). Para cada tratamento, foram utilizadas 4 repetições com as secções longitudinais.

#### **1.4. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011). Os dois fatores estudados Concentração de Cd e Região na ponta da raiz foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk ( $p > 0,05$ ). A análise de variância foi feita com interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ) pelo teste F e, os resultados significativos foram submetidos ao teste de Scott-Knott.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Laser**

Comparado às técnicas convencionais de anatomia vegetal e citogenética empregadas para obter informações prévias semelhantes, o esquema básico de iluminação para a obtenção das imagens (Figura 1) permitiu a obtenção de resultados satisfatórios em menos tempo e com menos recursos.

Os resultados confirmaram que a região 2 (Região de divisão e expansão) (Figura 2) tem maior atividade quando comparada às regiões 1 (Centro quiescente) e 3 (Região parcialmente diferenciada), de acordo com o valor de  $p$  ( $p < 0,0068$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Médias da atividade biológica em cada região na ponta da raiz de *E. crusgalli*.

<b>Região da raiz</b>	<b>Médias</b>
<b>Região 3</b>	1,3956 b
<b>Região 2</b>	1,6415 a
<b>Região 1</b>	1,4025 b
<i>CV</i>	6,98*

\* Dados transformados. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente.

Na região 2, encontram-se células em divisão e expansão, o que explica a maior atividade biológica. O centro quiescente (Região 1) possui células iniciais que são relativamente inativas e apresentam poucas divisões celulares. Já a região 3 possui tecidos parcialmente diferenciados. Conforme descrito por Esaú (1974), à medida que se distancia do centro quiescente, as células cessam as divisões e aumentam de tamanho, desenvolvendo características específicas, ou seja, se diferenciam. Ribeiro et al. (2014) encontraram diferenças de atividade ao longo de raízes de *jatropha*, de milho e de citros. Esses autores observaram que a atividade *biospeckle* é criada por fenômenos biológicos, como ficou demonstrado quando compararam raízes vivas e mortas e obtiveram diferenças significativas.

A atividade biológica em todas as concentrações foi menor quando comparada à atividade biológica na concentração inicial e no tratamento controle (Tabela 2). Observou-se um aumento da atividade biológica na concentração inicial de Cd (0,01 mg L<sup>-1</sup>), ocorrendo uma redução significativa a partir da concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Um aumento na atividade foi observada na concentração 2 mg L<sup>-1</sup> de Cd, seguido de uma nova queda na concentração 4 mg L<sup>-1</sup> de Cd (Tabela 2).

**Tabela 2.** Atividade biológica da ponta da raiz de *E. crusgalli*

<b>[Cd]</b> <b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Atividade biológica</b>
<b>0</b>	1,97 b
<b>0,01</b>	2,2766 a
<b>0,1</b>	1,1650 e
<b>0,5</b>	1,4041 d
<b>2,0</b>	1,7408 c
<b>4,0</b>	0,5666 f
<b>8,0</b>	0,7066 f
<i>CV</i>	6,21*

\*Dados transformados. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente.

A divisão celular pode estar relacionada à variação na atividade biológica das raízes de plantas cultivadas com Cd. De acordo com Ribeiro et al. (2014), pelo menos um componente do *biospeckle* resulta de um processo biológico e que este processo está localizado na zona da divisão celular. Assim, a diminuição na atividade observada na Tabela 2 pode ser atribuída à fitotoxicidade do Cd, conforme descrito por Silva et al. (2013). Estes autores demonstraram claramente que altas concentrações de Cd tiveram efeitos tóxicos sobre a divisão celular de raízes em *P. stratiotes*.

Os gráficos de Matriz de ocorrência (MOC) (Figura 3) corroboram essa afirmação. Pode-se notar que, quanto maior a dispersão fora da diagonal principal, maior será a atividade da raiz. À medida que a concentração de Cd aumenta, há uma redução na dispersão fora da diagonal principal.

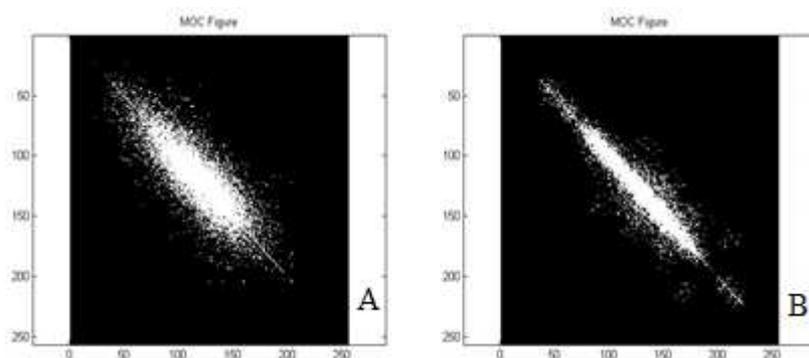


Figura 3- Matriz de ocorrência (MOC) da ponta da raiz de *E. crusgalli* cultivadas em solução com Cd. A = 0 mg L<sup>-1</sup>, B= 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

O Cd interrompe processos de sinalização fisiológicos e também pode amplificar a resposta celular a outros efeitos tóxicos desse metal, como o dano direto de enzimas e transportadores, oxidação de tióis ou aumento de níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO).

De acordo com Tian et al. (2012), as pontas das raízes são zonas muito ativas de metabolismo e são extremamente sensíveis ao estresse biótico ou abiótico representando, portanto, um tecido ideal para examinar os mecanismos de tolerância e respostas iniciais para Cd, como foi proposto no presente trabalho.

Teixeira (2014) observou que, cultivado em água com diferentes concentrações de lama de polimento de rochas ornamentais com altos teores de elementos-traço, *A. cepa* apresentou redução no tamanho e na quantidade de raízes produzidas e no índice mitótico. Por meio do índice mitótico é possível avaliar o potencial de uma determinada substância de inibir ou aumentar a proliferação celular, pois ele reflete a frequência de divisão celular (ADAM; EL-ASHRY, 2010).

Em *C. zizanioides*, Oliveira (2013) observou que, a partir da concentração de 6,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd, o conteúdo de DNA foi reduzido, demonstrando haver perdas do DNA como efeito da exposição ao metal. Essas perdas podem ter ocorrido até em concentrações menores de Cd em *C. zizanioides*, pois, de acordo com a Tabela 2, com 4 mg L<sup>-1</sup> de Cd há uma

queda drástica da atividade biológica das raízes. Também foi observada uma redução no índice mitótico a partir da concentração de  $6,4 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd, devido à presença de núcleos apoptóticos (OLIVEIRA, 2013).

Silva et al. (2013) observaram que em termos de normalidade do ciclo mitótico, o Cd aumentou significativamente o número de irregularidades em metáfases de *P. stratiotes* submetidas a  $12,8 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd. Outras alterações também foram encontradas, embora em frequências mais baixas, como C-metáfases, cromossomos sem orientação, anáfases multipolares, pontes e também fragmentos. Em *P. vittata*, Balestri et al. (2014) observaram que o Cd induz uma mudança no tamanho do meristema apical de raiz, tornando-o progressivamente mais curto com o aumento da concentração e que este resultado, provavelmente, é influenciado pela atividade mitótica.

O aumento da atividade biológica das raízes cultivadas na concentração inicial ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ) pode ter sido um efeito de adaptação das células à presença do metal em baixa concentração. Na maioria dos casos, o Cd ignora os receptores da superfície celular, afetando a função celular, a transcrição de genes e a regulação e isso pode resultar em morte celular e/ou adaptação induzida pelo estresse e sobrevivência, conforme descrito por Gallego et al. (2012). Oliveira (2013) observou um aumento significativo no índice mitótico na concentração  $1,6$  a  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd em *C. zizanioides*, representado pelo estímulo da proliferação celular induzida pelo metal, mesmo com uma maior incidência de anormalidades como prófase com cromossomos perdidos, metáfase com cromossomos não orientados. Resultados semelhantes foram encontrados por Zou et al. (2012) em *A. cepa*

### 3.2. Anatomia da Raiz

Observa-se uma diminuição do tamanho e espessura das raízes com o aumento da concentração de Cd na solução (Figuras 5 e 6) confirmando os dados evidenciados por meio do *biospeckle* laser (Tabela 2).

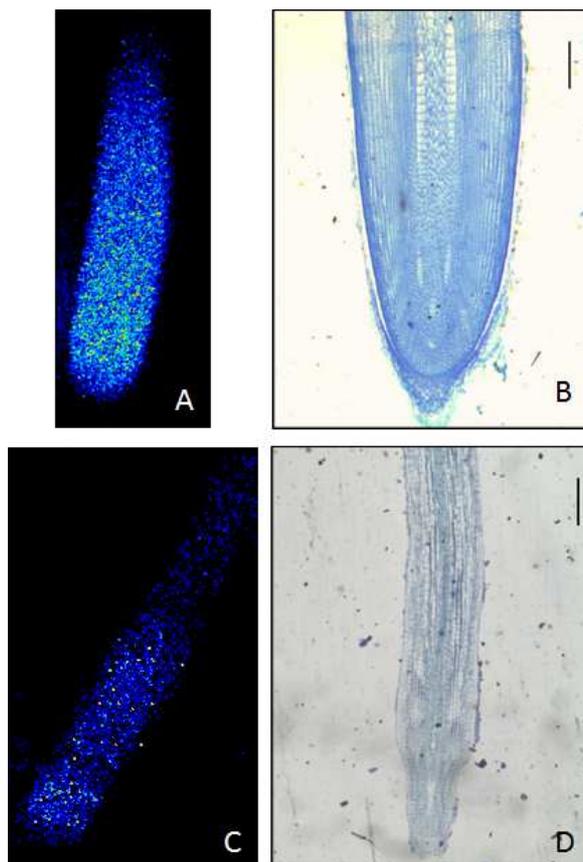


Figura 4 – Imagens do método de Desvio Padrão (A e C) mostrando atividade biológica real em comparação com a morfologia das raízes (B e D) na presença de Cd. A e B= 0 mg L<sup>-1</sup>; C e D= 8 mg L<sup>-1</sup>

A maior intensidade de pixels nas imagens do SD indica maior atividade biológica naquela região.

Nota-se uma redução na espessura da raiz de *Echinochloa crusgalli* (Figura 6). Observam-se, também, raízes com uma leve torção em relação ao eixo principal a partir da concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> e o afinamento da ponta a

partir de 2 mg L<sup>-1</sup>. Esse efeito pode ser interpretado como uma resposta adaptativa para proteger as plantas da toxicidade do Cd, de acordo com Lux et al. (2011). Os mesmos autores observaram que os ápices de raízes de milho cultivado em ágar com 0 de Cd de um lado e 100 µM de Cd do outro sofreram uma torção para a camada de ágar contendo Cd, com posterior paralisação no crescimento. Essa torção foi causada pela interrupção do alongamento das células no lado da raiz exposta ao Cd, sendo que, do outro lado, o alongamento das células continuou.

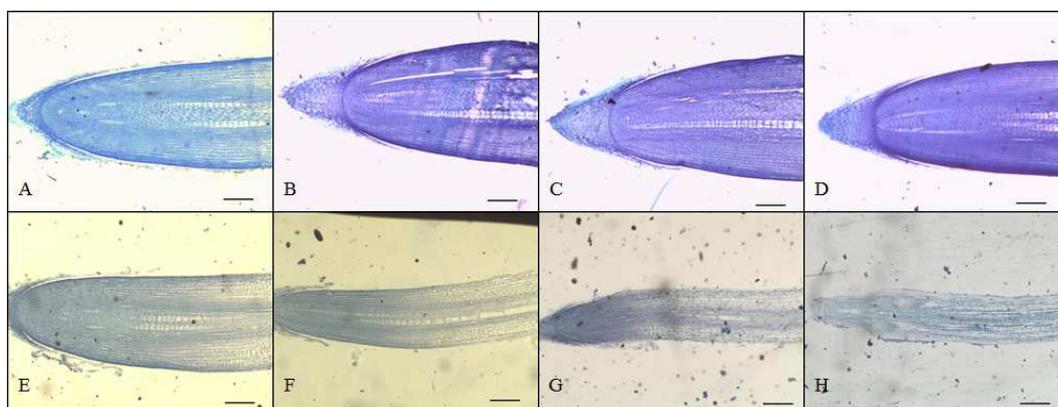


Figura 5 - Fotomicrografias longitudinais da ponta da raiz de *E. crusgalli* em solução com Cd. A= 0, B= 0,01 C= 0,1 D= 0,5 E= 1 F= 2 G= 4 H= 8 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Barra= 50 µm.

Uma distorção grave de pontas de raiz foi observada em raízes de *Sedum alfredii*, variedade que não é hiperacumuladora, crescendo em 25 e 100 µM Cd, conforme observado por Tian et al. (2012). Estas concentrações são equivalentes a 2,85 e 11,26 mg L<sup>-1</sup> de Cd, portanto similares e superiores às concentrações utilizadas no presente trabalho, respectivamente.

Observando a morfologia externa das plantas de *E. crusgalli* na presença de Cd, foi possível perceber o aumento das deformações ocorridas no sistema radicular, com o aumento da concentração de Cd em solução (Figura 5), demonstrando o efeito tóxico do metal ao capim- arroz, por meio

de sintomas visuais causados por este elemento. Alterações morfofisiológicas em todo o corpo da planta podem estar relacionadas diretamente às modificações na estrutura radicular, decorrentes de respostas a contaminantes ambientais, haja vista que as raízes constituem a via primária de absorção de água e nutrientes (DEGENHARDT; GIMMLER, 2000).

Plantas cultivadas em solução controle e  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd apresentaram maior desenvolvimento de raízes quando comparadas às plantas cultivadas nas demais concentrações (Figura 6A). Esse resultado demonstra a tolerância dessas plantas em baixas concentrações de Cd. Ezaki et al. (2008) também observaram que, de acordo com o comprimento relativo das raízes, *Echinochloa crusgalli* apresentou tolerância ao Cd e ao Cu, quando testados em concentrações abaixo de  $0,1 \text{ mM}$ .

Carvalho et al. (2013) observaram que *Gomphrena elegans* submetida a  $5 \text{ }\mu\text{M}$  de Cd não foi tolerante a essa concentração e apresentou redução na elongação das raízes após 3 e 6 dias de exposição ao metal. O mesmo foi observado para *E. crusgalli*, mas ainda com atividade biológica de raízes reduzida, esta espécie foi capaz de sobreviver durante 15 dias em concentração semelhante.



Figura 6 – Plantas de *Echinochloa crusgalli* cultivadas em solução nutritiva com a presença de Cd em diferentes concentrações.

Adam e El-Ashry (2010) citam que o crescimento de raízes está estritamente relacionado com o índice mitótico do meristema apical radicular, uma vez que a produção de novas células é de responsabilidade dessa região meristemática. Pereira et al. (2013) observaram um decréscimo do índice mitótico inversamente proporcional à concentração de Pb, demonstrando que o aumento da concentração do metal implica a inibição da divisão celular da região meristemática das raízes de alface. Uma parte da inibição do crescimento radicular na presença de Pb nas plântulas de alface advém da restrição dessas divisões celulares, conforme descrito por Pereira et al. (2013). Sacks, Silk e Burman (1997) observaram uma diminuição na divisão celular em raízes de milho sob estresse hídrico e concluíram que os efeitos da variação ambiental influenciam nos padrões de taxa de divisão celular e no tamanho da célula. Todos esses resultados confirmam o que foi observado no presente trabalho, isto é, a redução no crescimento radicular e na atividade biológica estão relacionados ao índice mitótico e à divisão celular. Qin, Jiang e Liu (2013) afirmam que 50  $\mu$ M de Cd podem afetar as proteínas do nucléolo de plantas de *Vicia faba* L., inibindo assim o crescimento radicular.

Na presença de Cd, os danos causados aos meristemas são provenientes do desencadeamento do processo de morte celular programada. Isso ocorreu devido aos sintomas de genotoxicidade, tornando necessária a eliminação de células meristemáticas afetadas pelo Cd, de acordo com Oliveira (2013). O mesmo ocorreu em *C. zizanoides*, na presença de Cd.

Portanto, a severa inibição do crescimento radicular nas maiores concentrações de Cd, a diminuição do tamanho das raízes, seguida por sua deformação; a redução da espessura e a baixa atividade biológica podem ser explicadas por esta restrição das divisões celulares em virtude do baixo índice mitótico.

#### 4 CONCLUSÃO

A técnica do *biospeckle* laser pode ser utilizada no processo de identificação do potencial das plantas para fitorremediação de forma rápida e menos onerosa. A atividade biológica observada pelo *biospeckle* laser dinâmico na ponta das raízes é maior na região de divisão e expansão em *E. Crusgalli*.

Em altas concentrações de cádmio, a técnica do *biospeckle* laser foi eficiente para evidenciar a atividade biológica de raízes, sendo possível concluir que concentrações acima de 4 mg L<sup>-1</sup> de cádmio reduzem a atividade biológica da raiz de *Echinochloa crusgalli*.

As concentrações maiores que 1 mg L<sup>-1</sup> de Cd interferiram na morfologia externa das raízes das plantas utilizadas, contribuindo para a diminuição do sistema radicular nas plantas estudadas.

#### AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, ao CNPq, ao Instituto Rio-grandense do Arroz, ao CEDIA/DEG

#### REFERÊNCIAS

ADAM, F. I. M.; EL-ASHRY, Z. M. Evaluation of genotoxicity of 4-n-nonylphenol using *Vicia faba* L. **Journal of Biological Science**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 368-372, June 2010.

BALAESTRİ, M. et al. Cadmium uptake, localization and stress-induced morphogenic response in the fern *Pteris vittata*. **Planta**, Berlin, v. 239, n. 5, p. 1055-1064, May 2014.

BRAGA, R. A. et al. Evaluation of activity through dynamic laser speckle using the absolute value of the differences. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 646-650, Jan. 2011.

BRAGA, R. A. et al. Live *biospeckle* laser imaging of root tissues. **European Biophysics Journal**, New York, v. 38, n. 5, p. 679–686, June 2009.

BRAGA, R. A.; RABELO, G. F.; GRANATO, L. R. Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique. **Biosystems Engineering**, London, v. 91, n. 4, p. 465–469, Aug. 2005.

CARDOSO, R. R.; BRAGA, R. A.; RABAL, H. J. Alternative protocols on dynamic speckle laser analysis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SPECKLE METROLOGY, 5., 2012, Vigo. **Proceedings...** Vigo: [s.l.], 2012. v. 8413, p. 1-6. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84880069973&partnerID=40&md5=a342e51d6fae86293b376d4f35ab65f6>>. Acesso em: 10 set. 2012.

CARVALHO, M. T. V. et al. *Gomphrena claussenii*, the first South-American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 180-190, June 2013.

CARVALHO, P. H. A. et al. Motility parameters assessment of bovine frozen semen by biospeckle laser (BSL) system. **Biosystems Engineering**, London, v. 102, p. 31–35, 2009.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: Editora da UFLA, 2009.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO. Água: desafios da sociedade. In: PRÊMIO JOVEM CIENTISTA, 27., 2013, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Fundação Roberto Marinho, 2013.

DEGENHARDT, B.; GIMMLER, H. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 344, p. 595-603, Mar. 2000.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1974.

EZAKI, N. et al. Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 5, p. 951–961, May 2008.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./dez. 2011.
- FUJIMAKI, S. et al. Tracing cadmium from culture to spikelet: noninvasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport, and accumulation of cadmium in an intact rice plant. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, n. 4, p. 1796–1806, Apr. 2010.
- GALLEGO, S. M. et al. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 83, p. 33–46, Nov. 2012.
- GUIMARÃES, M. A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Viçosa, v. 3, n. 1, p. 58-65, 2008.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: The College of Agriculture University of California, 1950.
- KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer, 2007.
- KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997.
- LUX, A. et al. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 21–37, Sept. 2011.
- MARQUES, M.; AGUIAR, C. R. C.; SILVA, J. J. L. S. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 1-11, jan./fev. 2011.
- MOREIRA, J. **Desenvolvimento de uma ferramenta computacional de livre acesso para o processamento de imagens do speckle laser dinâmico**. 2013. 153 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- NOCITO, F. F. et al. Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, n. 4, p. 1872-1879, Aug. 2002.
- NOTHDURFT, R.; YAO, G. Imaging obscured subsurface inhomogeneity using laser speckle. **Optics Express**, Washington, v. 13, n. 25, p. 10034-10039, Dec. 2005.

OLIVEIRA, C. **Mecanismos anatômicos, citológicos e fisiológicos de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Robert) para a recuperação de ambientes aquáticos contaminados por cádmio e chumbo.** 2013. 219 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

PEREIRA, B. F. F. et al. Cadmium availability and accumulation by lettuce and rice. **Revista Brasileira Ciencia do Solo**, Viçosa, v.35, n. 2, p. 645-654, mar./abr. 2011 .

PEREIRA, M. P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Agro@ambiente On-line**, Roraima, v. 7, n. 1, p. 36-43, abr. 2013.

QIN, R.; JIANG, W.; LIU, D. Cadmium can induce alterations in the cellular localization and expression of three major nucleolar proteins in root tip cells of *Vicia faba* L. **Plant Soil**, London, v. 368, n. 1-2, p. 365–373, July 2013.

RABAL, H. J.; BRAGA, R. A. **Dynamic laser speckle and applications.** New York: CRC Press, 2009.

RABELO, G. F. et al. Laser speckle techniques applied to study quality of fruits. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 4, p. 570–575, out./dez. 2005.

RATHNAYAKE, A. P. et al. Novel optical interference technique to measure minute root elongations of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Seibold & Zucc.) seedlings infected with ectomycorrhizal fungi. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford v. 64, n. 3, p. 314–321, Dec. 2008.

RIBEIRO, K. M. et al. Continuous, high-resolution biospeckle imaging reveals a discrete zone of activity at the root apex that responds to contact with obstacles. **Annals of Botany**, Oxford, v. 113, n. 3, p. 555–563, Feb. 2014.

SACKS, M. M.; SILK, W. K.; BURMAN, P. Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 114, n. 2, p. 519–527, June 1997.

SILVA, S. A. et al. Reproductive, cellular, and anatomical alterations in pistia stratiotes l. plants exposed to cadmium. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 224, p. 1465, Feb. 2013.

SILVA, S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Mycorrhizal fungi influence on brachiariagrass growth and heavy metal extraction in a

contaminated soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p.1749-1757, dez. 2006.

SULTANA, R.; KOBAYASHI, K. Potential of barnyard grass to remediate arsenic-contaminated soil. **Weed Biology and Management**, Elmsford, v. 11, n. 1, p. 12–17, Mar. 2011.

TEIXEIRA, M. B. **Avaliação da genotoxicidade e das alterações anatômicas provocadas pelo resíduo do beneficiamento de rochas ornamentais em *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae)**. 2014. 83 p. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

TIAN, S. K. et al. Root adaptations to cadmium-induced oxidative stress contribute to Cd tolerance in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 56, n. 2, p. 344-350, Sept. 2012.

WESTRUP, U.; MCEVOY, F. J. Speckle tracking echocardiography in mature Irish Wolfhound dogs: technical feasibility, measurement error and reference intervals. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 55, n. 1, p. 41, May 2013.

ZOU, J. et al. Effects of cadmium stress on root tip cells and some physiological indexes in *Allium cepa* var. *agrogarum* L. **Acta Biologica Cracoviensia**, Krakow, v. 54, n. 1, p. 129–141, 2012.

**ARTIGO 2 - MODIFICAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS  
DE FOLHA E RAIZ DE CAPIM-ARROZ (*Echinochloa crusgalli* (L.) P.  
*Beauv.*) CULTIVADO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  
CÁDMIO**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar as características morfofisiológicas e químicas de plantas de Capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*), cultivado sob concentrações crescentes de cádmio. As mudas de *Echinochloa crusgalli* foram mantidas por 15 dias em casa de vegetação, em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). Utilizou-se o DIC com 8 tratamentos em 4 repetições, 10 plantas por repetição e 2 repetições por bandeja. As concentrações utilizadas nos tratamentos foram: tratamento controle (0); 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L<sup>-1</sup> de cádmio na forma de Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O. As modificações na morfologia externa e interna, na determinação da fotossíntese e nas trocas gasosas foram observadas ao final do experimento. Amostras de folhas e raízes foram fixadas em FAA (formaldeído ácido acético e álcool 70%) e, posteriormente, conservadas em álcool 70 °GL. Foram utilizadas técnicas habituais em laboratórios de anatomia vegetal para o corte e a coloração das secções. Para cada tratamento, foram feitas 4 repetições e foram fotomicrografadas 3 secções por repetição. Não foi observada a mortalidade das plantas no tempo e nas concentrações de Cd testadas, sugerindo que esta espécie é tolerante a este metal, embora o seu crescimento e o seu desenvolvimento sejam afetados em concentrações elevadas de Cd. É possível afirmar que, em concentrações crescentes de Cd, a partir da concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup>, o crescimento e o desenvolvimento do *Echinochloa crusgalli* são afetados negativamente. Concentrações acima de 1 mg L<sup>-1</sup> modificaram o córtex, a formação dos aerênquimas e a endoderme. A espécie tem características anatômicas que contribuem para a sua sobrevivência em ambiente aquático, contaminado com cádmio e tem potencial para ser utilizada em programas de fitorremediação até a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de Cd. A partir da concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> de Cd, *Echinochloa crusgalli* é mais apropriada para a utilização na bioindicação da contaminação por Cd, devido aos sintomas ocasionados pelo metal.

Palavra-chave: Fitotecnologia. Metal pesado. Gramíneas. Endoderme

## ABSTRACT

### ANATOMICAL AND PHYSIOLOGICAL MODIFICATIONS OF LEAF AND ROOT OF *Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv.) GROWN UNDER DIFFERENT CADMIUM CONCENTRATIONS

The objective of this study was to evaluate the morphological, physiological and chemical characteristics of barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*), grown under increasing concentrations of cadmium. The seedlings of *Echinochloa crusgalli* were maintained for 15 days in a Hoagland and Arnon's nutrient solution (1950). This study aimed to evaluate the morphological, physiological and chemical characteristics barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) grown under increased cadmium concentrations. The completely randomized design was used with 8 treatments and 4 replications, 10 plants per repetition and 2 repetitions per tray. The concentrations used in the treatments were control (0); 0.01; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 and 8.0 mg L<sup>-1</sup> of cadmium as Cd (NO<sub>3</sub>) 2.4H<sub>2</sub>O. Changes in external and internal morphology, in determining photosynthesis and gas exchange were observed at the end of the experiment. Samples of leaves and roots were fixed in FAA (Formalin Acetic Acid and Ethanol 70%) and then preserved in alcohol 70 ° GL. Leaf and root samples were fixed in FAA (formaldehyde acetic acid and 70% ethanol) and then preserved in alcohol 70 ° GL. Standard techniques in plant anatomy laboratories for cutting and staining the sections were used. For each treatment, it was made 4 replicates and three sections were photomicrographed. The remainder was dried and homogenized for assessing the content and Cd accumulation. No mortality was observed in plants at the tested time and Cd concentrations, suggesting that this species is tolerant to this metal, although their growth and development are affected by high concentrations of Cd. It can be argued that, with increasing concentrations of Cd, from the concentration of 0.1 mg L<sup>-1</sup>, growth and development of *Echinochloa crusgalli* are adversely affected. Concentrations above 1 mg L<sup>-1</sup> modified the cortex, the formation of aerenchyma and the endoderm. The species has anatomical features that contribute to their survival in the aquatic environment, contaminated with cadmium and has the potential to be used in phytoremediation programs up to a concentration of 0.5 mg L<sup>-1</sup> Cd. From the concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> Cd, *Echinochloa crusgalli* is more suitable for use as bioindicators of Cd contamination due to the symptoms caused by the metal and also the extracted Cd concentrations.

Keyword: Phytotechnology. Heavy metal. Barnyard grass. Endodermis.

## 1 INTRODUÇÃO

Toda atividade humana tem associada uma geração de águas residuais que devem ser destinadas a um tratamento que garanta a continuidade do ciclo de consumo desse recurso (MARTELO; LARA-BORRERO, 2012). O aumento da população e das atividades industriais tem feito com que a descarga de água contaminada seja um importante problema ambiental, especialmente porque gera poluição por metais pesados como cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As) e outras substâncias perigosas, normalmente de origem industrial, além de poluição orgânica e o aumento na quantidade de nutrientes em rios, mares e lagoas (BEASCOECHEA, 2005).

O cádmio é definido como metal pesado e considerado um elemento não essencial para os processos metabólicos, sendo eficientemente absorvido pelas raízes e folhas das plantas. Está no grupo dos elementos-traço que se fixam em grandes moléculas ficando armazenado nelas ou sendo utilizado em funções ainda desconhecidas (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

O uso de macrófitas tem demonstrado alta eficiência na remoção dos constituintes de águas residuais. Os metais pesados têm sido removidos do ambiente através do uso de diversos tipos de plantas. A literatura registra trabalhos que indicam a remoção de 85 a 95% de ferro, cobre, zinco, cádmio, arsênio e cromo quando são utilizadas plantas como *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Lemna minor*, entre outras macrófitas (MARTELO; LARA-BORRERO, 2012; SILVA et al., 2013; PERREIRA et al., 2011). As gramíneas destacam-se por seu potencial para a revegetação de áreas contaminadas por metais pesados, como é o caso da *Brachiaria decumbens* (SILVA; SIQUEIRA; SOARES, 2006). Diversas espécies de gramíneas têm sido identificadas como promissoras para fitorremediação do cádmio: *Oriza sativa* (FUJIMAKI et al., 2010); *Brachiaria decumbens* (SILVA;

SIQUEIRA; SOARES, 2006) e *Echinochloa crusgalli* para fitorremediação de arsênio (SULTANA; KOBAYASHI, 2011). Argenta et al. (2013) mostraram que plantas de *Brachiaria arrecta* expostas ao arsênio podem sofrer modificações na sua anatomia e fisiologia, o que caracteriza a sua plasticidade, permitindo-lhe sobreviver na presença desse poluente. Fawzy et al. (2012) citam que *Echinochloa pyramidalis* está entre as plantas que poderiam ser utilizadas em programas de biomonitoramento devido ao seu potencial fitorremediador. Para *Echinochloa crusgalli*, poucos estudos descrevem seu potencial para a fitorremediação, assim como os mecanismos anatômicos que contribuem para o seu funcionamento na presença de elementos tóxicos como o Cd.

Sabe-se que, dentro do mesmo gênero, nem todas as espécies se comportam da mesma maneira. Carvalho et al. (2013) trabalharam com *Gomphrena elegans* e *Gomphrena claussenii* e observaram que *G. claussenii* tolera uma grande quantidade de Cd, acumulando-o tanto na raiz como na parte aérea, já a *G. elegans* não tolera grandes quantidades de Cd.

Tendo em vista que nem todas as espécies de gramíneas desenvolvem-se em ambientes contaminados, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar as características morfofisiológicas e químicas de plantas de Capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*), cultivadas em concentrações crescentes de Cd, a fim de determinar se essas plantas apresentam tolerância ao efeito tóxico desse metal.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cultivo das plantas

As mudas de *Echinochloa crusgalli* biotipo 352 (Capim-arroz) foram produzidas a partir de sementes colocadas em bandejas plásticas, contendo substrato vermiculita. As sementes foram fornecidas pelo Instituto

Rio-grandense do Arroz/RS. Após 30 dias, as mudas foram colocadas em solução completa de Hoagland e Arnon (1950) n°2, diluída a 40% de sua força iônica, em bandejas com capacidade 4,0 L, fixadas por meio de uma placa de isopor de 30 cm de diâmetro e 4,0 cm de espessura. A solução nutritiva foi trocada a cada 7 dias. No intervalo de renovação das soluções, o volume das bandejas foi completado com água deionizada, sempre que necessário. O experimento foi mantido por 15 dias em casa de vegetação. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 8 tratamentos em 4 repetições, 10 plantas por repetição e 2 repetições por bandeja. Os tratamentos utilizados foram: controle; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L<sup>-1</sup> de Cd na forma de Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O.

As modificações na morfologia externa e interna foram observadas e registradas ao final do período experimental, com o auxílio de câmera digital, assim como o Analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) para determinação da fotossíntese e das trocas gasosas.

## 2.2. IRGA

Para os parâmetros fisiológicos, utilizou-se o analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LI-6400. Para isso utilizou-se a terceira folha completamente expandida de uma planta por parcela. A área da folha analisada pela câmara do IRGA foi corrigida mediante a medição da área, com auxílio de uma régua, visto que as folhas de poáceas não preenchem toda a câmara, necessitando assim de correção. Foram obtidos resultados em relação à fotossíntese ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a condutância ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

## 2.3. Anatomia de folhas e raízes

Folhas e raízes foram coletadas e fixadas em FAA (formaldeído ácido acético e álcool 70%) e posteriormente conservados em álcool 70 °GL.

As raízes foram emblocadas em historresina Leica® e secções transversais foram realizadas com micrótomo rotativo semiautomático. Em seguida, as secções foram submetidas ao processo de coloração com a mistura de Azul de toluidina 0,5 %, seguindo os métodos descritos por Kraus e Arduin (1997). Nas folhas, as secções transversais foram realizadas na região mediana da folha, obtidas com o auxílio do micrótomo manual. Em seguida, as secções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e submetidas ao processo de coloração com a mistura de Azul de Astra-Safranina seguindo os métodos descritos por Kraus e Arduin (1997). As secções foram colocadas em lâmina com gelatina glicerinada e cobertas por lamínula. Moldes da superfície adaxial e abaxial das folhas foram feitas com uso de adesivo Super Bonder®, na região mediana da folha. Os moldes foram colocados em lâminas. Foram contabilizadas três secções por lâmina, tendo sido montada uma lâmina para cada uma das repetições experimentais, e três medições por secção. As secções foram fotomicrografadas com auxílio de uma câmera digital Olympus U-TV1X-2, acoplada ao microscópio Olympus CX41 e com auxílio do software Carl Zeiss AxioVision Viewer 4.8. As medições foram realizadas no software para análise de imagens ImageJ 1.45s.

Para cada secção da raiz, mediu-se a espessura da epiderme, da exoderme, do córtex, da endoderme, dos vasos do metaxilema e foi feita a contagem e medido o diâmetro dos vasos do metaxilema e o cálculo do Índice de Vulnerabilidade de Carlquist – IVC de acordo com a fórmula:

$$IVC = \frac{\text{Diâmetro dos Elementos Traqueais } (\mu\text{M})}{\text{Número de Elementos Traqueais}}$$

calculado segundo Carlquist (1975).

Para as folhas foram feitas análises sobre a densidade estomática, a espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial, as espessuras do mesofilo e do limbo foliar e o número de feixes vasculares na região mediana da folha.

#### 2.4. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011). As variáveis obtidas foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro Wilk. A transformação dos dados foi feita quando não seguiam uma distribuição normal. Em seguida, foram feitas as análises de variância. A fim de verificar a diferença entre os tratamentos para as características, foi realizada a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott a 5%.

### 3 RESULTADOS

Observou-se que plantas cultivadas em solução sem Cd (tratamento controle) e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de Cd apresentaram maior crescimento de acordo com a análise visual da parte aérea e maior desenvolvimento de raízes, quando comparadas às plantas dos demais tratamentos (Figura 1A). Foram detectadas cloroses nas folhas jovens, expostas às maiores concentrações de Cd (1, 2, 4 e 8 mg L<sup>-1</sup>) além da diminuição do tamanho das plantas de acordo com o aumento da concentração de Cd na solução (Figura 1C).

As plantas diminuíram de tamanho conforme mostram as Figuras 1B e C devido à toxicidade causada pelo metal, afetando negativamente funções vitais da planta, como a taxa fotossintética, condutância e transpiração (Tabela 1).



Figura 1- Plantas de *Echinochloa crusgalli* cultivadas em solução nutritiva com a presença de Cd em diferentes concentrações. A- controle; 0,01; 0,1 mg L<sup>-1</sup>. B- controle; 1; 2; 4 mg L<sup>-1</sup>. C- controle e 8 mg L<sup>-1</sup>

Em relação ao tratamento controle, não houve diferença significativa na fotossíntese, na transpiração e na condutância em plantas de *Echinochloa crusgalli* cultivadas na concentração inicial (0,01 mg L<sup>-1</sup>) de Cd. Quanto às características fisiológicas, houve redução significativa da fotossíntese, da transpiração e da condutância à medida que a concentração do metal em solução aumentou (Tabela 1). A partir da concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de Cd em solução nutritiva, a fotossíntese, a transpiração e a condutância sofreram decréscimo quando comparadas ao tratamento controle.

Tabela 1 – Características fotossintéticas para diferentes concentrações de cádmio em folhas de *Echinochloa crusgalli*.

[Cd] (mg L <sup>-1</sup> )	Fotossíntese ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Transpiração ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Condutância ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
0	17,06 a	1,79 a	0,11 a
0,01	13,16 a	1,58 a	0,09 a
0,1	2,38 b	0,19 b	0,01 b
0,5	0,55 b	0,02 b	0,00 b
1	1,18 b	0,25 b	0,01 b
4	1,20 b	0,18 b	0,01 b
8	1,44 b	0,17 b	0,01 b
CV	15,55%	6,99%	0,86%

\* Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si estatisticamente, 0,05% pelo teste de Scott-Knott.

Em relação às características anatômicas, as folhas de *Echinochloa crusgalli* são anfiestomáticas, apresentando estômatos na epiderme tanto na face adaxial quanto na abaxial. Possuem epiderme unisseriada em ambas as faces, apresentando cutícula delgada. Apresentam células buliformes e anatomia do tipo Kranz, com o mesofilo homogêneo e células da bainha circundadas por células do mesofilo (Figura 2). O metabolismo é do tipo C<sub>4</sub>, conforme descrito por Concenço et al. (2008).

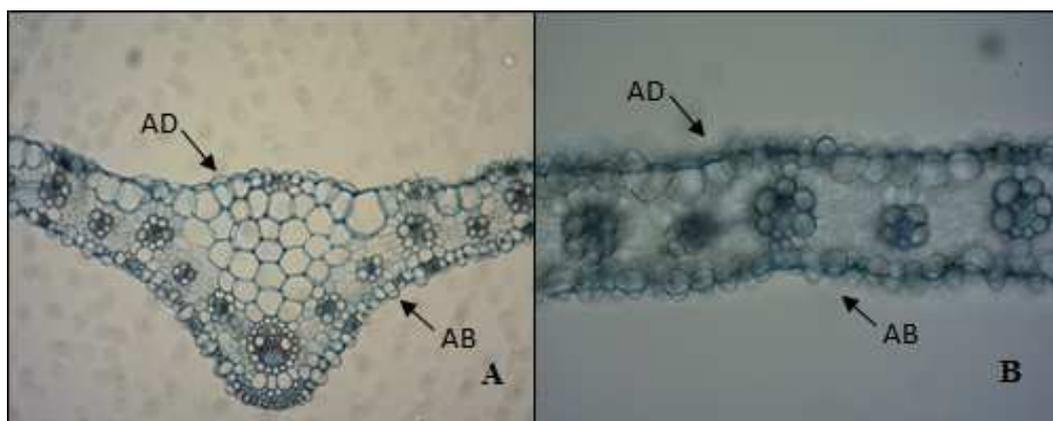


Figura 2– Seção transversal de folha de *Echinochloa crusgalli*. A- Nervura central. B- Limbo foliar. AD=Epiderme da face adaxial AB=Epiderme da face abaxial.

Na epiderme da face adaxial, a densidade estomática se manteve constante até a concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , comparada à densidade nas folhas de plantas cultivadas sem o metal. Observou-se um aumento na densidade estomática da epiderme tanto na face adaxial como na face abaxial, quando se aumentou a concentração de Cd na solução nutritiva a partir da concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabela 2).

Não foi observada modificação na espessura da epiderme da face abaxial, mas, em relação à epiderme da face adaxial, foram observadas modificações, exceto na concentração de  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd. Com o aumento da concentração de Cd na solução, até  $4 \text{ mg L}^{-1}$ , observou-se uma diminuição de sua espessura da epiderme da face abaxial, comparada ao controle. A epiderme da face adaxial das plantas cultivadas em solução com  $8 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd teve maior espessura, quando comparada às demais concentrações. Observou-se uma redução da espessura do mesofilo já na concentração inicial de Cd ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ), sofrendo uma nova redução significativa a partir da concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd. Portanto, estes tecidos influenciaram na espessura do limbo foliar, que apresentou uma redução da espessura na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd.

Não foi observada alteração no número de feixes vasculares das plantas estudadas.

Tabela 2 – Modificações foliares de plantas de *Echinochloa crusgalli* cultivado em solução com diferentes concentrações de Cd.

[Cd] mg L <sup>-1</sup>	Densidade estomática na face adaxial	Densidade estomática na face abaxial	Espessura Epiderme da face adaxial*** (µm)	Espessura Epiderme da face abaxial (µm)	Espessura Mesofilo (µm)	Limbo foliar (µm) **	Número de feixes vasculares (mm <sup>-1</sup> )
<b>0</b>	28,78 b	24,33 c	32,35 a	27,26 a	90,73 a	146 a	8,67 a
<b>0,01</b>	29,11 b	37,33 a	31,46 a	24,14 a	81,53 b	125 ab	10,0 a
<b>0,1</b>	27,11 b	32,67 b	26,91 b	22,65 a	73,96 c	133 ab	9,53 a
<b>0,5</b>	29,78 b	32,44 b	28,66 b	23,45 a	77,53 b	129 ab	8,70 a
<b>1</b>	38,89 a	37,78 a	-	-	-	-	9,65 a
<b>2</b>	40,89 a	43,00 a	28,68 b	23,83 a	61,34 d	106,9 b	9,31 a
<b>4</b>	42,00 a	42,88 a	27,91 b	24,33 a	70,53 c	129 ab	8,70 a
<b>8</b>	46,11 a	44,67 a	31,50 a	24,80 a	63,34 d	131 ab	9,86 a
<i>CV</i>	10,56%*	20,27%	9,49%	12,17%	9,52%	9,94%	16,09%

\*Dados transformados. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si estatisticamente, 0,05% pelo teste de Scott-Knott. \*\* Teste de Tukey.\*\*\*Significativo a 0,08% pelo teste de F.

Não foram observadas modificações na espessura da epiderme, exoderme, diâmetro médio dos vasos do xilema e no IVC das raízes das plantas cultivadas em solução com concentrações crescentes de Cd (Tabela 3). Comparada aos demais tratamentos, a espessura da endoderme das raízes de plantas cultivadas na concentração de 8 mg L<sup>-1</sup> de Cd foi maior (Figura 3). A fim de evitar erros nas comparações dos valores, alguns dados da Tabela 2 e 3 foram omitidos devido à dificuldade de preparação da amostra e medições posteriores.

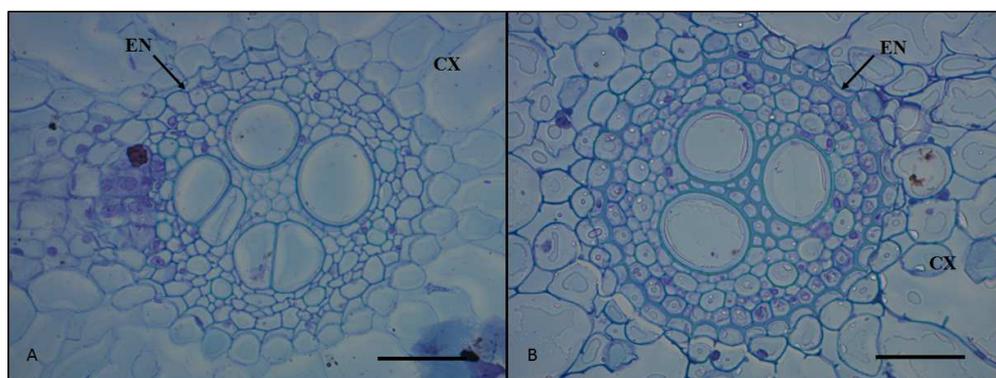


Figura 3 – Secções transversais de raízes de *E. crusgalli* sob concentrações de Cd em solução nutritiva, detalhando endoderme. A- 0,0; B- 8 mg L<sup>-1</sup>. Barra: 50 µm. EN= Endoderme; CX= Córtecx.

Tabela 3 – Características anatômicas da raiz na zona pilífera para plantas de *Echinochloa crusgalli* cultivadas em diferentes concentrações de cádmio.

[Cd] mg L <sup>-1</sup>	Epiderme (µm)	Exoderme (µm)	Córtex (µm)	Porcentagem de aerênquima (%)	Endoderme (µm)	Diâmetro médio dos vasos do metaxilema (µm)	IVC
<b>0</b>	10,13 a	21,03 a	256,99 a	37,60 b	7,11 b	41,49 a	8,10 a
<b>0,01</b>	8,91 a	20,24 a	203,62 b	56,50 a	6,38 b	41,81 a	9,85 a
<b>0,1</b>	-	23,07 a	182,75 b	72,35 a	7,38 b	43,78 a	16,28 a
<b>0,5</b>	7,49 a	21,73 a	134,16 b	58,85 a	6,53 b	37,73 a	12,51 a
<b>1</b>	-	20,16 a	183,61 b	41,42 b	7,65 b	41,95 a	14,29 a
<b>4</b>	10,60 a	23,10 a	188,01 b	27,55 b	7,45 b	41,71 a	9,88 a
<b>8</b>	13,70 a	24,39 a	181,12 b	45,98 b	9,44 a	41,58 a	10,93 a
<i>CV</i>	<i>13,21*</i>	<i>14,35</i>	<i>18,76</i>	<i>28,19</i>	<i>12,49</i>	<i>13,63</i>	<i>20,59*</i>

\*Dados transformados. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si estatisticamente, 0,05%, pelo teste de Scott-Knott.

Já a espessura do córtex diminuiu com a presença de Cd (Tabela 3, Figura 4).

Observou-se um aumento do aerênquima nas raízes das plantas cultivadas com concentrações até  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Em concentrações maiores que  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , observou-se uma diminuição da formação de aerênquima (Figura 4).

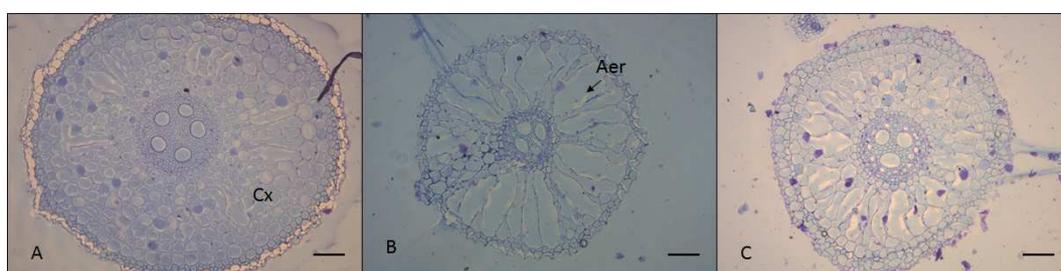


Figura 4 - Secções transversais de raízes de *E. crusgalli* sob concentrações de Cd em solução nutritiva. Cx= Córtex, Aer= Aerênquima. A- Controle. B-  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  C-  $4 \text{ mg L}^{-1}$

#### 4 DISCUSSÃO

Foram detectadas cloroses nas folhas jovens, expostas às maiores concentrações de Cd. Esse é um dos sintomas típicos visíveis da toxicidade ao Cd conforme descrito por Guimarães et al. (2008) e, com o aumento da concentração do metal na solução, houve diminuição do tamanho das plantas. O aparecimento de manchas cloróticas nas folhas de plantas cultivadas com concentrações de Cd pode ser explicado pela diminuição na absorção de ferro (Fe), elemento quimicamente semelhante ao Cd. Por ser o Fe um elemento envolvido nas reações de transferência de elétrons, importante função na síntese das clorofilas, sua deficiência afeta diretamente a fotossíntese, podendo provocar sintomas como cloroses e a redução da biomassa da parte aérea. O Cd tem influência direta tanto nas enzimas

relacionadas à biossíntese de clorofilas, pela substituição do Mg, como na redução do número de cloroplastos por célula (GUIMARÃES et al., 2008). Gallego et al. (2012) citaram que a exposição ao Cd induz a uma diminuição notável na atividade ATP Sulfurylase e O-Acetylserine na folha. Essas enzimas participam da via de assimilação de sulfato. Silva et al. (2013) também observaram sinais de clorose em folhas de *Pistia stratiotes* expostas às maiores concentrações Cd (1,6; 3,2; 6,4 e 12,8 mg L<sup>-1</sup>).

Em relação ao tamanho das plantas, a diminuição pode ser atribuída à fitotoxicidade do Cd, conforme descrito por Belleghem et al. (2007), quando trabalharam com *Arabidopsis thaliana* após 21 dias de exposição ao metal. Pereira et al. (2011a) observaram redução na matéria seca de plantas de *Oryza sativa* L. cv. 'IAC 202' e *Lactuca sativa* L. cv. 'Vera', cultivadas em solo com diferentes concentrações de Cd.

Houve redução de fotossíntese em todas as concentrações de Cd a partir de 0,1 mg L<sup>-1</sup>. À medida que a concentração desse metal no meio de cultivo aumentou, foi possível concluir que a quantidade de Cd translocada para a parte aérea ocasionou distúrbios ao aparato fotossintético, afetando este processo metabólico essencial, ainda que as concentrações de Cd acumuladas nos órgãos aéreos tenham sido inferiores às encontradas nas raízes. Oliveira (2013) também observou decréscimo na taxa de fotossíntese em *C. zizanioides* em concentrações crescentes de Cd. A fotossíntese se manteve semelhante à fotossíntese do tratamento controle na concentração inicial, devido ao baixo teor de Cd na parte aérea. Teores maiores que 5 µg Cd g<sup>-1</sup> são tóxicos para a maioria das plantas (WHITE; BROWN, 2010).

A diminuição da transpiração a partir de 0,1 mg L<sup>-1</sup> também é uma adaptação ao ambiente contaminado, reduzindo assim a condução de metal para a parte aérea. Casson e Hetherington (2010) citam que as plantas têm a habilidade de restringir a perda de água ou de diminuir o número de estômatos na epiderme como forma de se adaptar às mudanças no ambiente. O aumento na densidade estomática pode ter minimizado os efeitos de uma condutância estomática reduzida, permitindo, assim, uma maior captação de

CO<sub>2</sub>, como pode ser observado na Tabela 2. O Cd foi responsável por induzir a liberação de cálcio de compartimentos subcelulares (retículo endoplasmático ou vacúolo), aumentando seus níveis no citosol, o qual explica redução na abertura estomática em várias plantas como descrito por Guimarães et al. (2008). A redução da abertura estomática pode reduzir a disponibilidade de carbono para a fotossíntese, acarretando a redução na condutância estomática e das taxas de crescimento.

O aumento da densidade estomática também poderia ser uma medida compensatória pela redução da área foliar e da espessura do mesofilo, garantindo a manutenção do fluxo de CO<sub>2</sub>. Porém, isso não foi suficiente para garantir a manutenção da fotossíntese nas folhas de plantas cultivadas em concentrações maiores que 0,1 mg L<sup>-1</sup>. O decréscimo na espessura do mesofilo, bem como na espessura da epiderme na face adaxial a partir da concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de Cd (Tabela 2) podem ser explicado pela toxicidade do metal, reduzindo o processo de divisão e alongamento celular. A redução na espessura destes tecidos em *E. crusgalli* provavelmente deve ter sido influenciada pelo fato de o Cd afetar a ação de fitormônios responsáveis pela extensibilidade celular, como, por exemplo, as auxinas. O Cd é um inibidor competitivo dos cofatores requeridos pelas rotas biossintéticas das auxinas, conforme observado por Zhu et al. (2013) em *Arabidopsis thaliana*, ao constatarem que o Cd reduziu o nível de auxina endógena. Sua ausência resulta na perda da capacidade de produção de ácido indolacético, que promoveria a extensibilidade celular, fazendo com que ocorra a alteração dos processos fisiológicos das plantas, causando toxicidade. Zhu et al. (2013) também observaram que plantas com mais auxina se tornaram mitigadoras da toxicidade do Cd, fazendo com que ele se fixe mais na raiz, sendo menos transportado para a parte aérea.

O aumento na densidade estomática foi acompanhado pela redução da espessura do mesofilo das folhas de *E. crusgalli*, não se refletindo no aumento da fotossíntese, evidenciando a toxicidade desse metal nas plantas estudadas. De acordo com Castro, Pereira e Paiva (2009), os estômatos

podem variar de forma apreciável na planta, sob influência de características ambientais como disponibilidade de água, altitude e temperatura. Vários autores têm mostrado também evidências da influência de metais pesados na densidade estomática. Gomes et al. (2011) observaram o aumento na densidade estomática em folhas de *Brachiaria decumbens* cultivada em solo contaminado com metais pesados. Pereira et al. (2011) observaram na face abaxial e adaxial da epiderme de aguapé, aumento na densidade estomática na concentração de 0,25 mg L<sup>-1</sup> de arsênio em relação ao tratamento controle. De acordo com estes autores, o aumento da densidade estomática permitiu maior captação de CO<sub>2</sub> pela planta e aumentou a fotossíntese. A redução na espessura do mesofilo e da epiderme da face abaxial e adaxial também foi observada por Oliveira (2013) em *C. zizanioides*, ressaltando, ainda, que o Cd tem comprovado efeito no fuso mitótico, interferindo negativamente na ação de fitormônios, responsáveis pelo alongamento das células. Shi e Cai (2009) concluem que as características anatômicas de *Arachis hypogaea* L. como a densidade estomática, a espessura da lâmina e o parênquima paliçádico apresentam uma grande plasticidade e que essas características são mais sensíveis a metais pesados do que outras.

O fato de ter ocorrido o espessamento da endoderme na concentração de 8 mg L<sup>-1</sup> de Cd na solução indica que a toxicidade provocada pelo Cd induz ao espessamento das barreiras apoplásticas em *E. Crusgalli*, em alta concentração. Essas barreiras são formadas quando as raízes são expostas a altas concentrações de elementos potencialmente tóxicos como o Cd, de acordo com Lux et al. (2011). As barreiras apoplásticas atuam como filtros biológicos, evitando, assim, a absorção excessiva de Cd. O espessamento da endoderme evita que o Cd chegue aos vasos do xilema, via apoplasto, tendo que seguir o caminho simplasto obrigatório, o que reduz a translocação do metal para a parte aérea, protegendo o sistema fotossintético deste elemento tóxico, conforme citado por Oliveira (2013). Silva et al. (2013) e Oliveira (2013) observaram modificações na espessura dos tecidos da raiz de *Pistia stratiotes* e *C.*

*zizanioides*, respectivamente, promovendo o espessamento da epiderme, endoderme e exoderme quando expostas ao Cd.

Não foi observada alteração no número de feixes vasculares das plantas de *E. crusgalli*, indicando que o transporte de assimilados e nutrientes nas folhas não foi afetado pela presença de Cd. Argenta et al. (2013) e Pereira et al. (2011) observaram aumento no número de feixes vasculares quando trabalharam com arsênio em *Brachiaria arrecta* e *Eichhornia crassipes*, respectivamente, e concluíram que esse aumento minimiza os efeitos tóxicos desse metal na planta.

A porcentagem de aerênquimas em relação ao córtex radicular aumentou nas concentrações até 0,5 mg L<sup>-1</sup> de Cd (Figura 4). Pode-se relacionar essa resposta à lisogênese das células devido ao estresse abiótico promovido pelo metal. Resultado semelhante foi observado por Oliveira (2013) em *C. zizanioides*, quando submetida a concentrações crescentes de Cd em solução. O aumento na porcentagem de aerênquima pode ser considerado um fator de plasticidade anatômica, ligado ao fato de que, quanto maior a proporção de aerênquimas no cortex radicular, melhor será a difusão de O<sub>2</sub> para as raízes, sendo esta necessária para a manutenção da eficiência dos processos metabólicos vitais. Por outro lado, Oliveira (2013) observa que, quanto maior a proporção de aerênquimas no córtex, menor o número de células capazes de absorver Cd, o que não seria uma característica de interesse, do ponto de vista da fitorremediação.

Isso sinaliza o seu potencial de utilização em programas de fitorremediação para este metal, como também sua utilização como bioindicadora da presença deste poluente em meios aquáticos por ele contaminados.

Com relação à maximização da captação de CO<sub>2</sub> em condições que comprometem a fotossíntese seriamente, essas características de plasticidade anatômica observadas para a espécie *E. crusgalli* contribuem efetivamente para um certo grau de tolerância ao Cd, como forma de amenizar a toxicidade do Cd causada a este processo.

## 5 CONCLUSÃO

Não foi observada mortalidade das plantas no tempo de experimento e nas concentrações de Cd testadas, sugerindo que esta espécie é tolerante a este metal, embora o seu crescimento e desenvolvimento sejam afetados nas concentrações elevadas de Cd.

A partir da concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e em concentrações crescentes de Cd, é possível afirmar que o crescimento e o desenvolvimento de *Echinochloa crusgalli* são afetados negativamente. Os dados de fotossíntese, condutância e transpiração corroboram essa afirmação. No entanto, a maioria das modificações favoráveis observadas nas características anatômicas visa compensar os danos causados pela toxicidade do metal nesta espécie.

As concentrações de Cd tiveram pouca influência nos tecidos radiculares. Apenas concentrações acima de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  causaram modificações no córtex, na formação dos aerênquimas e na endoderme.

A espécie tem características anatômicas que contribuem para a sua sobrevivência em ambiente aquático, contaminado com cádmio e tem potencial para ser utilizada em programas de fitorremediação até a concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd. A partir de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd, é mais apropriada para a utilização na bioindicação da contaminação por Cd.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, ao CNPq e ao Instituto Rio-grandense do Arroz.

## REFERÊNCIAS

ARGENTA, J. A. et al. Anatomical and physiological characteristics of tanner grass exposed to arsenic. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 56, Supl., p. 13-22, dez. 2013.

BEASCOECHEA, E. M. Las águas residuais normativas. In: GONZALEZ, J. F. (Coord.). **Manual de fitodepuração. Filtros de macrófitas em flotação**. Madrid: [s.n], 2005. Cap. 1, p. 13-30.

BELLEGGHEM, F. V. et al. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, London, v. 173, n. 3, p. 495–508, 2007.

CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. Berkeley: University of California, 1975.

CARVALHO, M. T. V. et al. *Gomphrena claussenii*, the first South-American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 180, June 2013.

CASSON, S. A.; HETHERINGTON, A. M. Environmental regulation of stomatal development. **Current Opinion in Plant biology**, London, v.13, n. 1, p. 90-95, Feb. 2010.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: Editora da UFLA, 2009.

CONCENÇO, G. et al. Competitiveness of *Echinochloa* biotypes resistant and susceptible to quinclorac. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 195-202, jan./mar. 2008.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO. Água: desafios da sociedade. In: PRÊMIO JOVEM CIENTISTA, 27., 2013, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Fundação Roberto Marinho, 2013.

FAWZY, M. A. et al. Heavy metal biomonitoring and phytoremediation potentialities of aquatic macrophytes in River Nile. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 184, n. 3, p. 1753–1771, Mar. 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./dez. 2011.

FERREIRA, E. A. et al. Características micromorfológicas de biótipos de capim-arroz resistente e suscetível ao quinclorac. **Pesquisa Agropecuária**

**Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 8, p. 1048-1056, ago. 2012.

FUJIMAKI, S. et al. Tracing cadmium from culture to spikelet: noninvasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport, and accumulation of cadmium in an intact rice plant. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, n. 4, p. 1796–1806, Apr. 2010.

GALLEGO, S. M. et al. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 83, p. 33–46, Nov. 2012.

GOMES, M. P. et al. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 566-573, Sept./Oct. 2011.

GUIMARÃES, M. A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Viçosa, v. 3, n. 1, p. 58-65, 2008.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: The College of Agriculture University of California, 1950.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer, 2007.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997.

LEITÃO FILHO, H. F.; BACCHI, O.; ARANHA, C. Família gramineae. In: BACCHI, O. et al. **Plantas invasoras de culturas**: volume 1. São Paulo: HUCITEC, 1972. p. 28-42.

LUX, A. et al. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 21–37, Sept. 2011.

MARQUES, M.; AGUIAR, C. R. C.; SILVA, J. J. L. S. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 1-11, jan./fev. 2011.

MARTELO J.; LARA-BORRERO, J. A. Floating macrophytes on the wastewater treatment: a state of the art review. **Ingeniería y Ciencia**, Buenos Aires, v. 8, n. 15, p. 221-243, 2012.

OLIVEIRA, C. **Mecanismos anatômicos, citológicos e fisiológicos de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Robert) para a recuperação de ambientes aquáticos contaminados por cádmio e chumbo.** 2013. 219 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

PEREIRA, B. F. F. et al. Cadmium availability and accumulation by lettuce and rice. **Revista Brasileira Ciencia do Solo**, Viçosa, v.35, n. 2, p. 645-654, mar./abr. 2011a.

PEREIRA, F. J. et al. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por Arsênio. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 259-267, abr./jun. 2011.

PEREIRA, M. P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Agro@ambiente On-line**, Roraima, v. 7, n. 1, p. 36-43, abr. 2013.

SHI, G.; CAI, Q. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.67, n. 1, p. 112–117, Nov. 2009.

SILVA, S. A. et al. Reproductive, cellular, and anatomical alterations in pistia stratiotes l. plants exposed to cadmium. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 224, p. 1465, Feb. 2013.

SILVA, S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Mycorrhizal fungi influence on brachiariagrass growth and heavy metal extraction in a contaminated soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p.1749-1757, dez. 2006.

SULTANA, R.; KOBAYASHI, K. Potential of barnyard grass to remediate arsenic-contaminated soil. **Weed Biology and Management**, Elmsford, v. 11, n. 1, p. 12–17, Mar. 2011.

WHITE, P. J.; BROWN, P. H. Plant nutrition for sustainable development and global health. **Annals of Botany**, London, v.105, n. 7, p. 1073–1080, June 2010.

ZHU, X. F. et al. Exogenous auxin alleviates cadmium toxicity in Arabidopsis thalianaby stimulating synthesis of hemicellulose 1 and

increasing the cadmium fixation capacity of root cell walls. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, n. 263, p. 398– 403, Dec. 2013.