

FERNANDA PEREIRA GUIMARÃES

POTENCIAL DE MACRÓFITAS PARA REMOÇÃO
DE ARSÊNIO E ATRAZINE EM SOLUÇÃO
AQUOSA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

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

T

G963p
2006

Guimarães, Fernanda Pereira, 1981-
Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e
atrazine em solução aquosa / Fernanda Pereira Guimarães.
– Viçosa : UFV, 2006.
xiii, 72f. : il. ; 29cm.

Orientador: Rosane Maria de Aguiar Euclides.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fitorremediação. 2. Plantas aquáticas. 3. Água -
Poluição. 4. Arsênio. 5. Herbicidas - Toxicologia.
6. Toxicologia ambiental. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.95

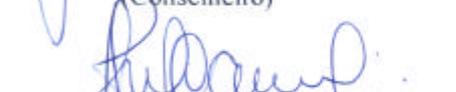
FERNANDA PEREIRA GUIMARÃES

POTENCIAL DE MACRÓFITAS PARA REMOÇÃO DE ARSÊNIO E ATRAZINE EM SOLUÇÃO AQUOSA

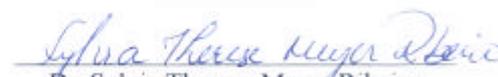
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 22 de fevereiro de 2006


Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Conselheiro)


Prof. Flávia Maria da Silva Carmo


Dr. Décio Karam


Dr. Sylvia Therese Meyer Ribeiro


Prof. Rosane Maria de Aguiar Euclides
(Orientadora)

Aos meus pais Arivaldo e Clêuza, pelo amor e dedicação que sempre tiveram.

Ao meu irmão Vinícius, pela força, incentivo e exemplo.

À vovó Alzira, e à Dindinha, pelo exemplo de vida (*sempre presente*).

Ao Eduardo, pelo incentivo e por estar sempre ao meu lado.

A Deus, pela oportunidade de estar aqui.

”Quando a gente pensa que sabe todas as respostas; vem a vida e muda todas as perguntas.”

Emily Paul

AGRADECIMENTOS

Ao povo brasileiro, que via Universidade Federal de Viçosa, possibilitou o meu estudo no curso de pós-graduação em Botânica.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

À EMBRAPA, que concedeu a bolsa de mestrado para realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa, pelo suporte dado para realização da microscopia eletrônica de varredura.

À Profa. Rosane, pela orientação, compreensão e carinho que sempre me dedicou.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Juraci Alves de Oliveira, Dr. Décio Karam, Prof. Flávia Maria da Silva Carmo e Dr. Sylvia Therese Meyer Ribeiro, pelas contribuições na melhoria do trabalho.

Ao Prof. Juraci, pela amizade e pelo incentivo profissional e pessoal.

Ao Prof. Marco Oliva pelo carinho, pelas idéias e pelos conselhos.

Ao Dr. Décio Karam, que me fez crescer como profissional e como ser humano.

Ao Prof. Paulo De Marco pelas idéias e pelo incentivo profissional.

Ao Francisco pela amizade, pelas idéias e por toda ajuda.

Ao Rogério Gomide, Celso e João Bosco por toda a colaboração, apoio e alegria contagiante.

Ao Ângelo e a Ilza pelo carinho e pela rápida solução dos problemas burocráticos.

Aos amigos da UCP, que sempre garantiram um ambiente de trabalho maravilhoso.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Quantitativa, minha outra casa.

Ao André, por tornar o ambiente de trabalho cheio de alegria e dúvidas.

Aos amigos da EMBRAPA, Alexandre, Marquinhos e Michelli, que me ajudaram em todos os momentos. Obrigada pelo carinho e dedicação.

Ao Eduardo que esteve ao meu lado em meio a todas as turbulências.

Ao meu irmão, Vinícius, que sempre acreditou em mim.

Às amigas, Alice e Cristiane, por me agüentarem tanto tempo. Amo vocês.

Aos meus pais que sempre torceram por mim.

À Dindinha e vovó Alzira (*sempre presente*) por estarem sempre olhando pela eterna “tica”.

A todos que estiveram nos bastidores contribuindo direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, como também para manutenção da saúde física e psicológica de sua autora.

A Deus, que me deu inúmeras oportunidades de estar aqui.

BIOGRAFIA

FERNANDA PEREIRA GUIMARÃES, filha de Arivaldo Alves Guimarães e Clêuza de Fátima Pereira Guimarães, nasceu em Curvelo-MG, em 15 de novembro de 1981.

Em abril de 1999, iniciou na Universidade Federal de Viçosa o curso de graduação em Ciências Biológicas, que foi concluído em janeiro de 2004.

Em março de 2004, ingressou no curso de Mestrado em Botânica, na área de Respostas das Plantas a Agentes Poluentes, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2006.

CONTEÚDO

Página

RESUMO-----	x
ABSTRACT-----	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL-----	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	3
CAPÍTULO I-----	5
POTENCIAL DE MACRÓFITAS PARA REMOÇÃO DE ARSÊNIO EM SOLUÇÃO AQUOSA-----	5
1. INTRODUÇÃO -----	5
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	9
2.1. Obtenção das plantas -----	9
2.2. Análise de crescimento-----	9
2.3. Exposição das plantas ao As -----	9
2.4. Absorção de arseniato em diferentes concentrações de fosfato -----	10
2.5. Determinação de As nas plantas-----	11
2.6. Eficiência de remoção de As-----	11
2.7. Determinação do teor de clorofila total e carotenóides-----	11
2.8. Determinação do teor de antocianina -----	12
2.9. Análise estatística -----	12
2.9. Sintomatologia visual das plantas expostas ao As -----	12
2.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) -----	13
3. RESULTADOS-----	14
3.1. Avaliação do crescimento das plantas -----	14
3.2. Ganho de massa fresca -----	14
3.3. Ganho de massa seca -----	17
3.4. Acúmulo de arsênio-----	19
3.5. Eficiência na remoção de arsênio da solução -----	20
3.7. Competição arseniato e fosfato -----	21
3.6. Teor de clorofila total, carotenóides e antocianina-----	23
3.8. Sintomatologia-----	26
4. DISCUSSÃO-----	30
5. CONCLUSÃO-----	35

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	36
CAPÍTULO II: -----	42
POTENCIAL DE MACRÓFITAS NA REMOÇÃO DE ATRAZINE (2- CLORO-4-ETILAMINO-6-ISOPROPILAMINO-S-TRIZINA) EM SOLUÇÃO AQUOSA -----	42
1. INTRODUÇÃO -----	42
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	46
2.1. Obtenção das plantas -----	46
2.3. Exposição das plantas a atrazine -----	46
2.2. Determinação de atrazine -----	47
2.6. Eficiência de remoção de atrazine -----	47
2.3. Análise estatística -----	48
2.4. Sintomatologia visual das plantas expostas a atrazine -----	48
2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) -----	48
3. RESULTADOS -----	49
3.1. Ganho de massa fresca -----	49
3.2. Ganho de massa seca -----	51
3.3. Absorção de atrazine pelas macrófitas aquáticas -----	53
3.4. Eficiência de remoção de atrazine -----	55
3.5. Sintomatologia -----	56
4. DISCUSSÃO -----	60
5. CONCLUSÃO -----	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	66
CONCLUSÃO GERAL -----	72

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: POTENCIAL DE MACRÓFITAS PARA REMOÇÃO DE ARSÊNIO EM SOLUÇÃO AQUOSA

Figura 1: Crescimento exponencial das macrófitas estudadas, em solução nutritiva, durante dez dias.....	15
Figura 2: Ganho de massa fresca das macrófitas expostas a diferentes concentrações de As, ao longo do período experimental.....	16
Figura 3: Ganho de massa seca em diferentes concentrações de As.....	18
Figura 4: Concentração de As acumulado pelas macrófitas estudadas, nos diferentes tratamentos.	20
Figura 5: Eficiência de remoção de As (%) da solução, para os diferentes tratamentos.	21
Figura 6: Absorção de As pelas macrófitas estudadas, em diferentes concentrações de fosfato.....	22
Figura 7: Teor de clorofila total e carotenóides em <i>A. caroliniana</i> exposta a diferentes concentrações de As.....	23
Figura 8: Teor de antocianina em <i>A. caroliniana</i> exposta a diferentes concentrações de As.	24
Figura 9: Teor de clorofila total e carotenóides em <i>L. gibba</i> exposta a diferentes concentrações de As.	25
Figura 10: Sintomatologia das plantas exposta ao As.	27
Figura 11: Eletromicrografias de varredura.	28

CAPÍTULO I: POTENCIAL DE MACRÓFITAS PARA REMOÇÃO DE ATRAZINE (2-CLORO-4-ETILAMINO-6-ISOPROPILAMINO-S-TRIZINA) EM SOLUÇÃO AQUOSA

Figura 1: Ganho de massa fresca, em macrófitas aquáticas, quando expostas a diferentes concentrações de atrazine, ao longo do período experimental (6 dias).	50
---	----

Figura 2: Ganho de massa seca, em macrófitas aquáticas, expostas a diferentes concentrações de atrazine.....	52
Figura 3: Concentração de atrazine, em macrófitas aquáticas, em diferentes tratamentos.	54
Figura 4: Concentração de atrazine em macrófitas expostas a concentração de 10,0 mg L ⁻¹	54
Figura 5: Eficiência de remoção de atrazine (%), em solução, para diferentes tratamentos.	55
Figura 6: Sintomatologia das macrófitas aquáticas expostas a atrazine.	57
Figura 7: Eletromicrografias de varredura.....	58

RESUMO

GUIMARÃES, Fernanda Pereira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa.** Orientador: Rosane Maria Aguiar Euclides. Conselheiros: Juraci Alves de Oliveira e Marco Antônio Oliva Cano.

O potencial de três macrófitas aquáticas: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* e *Lemna gibba* foi avaliado, neste estudo, visando a seleção de plantas para serem utilizadas na remediação de ambientes contaminados por arsênio (As) e atrazine. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, durante seis dias, em vasos contendo solução de Hoagland ($\frac{1}{4}$ de força iônica), nas seguintes concentrações: 0,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de As e 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 mg L⁻¹ de atrazine. As três espécies apresentaram um maior acúmulo de As, à medida que houve aumento da concentração do metalóide em solução. Entretanto, foi constatada uma redução no ganho de massa fresca e seca, quando as plantas foram expostas a concentrações elevadas de As. As macrófitas demonstraram diferenças na eficiência de remoção de As em solução. *Azolla caroliniana*, *S. minima* e *L. gibba* acumularam em média 0,130; 0,20 e 1,397 mg gMS⁻¹ de As, respectivamente, quando expostas a 5,0 mg L⁻¹. Em solução com baixa concentração de fosfato, as macrófitas absorveram maior quantidade de As, visto que o fosfato e o As, na forma de arseniato, competem pelos mesmos sítios de absorção. Quanto maior a concentração de As nos tecidos de *L. gibba* menor os teores de clorofila total e carotenóides obtidos, constatado pela alta incidência de cloroses. *Lemna gibba*, também apresentou redução do tamanho das folhas. A presença de As não afetou a síntese de clorofila total e carotenóides em *A. caroliniana*. Essa espécie apresentou folhas arroxeadas, com elevada concentração de antocianinas, cuja presença sugere deficiência de fosfato. Em *S.*

minima ocorreram necroses marginais, em folhas flutuantes da parte aérea, sendo as plantas capazes de reproduzir, liberando plantas-filhas, livres de qualquer sintoma visual. No estudo de atrazine, um herbicida inibidor do processo de fotossíntese, houve comprometimento do ganho de massa fresca e seca nas três macrófitas estudadas, o que causou a morte das plantas. A ocorrência de cloroses e necroses, observadas nas plantas, demonstrou a sensibilidade das três espécies ao herbicida. Estas apresentaram baixo potencial de remoção de atrazine, quando expostas a baixas concentrações do herbicida. Porém, na concentração de 10,0 mg L⁻¹ de atrazine, onde houve indução da morte das plantas, *L. gibba* e *A. caroliniana* demonstraram potencial para remover o herbicida da solução (0,016 e 0,018 mg gMF⁻¹, respectivamente). Este fato, provavelmente, está relacionado a processos de adsorção da atrazine à matéria morta. A quantidade percentual de As e atrazine removidos da solução, pelas plantas estudadas, reduziu quando as plantas foram expostas a altas concentrações dos poluentes. O uso destas espécies na remediação de ambientes aquáticos mostrou ser limitado requerendo investigações mais profundas. Das três espécies estudadas, *L. gibba* foi a única macrófita que pode ser considerada hiperacumuladora de As, enquanto *A. caroliniana*, *S. minima* e *L. gibba* não foram eficientes na remoção do herbicida atrazine da solução.

ABSTRACT

GUIMARÃES, Fernanda Pereira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2006. **Potencial of macrophytes to remove arsenic and atrazine from water solution.** Advisor: Rosane Maria Aguiar Euclides. Committee members: Juraci Alves de Oliveira and Marco Antônio Oliva Cano.

The potential of three aquatic plants: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* and *Lemna gibba* was evaluated, in this study, in order to select plants to be used in phytoremediation of water polluted by arsenic (As) and atrazine. The experiments were carried out in a green house, during six days, using vases containing Hoagland solution ($\frac{1}{4}$ of ionic force), in the following concentrations: 0,5; 2,5 and 5,0 mg L⁻¹ of As and 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 mg L⁻¹ of atrazine. The three species showed an increase accumulation of arsenic, while there was an increase of arsenic concentration in solution. However, it was noticed a reduction in the fresh and dry mass production, when the plants were exposed to high concentrations of As. The plants demonstrated differences in the efficiency of removal of As from the solution. *Azolla caroliniana*, *S. minima* and *L. gibba* accumulated on average 0,130; 0,200 and 1,397 mg gMS⁻¹ of As, respectively, when exposed to 5,0 mg L⁻¹. In solution with low phosphate concentration, the plants removed more As, because the phosphate and As, in the arseniate form, compete for the same absorption sites. As greater the concentration of As in the *L. gibba* tissues was, the smaller the total chlorophyll and carotenoid synthesis was, found by the chlorosis incidence. Also, *L. gibba*, showed reduction of the leaf sizes. However, the As in the leaves did not affect the synthesis of total chlorophyll and carotenoid in *A. caroliniana*. This specie presented purple leaves, containing high anthocyanin levels, which suggested a phosphate deficiency. *Salvinia minima* showed marginal necrosis, in flotation leaves and the plants were capable to reproduce, generating health daughter plants, free from any visual

symptoms. In the atrazine study, an herbicide that blocks the photosynthesis process, the three species had a reduction on the fresh and dry mass, that caused their deaths. The chlorosis and necrosis observed in the plants showed the sensitivity of the three species towards the herbicide. All plants showed low potential to remove atrazine from solution, when exposed to low concentrations of the herbicide. However, in the concentration of 10,0 mg L⁻¹ of atrazine, which caused the plants deaths, *L. gibba* and *A. caroliniana* demonstrated a good potential to remove the herbicide from the solution (0,016 and 0,018 mg gMF⁻¹, respectively). Probably, this potential is related to adsorption of atrazine from the dead tissues. The percentage of As and atrazine removed from the solution, for the studied plants, reduced when the plants were exposed to higher concentrations of the pollutants. The use of these species in the remediation of aquatic environments was limited, which required more accurated studies. Of the three species, *L. gibba* was the only arsenic hyperaccumulator plant, while *A. caroliniana*, *S. minima* and *L. gibba* were not efficient to remove atrazine from the solution.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas capazes de retirar contaminantes do meio é uma importante tecnologia a ser explorada para a descontaminação de áreas poluídas. Esta tecnologia, denominada fitorremediação, pode ser aplicada tanto para poluentes inorgânicos quanto orgânicos, presentes em substratos sólidos (solo), líquidos (água) ou gasosos (ar) (Cunningham e Ow, 1996; Schnoor, 1997; Salt *et al.*, 1998; Williams, 2002; Pilon-Smits e Pilon, 2002; Pilon-Smits, 2005). Esta técnica envolve vários processos dentre os quais a rizofiltração, que consiste na utilização do sistema radicular de plantas aquáticas com a finalidade de remover e remediar águas contaminadas por diversos poluentes.

Ainda são escassas as informações sobre o potencial das plantas de regiões tropicais e, sua utilização para esta tecnologia, o que torna promissor o seu uso, visto que em países temperados os resultados têm sido bastante satisfatórios (Cunningham e Ow, 1996; Pilon-Smits e Pilon, 2002; Axtell *et al.*, 2003; Pulford e Watson, 2003; Baldantoni *et al.*, 2004; Pilon-Smits, 2005). O Brasil possui inúmeras vantagens para implementar o uso desta técnica, visto que possui uma enorme diversidade de plantas a ser explorada cientificamente, além de ser privilegiado em alguns fatores ambientais tais como água, temperatura e luminosidade, os quais são adequados para um crescimento rápido das plantas.

Neste trabalho, foram estudados dois potentes poluentes ambientais: o arsênio e a atrazine. O arsênio é um poluente inorgânico presente, naturalmente, em áreas de mineração, enquanto a atrazine é um herbicida amplamente utilizado na agricultura brasileira. Ambos podem atingir os corpos d'água, causando inúmeros problemas para o homem, a flora e a fauna local. Portanto, torna-se de grande importância para o conhecimento científico e tecnológico a seleção e avaliação da eficiência das plantas aquáticas tropicais na remoção destes poluentes da água.

Para realização deste trabalho foram selecionadas e estudadas três espécies de macrófitas aquáticas que têm demonstrado grande potencial de remediação em ambientes contaminados: *Azolla caroliniana* Willd, *Salvinia minima* Baker e *Lemna gibba* Linnaeus (Jain *et al.*, 1990; Zayed *et al.*, 1998; Axtell *et al.*, 2003; Mkandawire *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2004; Mkandawire e Dudel, 2005). Dessa

forma, é válida a pesquisa para verificação do potencial dessas espécies na remediação de ambientes contaminados por arsênio e atrazine.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Axtell, N. R., Sternberg, S. P. K., e Claussen, K. 2003. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. *Bioresource Technology* 89:41-48.
- Baldantoni, D., Alfani, A., Di Tommasi, P., Bartoli, G., e De Santo, A. V. 2004. Assessment of macro and microelement accumulation capability of two aquatic plants. *Environmental Pollution* 130:149-156.
- Cunningham, S., e Ow, D. W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110:715-719.
- Hoffmann, T., Kutter, C., e Santamaría, J. 2004. Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Engineering in Life Sciences* 4:61-65.
- Jain, S. K., Vasudevan, P., e Jha, N. K. 1990. *Azolla pinnata* R.Br. and *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water. *Water Research* 24:177-183.
- Mkandawire, M., e Dudel, E. G. 2005. Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *The Science of the Total Environment* 336:81-89.
- Mkandawire, M., Lyubun, Y. V., Kosterin, P. V., e Dudel, E. G. 2004. Toxicity of arsenic species to *Lemna gibba* L. and the influence of phosphate on arsenic bioavailability. *Environmental Toxicology* 19:26-34.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 56:15-39.
- Pilon-Smits, E., e Pilon, M. 2002. Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Science* 21:439-456.
- Pulford, I. D., e Watson, C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environment International* 29:529-540.

- Salt, D. E., Smith, R. D., e Raskin, I. 1998. Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49:643-668.
- Schnoor, J. L. 1997. Phytoremediation. Techonology Evaluation Report TE-98-01:1-31.
- Williams, J. B. 2002. Phytoremediation in wetland ecosystems: progress, problems, and potencial. Critical Reviews in Plant Science 21:607-635.
- Zayed, A., Gowthaman, S., e Terry, N. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. Journal of Environmental Quality 27:715-721.

CAPÍTULO I

POTENCIAL DE MACRÓFITAS PARA REMOÇÃO DE ARSÊNIO EM SOLUÇÃO AQUOSA

1. INTRODUÇÃO

A poluição por metais pesados é um dos maiores problemas do mundo moderno, visto que os metais não são degradados por processos naturais, tornando-se necessária a sua remoção do meio ambiente (Jain e Ali, 2000; Garbisu e Alkorta, 2001; Lasat, 2002).

O uso de métodos físico-químicos para a descontaminação de ambientes aquáticos requer uma manutenção árdua e onerosa, principalmente de grandes volumes de água (Aksorn e Visoottiviseth, 2004). Dentre os processos de fitorremediação, a rizofiltração é um tipo específico dessa tecnologia que consiste na utilização do sistema radicular das plantas para a descontaminação de ambientes aquáticos poluídos. Este processo é bastante vantajoso, visto que as plantas aquáticas têm crescimento rápido, produzem muita biomassa e possuem um sistema radicular fibroso que propicia uma área maior de contato com o poluente. Além destas características, as plantas com potencial para remediação devem ser capazes de remover o poluente do meio, acumula-lo em seus tecidos e tolerar altas concentrações do mesmo (Dushenkov *et al.*, 1995; Cunningham e Ow, 1996; Schnoor, 1997; Pilon-Smits e Pilon, 2002; Tsao, 2003; Suresh e Ravishankar, 2004; Pilon-Smits, 2005). Dessa forma, o uso de plantas aquáticas apresenta-se como uma alternativa eficiente no seqüestro e remoção destes elementos do ambiente (Dushenkov *et al.*, 1995; Samecka-Cymerman e Kempers, 1996; Lytle *et al.*, 1998; Jain e Ali, 2000; Lasat, 2002; Kamal *et al.*, 2004; Aksorn e Visoottiviseth, 2004; Mkandawire e Dudel, 2005). No entanto, é importante levar-se em consideração a diminuição da produtividade das plantas crescidas em ambientes contaminados (Adler *et al.*, 2003) e, a possibilidade da entrada destes elementos tóxicos ao longo da cadeia trófica (Samecka-Cymerman e Kempers, 1996).

Dentre os diversos contaminantes inorgânicos, o arsênio (As) tem recebido grande atenção das autoridades governamentais e da sociedade civil, em virtude do seu potencial tóxico para a saúde do homem, podendo causar vômitos, dores abdominais, diarreia, desidratação, doença de pele, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, conjuntivite, distúrbio no sistema nervoso central, câncer de pele, gangrena, dentre outros (Graeme e Pollack, 1998; Barra *et al.*, 2000; Jain e Ali, 2000; Matschullat *et al.*, 2000; Misbahuddin e Fariduddin, 2002).

O As existe no ambiente em diversas formas e valências, tais como arseniato (+5), arsenito (+3), arsina (-3), além da sua forma elementar. O estado de oxidação do As é extremamente importante na expressão do seu comportamento e toxicidade nos sistemas aquáticos (Jain e Ali, 2000; Sakuma *et al.*, 2003).

Cerca de 60% do As liberado no meio é de origem natural, destacando-se as erupções vulcânicas e a lixiviação de rochas ricas em As (Barra *et al.*, 2000; Jain e Ali, 2000; Matschullat *et al.*, 2000; Sakuma *et al.*, 2003), além dos rejeitos de mineração, visto que esse metalóide é encontrado associado a minérios de ouro, prata, cobalto, níquel, chumbo, cobre e antimônio (Matschullat *et al.*, 2000; Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). O As, também é utilizado na produção de vidros, ligas não ferrosas, produtos eletrônicos, conservação de madeiras e pesticidas (Barra *et al.*, 2000; Jain e Ali, 2000; Sakuma *et al.*, 2003).

A Resolução 357, de 17 de março de 2005 (Conama, 2005), estabelece limites entre 0,01 mg L⁻¹ a 0,14 mg L⁻¹ de As em água, dependendo do seu tipo de uso. Essa resolução também estabelece o limite máximo de 0,5 mg L⁻¹ de As em efluentes. Apesar disso, existem muitas áreas contaminadas, especialmente pelos rejeitos de mineração, que causam sérios prejuízos ambientais (Grimalt *et al.*, 1999; Deschamps *et al.*, 2002).

A tecnologia de fitorremediação, especialmente a rizofiltração, tem estimulado muitos pesquisadores a investigar o potencial de diferentes espécies vegetais aquáticas, na remoção de elementos tóxicos tais como: boro (B), cromo (Cr), cobre (Cu), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), níquel (Ni), selênio (Se) e arsênio (As), em corpos d'água (Zayed *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1999).

A absorção de elementos metálicos, pelas células das plantas, é facilitada por mecanismos que envolvem proteínas transportadoras (Lasat, 2002). Devido a similaridade estrutural entre arseniato e fosfato, o As (+5) é absorvido pelas plantas pelo mesmo sítio de absorção do fosfato (Graeme e Pollack, 1998; Dembitsky e Rezanka, 2003; Aksorn e Visoottiviseth, 2004; Mkandawire e Dudel, 2005). O transporte é feito de forma simpórtica com prótons H⁺ (Raghothama, 1999; 2000).

Neste trabalho, foram utilizadas três espécies de macrófitas aquáticas: *Azolla caroliniana* Willd, *Salvinia minima* Baker e *Lemna gibba* Linnaeus, as quais, segundo a literatura, têm demonstrado potencial para remediação de ambientes aquáticos impactados (Jain *et al.*, 1990; Outridge e Hutchinson, 1991; Outridge *et al.*, 1991; Zayed *et al.*, 1998; Axtell *et al.*, 2003; Mkandawire *et al.*, 2005; Mkandawire e Dudel, 2005).

Azolla caroliniana é uma pteridófita aquática, flutuante, de pequeno porte. Apresenta raízes finas, em pequena quantidade e folhas bilobadas que se sobrepõem. Nos lobos foliares inferiores da planta se alojam colônias de cianobactérias do gênero *Anabaena*, importantes fixadoras de nitrogênio atmosférico. *A. caroliniana* é amplamente distribuída nos trópicos e na região das Américas, especialmente em águas paradas. Possui um crescimento rápido, justificando seu uso em pesquisas de fitorremediação (Tryon e Tryon, 1982).

Salvinia minima, também é uma pteridófita aquática flutuante. Os ramos consistem de duas folhas flutuantes opostas, unidas por um caule central (rizoma), sendo que a terceira folha submersa é modificada, formando um sistema semelhante a uma raiz. Cada indivíduo pode se conectar a novos e/ou velhos indivíduos pelos rizomas apicais, formando extensos tapetes. É uma planta que possui um crescimento rápido e, pode ser encontrada em lagos ou rios de várias partes do mundo (Tryon e Tryon, 1982).

Lemna gibba é uma monocotiledônea aquática, flutuante, de pequeno porte. É uma planta de crescimento rápido, amplamente distribuída em diferentes regiões e que se adapta facilmente a condições aquáticas diversas, além de desempenhar um importante papel na remoção e acumulação de metais em ambientes aquáticos (Zayed *et al.*, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dessas três espécies de macrófitas na remoção e acumulação de *As*, identificando suas possibilidades de uso em estudos de remediação de ambientes contaminados por *As*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das plantas

Exemplares das macrófitas aquáticas flutuantes *A. caroliniana*, *S. minima* e *L. gibba* foram coletados em tanques do Horto Botânico pertencente ao Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (DBV/UFV), Viçosa, MG, em janeiro de 2005.

Após desinfecção em solução de hipoclorito de sódio 1%, as plantas foram lavadas em água deionizada, e cultivadas em casa de vegetação em bandejas plásticas contendo solução de Hoagland ($\frac{1}{4}$ força iônica), com pH 6,5 (Hoagland e Arnon, 1950). As plantas utilizadas nos experimentos tiveram origem a partir de duas plantas-mãe, o que resultou em variações genótípicas e pré-experimentais mínimas, conforme recomendação de Outridge e Hutchinson (1991).

2.2. Análise de crescimento

Foi avaliado o crescimento das três espécies de macrófitas em solução de Hoagland ($\frac{1}{4}$) durante 10 dias. Foram utilizados 0,5 g de massa fresca de cada espécie, em 25 vasos pretos, contendo 500 mL de solução de Hoagland ($\frac{1}{4}$). A cada dois dias, 5 vasos foram recolhidos e as plantas levadas à estufa a 70°C até obtenção de massa seca constante. Os dados obtidos de massa seca foram usados para análise de crescimento das plantas, em condições de casa de vegetação. Este ensaio, teve como objetivo verificar a capacidade de crescimento das plantas, visto que o crescimento rápido e produção de biomassa em curto intervalo de tempo são pré-requisitos para a seleção e utilização de plantas em estudos de fitorremediação,

2.3. Exposição das plantas ao As

As três espécies de macrófitas foram expostas ao As na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Isofar). Cada espécie (1,5 g de massa fresca por unidade amostral) foi tratada com as seguintes concentrações de As: 0; 0,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ e cinco repetições As plantas foram cultivadas em vasos pretos contendo 1500 mL de

solução de Hoagland ($\frac{1}{4}$ força iônica), em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP-DBV). *S. minima* e *L. gibba* foram expostas ao As por 6 dias *A. caroliniana* por 5 dias. A temperatura mínima da casa de vegetação foi de 17°C e a máxima de 38°C.

O pH foi corrigido para 6,5, a cada dois dias, e o volume de água completado, diariamente, com água deionizada, a fim de compensar a perda de água por transpiração e evaporação (Aksorn e Visoottiviseth, 2004).

As plantas foram pesadas a cada dois dias, para obtenção da massa fresca, sendo retiradas dos vasos com o auxílio de uma peneira e secas em papel toalha, sendo posteriormente devolvidas aos receptivos vasos, com auxílio de peneira e pinças.

Ao final do experimento, as plantas foram lavadas com solução de ácido nítrico 1%, para remoção do As adsorvido na superfície das mesmas. Posteriormente, estas plantas foram secadas em estufa a 70°C, até obtenção de massa seca constante. A massa seca foi utilizada para análise de crescimento e para determinação de As absorvido do meio. A massa seca inicial foi calculada a partir da média obtida de 5 repetições, cada uma contendo 1,5 g de massa fresca por espécie (Cedergreen *et al.*, 2004).

Os vasos plásticos, utilizados no experimento, foram forrados com sacos plásticos de polietileno, a fim de evitar a contaminação dos vasos e facilitar o armazenamento dos resíduos, para posterior descarte em aterro especializado.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo feito diariamente o rodízio dos vasos.

2.4. Absorção de arseniato em diferentes concentrações de fosfato

Cada uma das três espécies, 1,0 g de massa fresca por unidade amostral, foi exposta à concentração constante de As equivalente a $0,032 \mu\text{mol L}^{-1}$ e, a seis concentrações de fosfato: 0,008; 0,016; 0,031; 0,062; 0,125; $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$. Foram utilizadas três repetições para cada tratamento.

As plantas foram aclimatadas, nas diferentes concentrações de fosfato, durante dois dias. Posteriormente, as soluções foram trocadas, mantendo-se as mesmas concentrações de fosfato anteriores, e o As adicionado ao meio. Após 24 horas, as plantas foram secadas em estufa a 70°C para obtenção de massa seca e determinação de As.

2.5. Determinação de As nas plantas

As plantas secas e inteiras foram digeridas em solução nitro-perclórica (1:4, v/v,) até as amostras se tornarem transparentes, tendo-se o cuidado para que a temperatura não ultrapassasse 100°C, evitando-se, dessa forma, a volatilização do As (Samecka-Cymerman e Kempers, 1996; Zayed *et al.*, 1998; Hartley-Whitaker *et al.*, 2001; Aksorn e Visoottiviseth, 2004; Sivaci *et al.*, 2004). Posteriormente, as amostras foram filtradas e diluídas em 25mL de água destilada.

A concentração de As total, absorvida pelas plantas, foi feita utilizando-se Espectrometria de Absorção Atômica (AAS 220 FS, Varian Austrália), do Departamento de Solos da UFV. Para a determinação de As foi utilizado um comprimento de onda igual a 193,7 nm e abertura da fenda de 0,5 nm.

2.6. Eficiência de remoção de As

A eficiência de remoção de As, em solução, foi calculado pela porcentagem de As removido pelas plantas. A quantidade de As presente em solução foi considerada 100%. A concentração de As absorvido pelas plantas (mg gMS^{-1}) foi multiplicado pela quantidade de massa seca produzida durante o período de exposição ao metalóide, obtendo-se, portanto a quantidade real de As removido da solução. Dessa forma, foi calculado o percentual de As que as plantas removeram do meio.

2.7. Determinação do teor de clorofila total e carotenóides

O teor de clorofila total e carotenóides foram determinados em 0,5 g de massa fresca de *A. caroliniana* e *L. gibba* nas diferentes concentrações de As e no grupo de plantas controle. A extração foi feita utilizando-se acetona (80%) e uma pitada de

CaCO₃ (Lichthenthaler, 1987). A leitura da absorbância foi feita, utilizando-se Espectrofotômetro UV Visível (UVmini-1240, Shimadzu, Japão) nos seguintes comprimentos de onda: 470, 646,8 e 663,2 nm. O teor de clorofila total e carotenóides foram determinados através de fórmulas propostas por Lichthenthaler (1987). Plantas de *S. minima* não foram utilizadas neste experimento devido a problemas de cultivo desta espécie.

2.8. Determinação do teor de antocianina

O teor de antocianina foi determinado em *A. caroliniana* expostas a diferentes concentrações de As. A antocianina foi extraída a partir de 1 g de massa fresca, com 15 mL de etanol acidificado com HCl (Kamperidou e Vasilakakis, 2006). As amostras foram deixadas em geladeira por 14 horas. A absorbância dos extratos foi medida utilizando-se um Espectrofotômetro UV Visível (UVmini-1240, Shimadzu, Japão), e em comprimento de onda igual a 512 nm. Esta determinação foi utilizada apenas para esta espécie, devido ao arroxamento apresentado pela planta quando exposta ao As.

2.9. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA), ao nível de 5% de probabilidade, para verificar se os tratamentos tiveram influência na absorção de As e no ganho de massa fresca e seca das espécies. Foram testadas a normalidade e a homogeneidade das variâncias, como pressupostos para realização da ANOVA. Posteriormente, foi realizado o Teste de Tukey, a fim de diferenciar os tratamentos.

2.9. Sintomatologia visual das plantas expostas ao As

O registro fotográfico da sintomatologia das plantas, expostas as diferentes concentrações de As, foi feito utilizando-se uma câmera digital (Sony DSC-S60). Também foi utilizado um microscópio estereoscópico (Olympus, Micronal VM VMT, Brasil) para evidenciar as injúrias ocorridas nas macrófitas estudadas.

2.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os danos causados a parte aérea de *A. caroliniana* e *L. gibba* expostas à concentração de 5,0 mg L⁻¹ de As e das plantas controle foram analisados com auxílio da microscopia eletrônica de varredura. As plantas foram fixadas em glutaraldeído (5%), pós-fixadas em tetróxido de ósmio (2%) e, após sucessivas lavagens, foram desidratadas em série etanólica. As amostras foram submetidas ao processo de desidratação utilizando-se um aparelho de ponto crítico (CPD-030, Baltec, Alemanha). Posteriormente, as amostras foram montadas em “stubs” e metalizadas em equipamento de metalização modelo FDU-010, Balzers, Alemanha, acoplado a um conjunto de pulverização catódico, modelo SCA-010. O material foi observado em um microscópio eletrônico modelo LEO 1430 VP (Zeiss, Alemanha), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

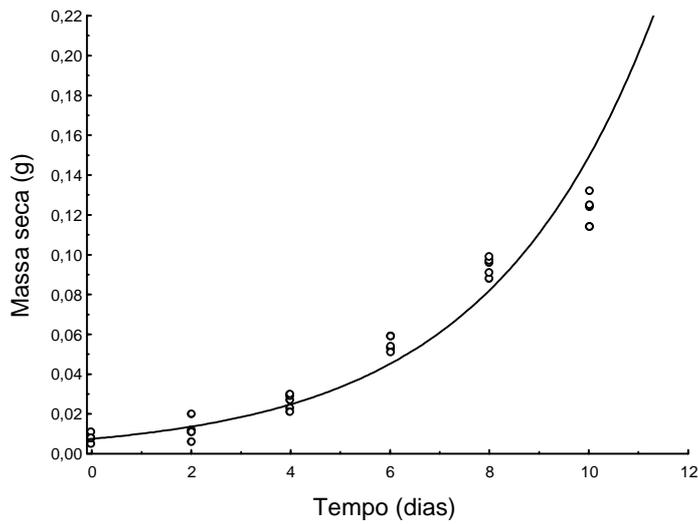
3. RESULTADOS

3.1. Avaliação do crescimento das plantas

As macrófitas *A. caroliniana*, *L. gibba* e *S. minima* apresentaram crescimento exponencial quando foram cultivadas em solução de Hoagland ($\frac{1}{4}$ de força), em casa de vegetação, durante um período de dez dias (Figura 1).

3.2. Ganho de massa fresca

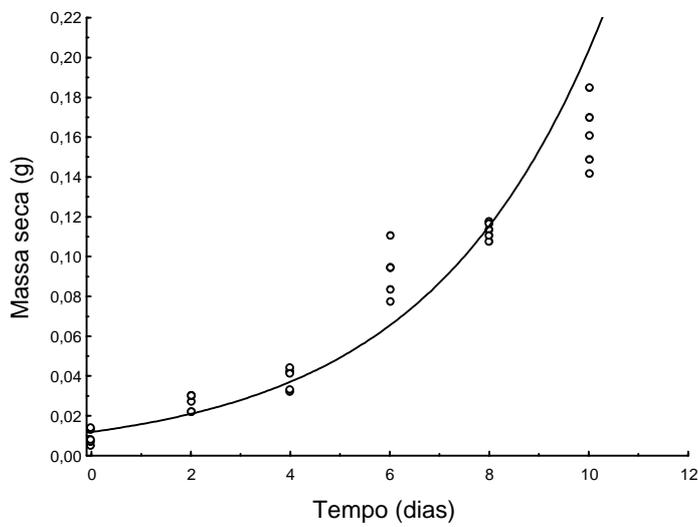
A massa fresca das macrófitas, expostas as diferentes concentrações de As aumentou ao longo do período experimental, apresentando crescimento exponencial para todas as concentrações de As. No entanto, à medida que a concentração de As em solução aumentou, o crescimento das plantas foi reduzido (Figura 2). *S. minima*, quando exposta a solução de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de As, não apresentou crescimento, ao contrário das demais espécies. *A. caroliniana* exposta a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de As apresentou crescimento igual ao grupo controle, não sendo possível a distinção das respectivas curvas no gráfico (Figura 2).



A. caroliniana

$$Y=0,0075*\exp(0,2987*x)$$

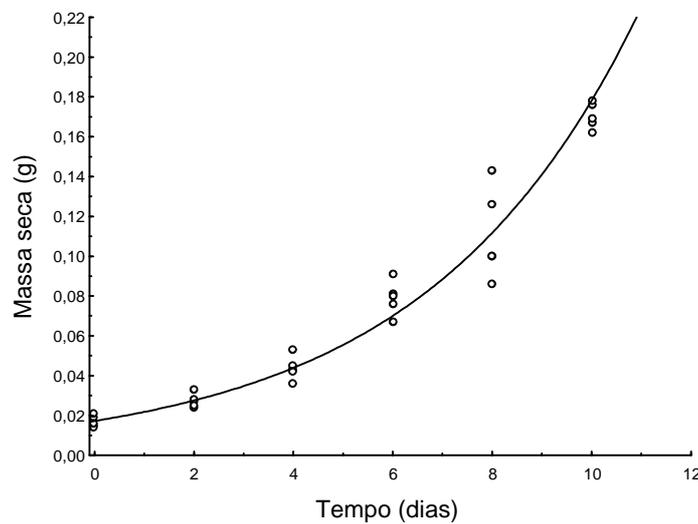
$$R=0,9635; p<0$$



S. minima

$$Y=0,0119*\exp(0,2836*x)$$

$$R=0,9667; p<0$$



L. gibba

$$Y=0,0173*\exp(0,2334*x)$$

$$R=0,9492; p<0$$

Figura 1: Crescimento exponencial das macrófitas estudadas, em solução nutritiva, durante dez dias. Os pontos (o) representam as repetições.

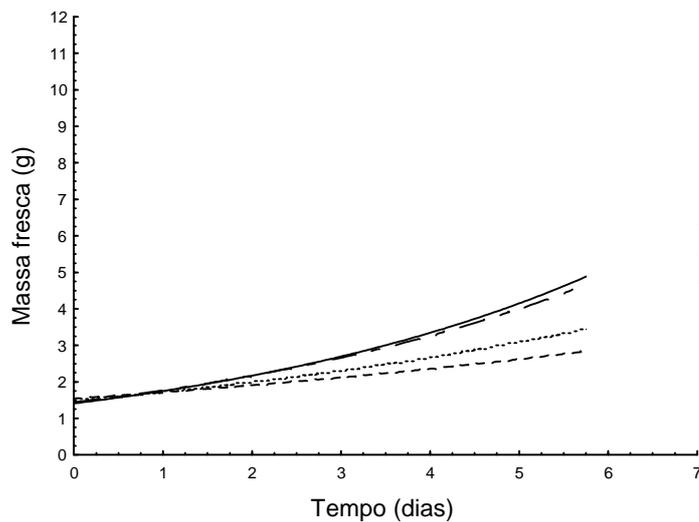
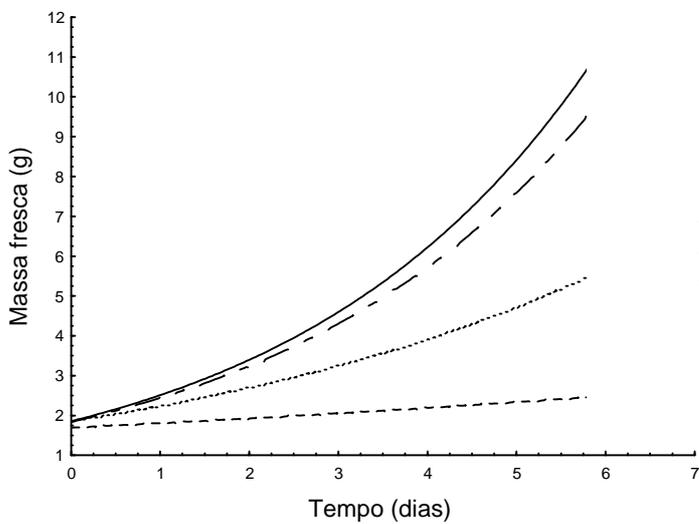
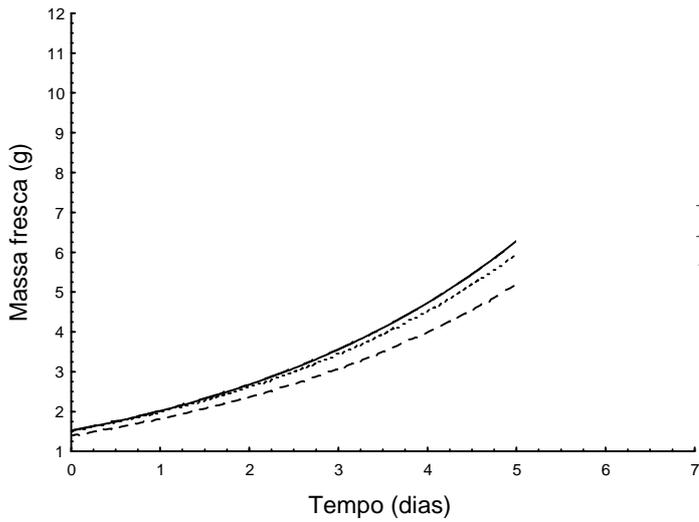


Figura 2: Ganho de massa fresca das macrófitas expostas a diferentes concentrações de As, ao longo do período experimental.

3.3. Ganho de massa seca

O ganho médio de massa seca de cada espécie foi calculado pela quantidade de massa seca produzida por dia. A concentração de *As*, em solução, influenciou o ganho de massa seca das macrófitas, de acordo com a análise de variância (graus de liberdade=3) e Teste de Tukey. Quanto maior a concentração de *As*, menor o ganho de massa seca de *A. caroliniana* ($F=5,88$; $p=0,006618$), *S. minima* ($F=80,719$; $p=0$) e *L. gibba* ($F=60,541$; $p=0$).

Azolla caroliniana, quando exposta a 0,5 e 2,5 mg L⁻¹ de *As*, em solução, obteve em média, ganho de 0,033 e 0,031 g de massa seca por dia. Esse valor foi equivalente aos 0,033 g dia⁻¹ de massa seca obtidos pelas plantas controle. Tais valores foram superiores aos 0,030 g dia⁻¹ obtidos pelas plantas expostas a concentração de 5,0 mg L⁻¹ de *As* (Figura 3).

Salvinia minima ganhou em média 0,031 g de massa seca por dia, quando exposta a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de *As*, em solução, valor equivalente ao obtido pelas plantas controle (0,031 g dia⁻¹). Nas soluções de concentrações de *As* 2,5 e 5,0 mg L⁻¹, *S. minima* ganhou em média 0,018 e 0,002 g dia⁻¹ de massa seca, respectivamente, valores esses inferiores aqueles obtidos pelas demais plantas (Figura 3).

Lemna gibba apresentou o mesmo padrão de crescimento de *S. minima*, em termos de diminuição do ganho de massa seca. Esta espécie obteve em média ganho de 0,023; 0,020; 0,010 e 0,002 gMS dia⁻¹, nos seguintes tratamentos: 0,0, 0,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de *As*, em solução, respectivamente (Figura 3).

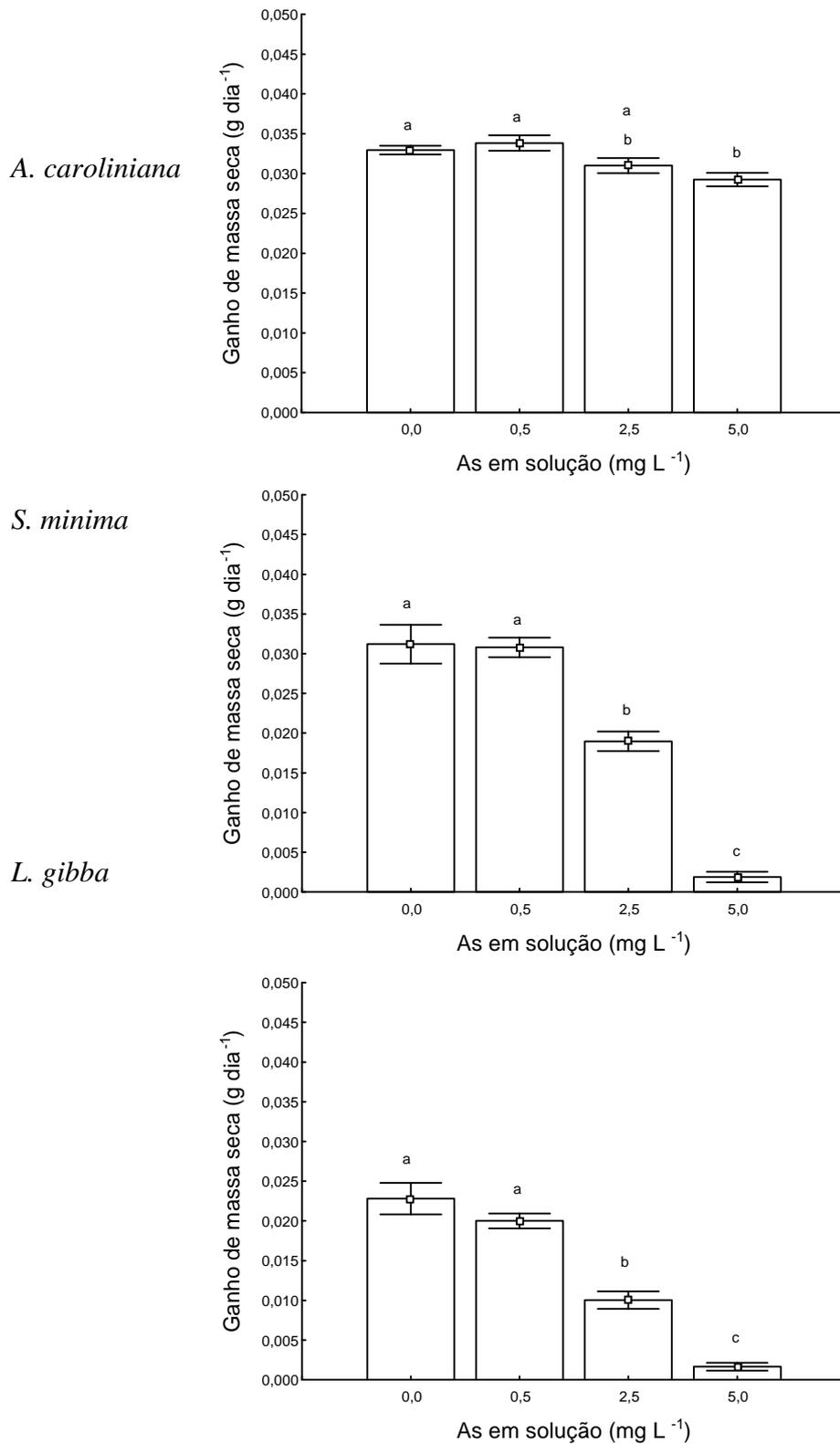


Figura 3: Ganho de massa seca em diferentes concentrações de As. Os pontos (\bar{x}) representam as médias e as barras (\pm) representam o erro padrão. Letras diferentes, na mesma figura, representam médias diferentes de acordo com Teste de Tukey.

3.4. Acúmulo de arsênio

O resultado do acúmulo de As nas plantas demonstrou que, quanto maior a concentração de As, em solução, maior a concentração encontrada do metalóide nas espécies: *A. caroliniana* (Anova; gl=3; F=38,832; p<0), *S. minima* (Anova; gl=3; F=20,353; p=0,00001) e *L. gibba* (Anova; gl=3; F=664,173; p<0), como mostrado na Figura 4.

Azolla caroliniana acumulou em média 0,065; 0,122 e 0,130 mg gMS⁻¹, nos tratamentos de 0,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹, respectivamente. No entanto, não houve diferença na absorção de As nos tratamentos de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de As (Figura 4).

Salvinia minima apresentou potencial semelhante a *A. caroliniana*, em termos de remoção de As, acumulando em média 0,061; 0,083; 0,200 mg gMS⁻¹, nos tratamentos de 0,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹, respectivamente. Esta espécie apresentou o mesmo potencial de remoção de As quando expostas as concentrações de 0,5 e 2,5 mg L⁻¹ (Figura 4).

Quanto maior a concentração de As, em solução, maior foi o acúmulo de As nas plantas de *L. gibba*. Essa espécie acumulou, em média, 0,142; 0,767; 1,397 mg gMS⁻¹, nos tratamentos de 0,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 4).

Lemna gibba apresentou maior potencial de remoção de As em solução quando comparada com as demais espécies. *A. caroliniana* absorveu mais As que *S. minima* nos tratamentos de 0,5 e 2,5 mg L⁻¹, no entanto, foi menos eficiente quando submetida ao tratamento de maior concentração de As (5,0 mg L⁻¹).

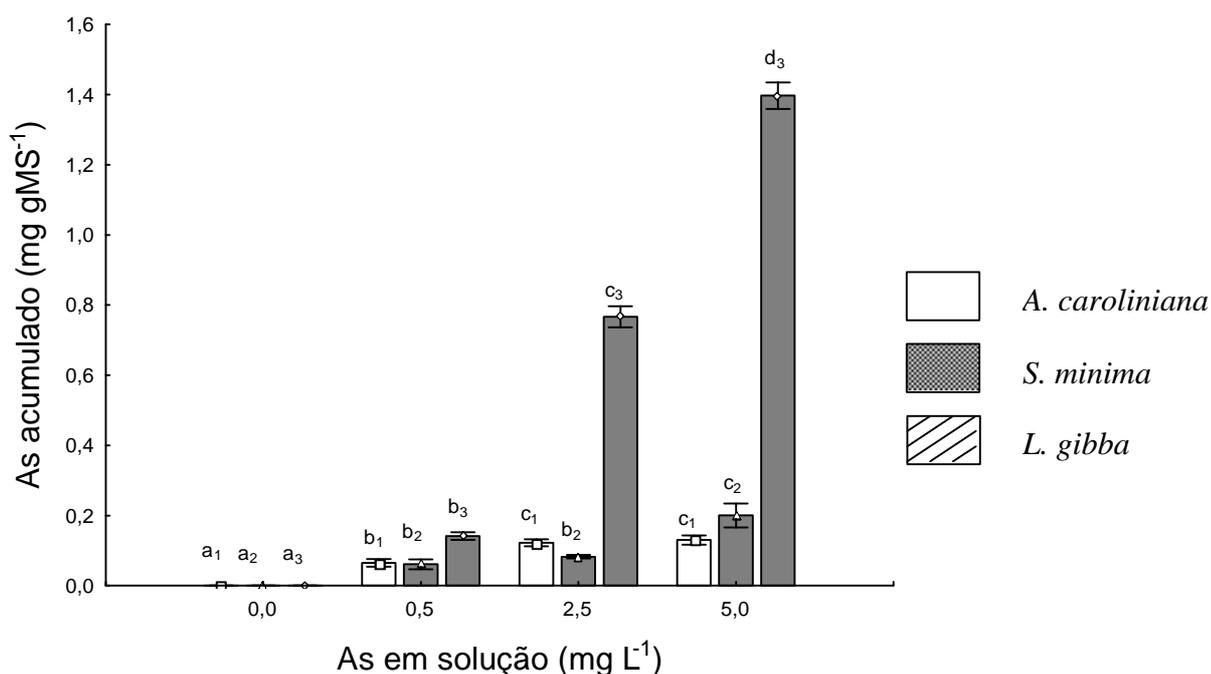


Figura 4: Concentração de As acumulado pelas macrófitas estudadas, nos diferentes tratamentos. Os pontos (\bar{x}) representam as médias e as barras (\perp) representam o erro padrão. Letras diferentes representam médias diferentes (Teste de Tukey). Os índices representam cada espécie: 1-*A. caroliniana*; 2-*S. minima*; 3-*L. gibba*.

3.5. Eficiência na remoção de arsênio da solução

Em termos da eficiência de remoção de As da solução, ou seja, porcentagem de As que as espécies foram capazes de remover do meio, foi observado uma diminuição na eficiência das plantas, com o aumento da disponibilidade de As no meio, de acordo com a Anova, com 2 graus de liberdade (*A. caroliniana*, $F=21,630$; $p=0,000105$; *S. minima*, $F=14,367$; $p=0,000653$ e *L. gibba*, $F=27,955$; $p=0,00003$).

As três espécies demonstraram eficiência para a remoção de As, em solução, quando foram expostas a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, sendo que *L. gibba* apresentou o melhor potencial removendo 4,41% de As presente no meio. Em se tratando de *A. caroliniana* e *S. minima*, essas foram semelhantes, removendo 2,15 % e 2,24% de As em solução, respectivamente, para a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 5).

Lemna gibba apresentou maior eficiência de remoção de As que as demais espécies, para as três concentrações de As estudadas.

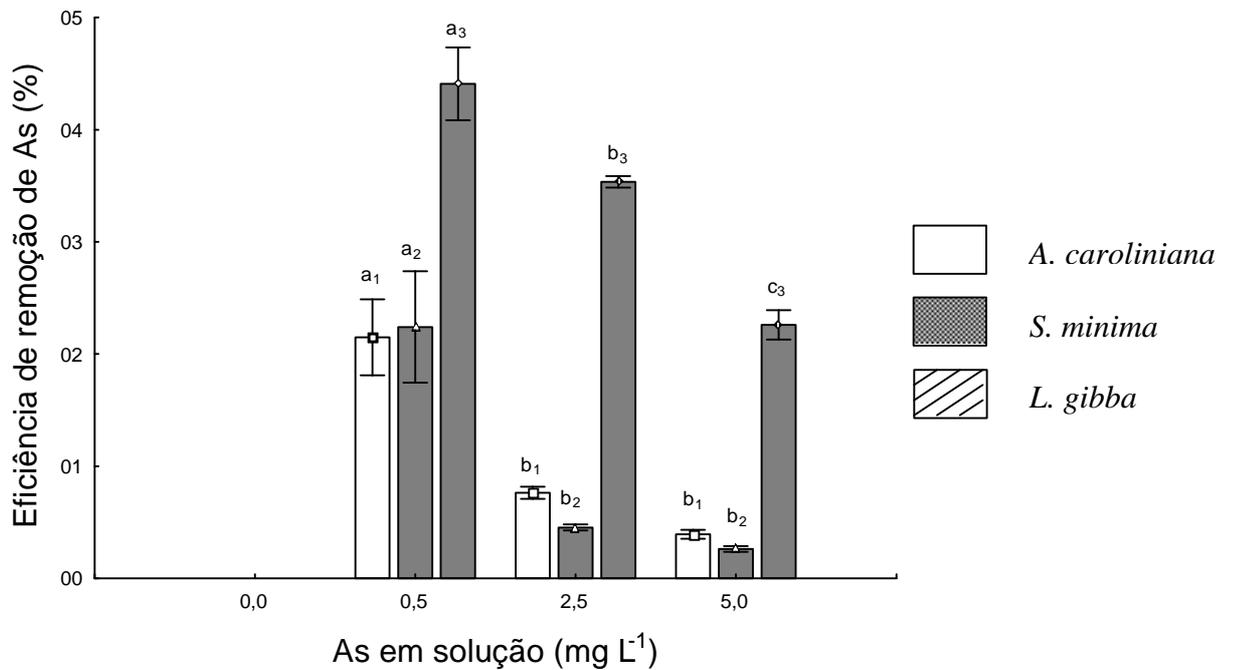


Figura 5: Eficiência de remoção de As (%) da solução, para os diferentes tratamentos. Os pontos (\bar{x}) representam as médias e as barras (\perp) representam o erro padrão. Letras diferentes representam médias diferentes (Teste de Tukey). Os índices representam cada espécie: 1-*A. caroliniana*; 2- *S. minima*; 3- *L. gibba*.

3.7. Competição arseniato e fosfato

Quanto maior a concentração de fosfato (PO_4^{3-}) em solução, menor a absorção de As pelas macrófitas. A curva obtida seguiu um padrão exponencial negativo, para as três espécies estudadas (Figura 6).

A. caroliniana e *S. minima*, apresentaram decréscimo na absorção de As, com o aumento da concentração de fosfato, em solução. *L. gibba* apresentou o mesmo padrão de absorção de As, no entanto, removeu As da solução mesmo quando exposta a $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato, superando o potencial de *A. caroliniana* e *S. minima*.

A absorção de As por *L. gibba* foi, aproximadamente, 10 vezes maior quando exposta a concentração de $0,008 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato, do que a concentração de $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$, a qual foi utilizada como padrão em todos os experimentos deste trabalho.

A. caroliniana e *S. minima* removeram, respectivamente, 12 e 6 vezes mais As da solução, quando expostas a solução de $0,008 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato, do que quando foram expostas em solução com concentração de arseniato igual a de fosfato ($0,031 \mu\text{mol L}^{-1}$).

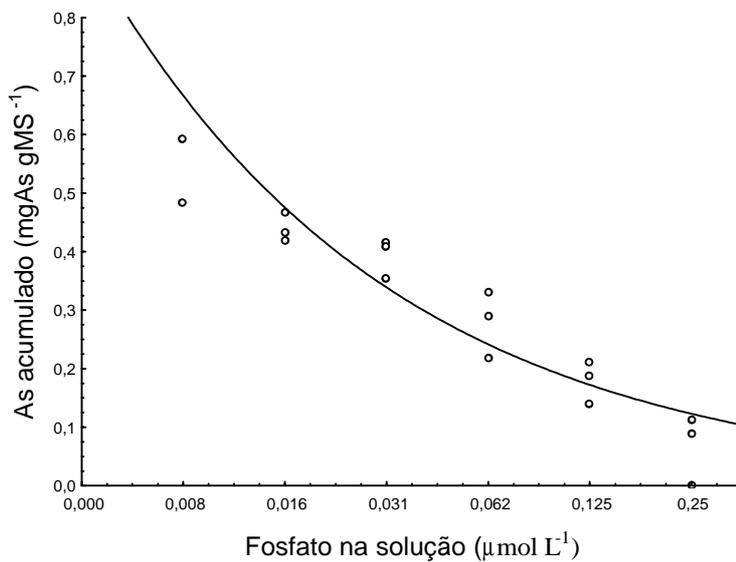
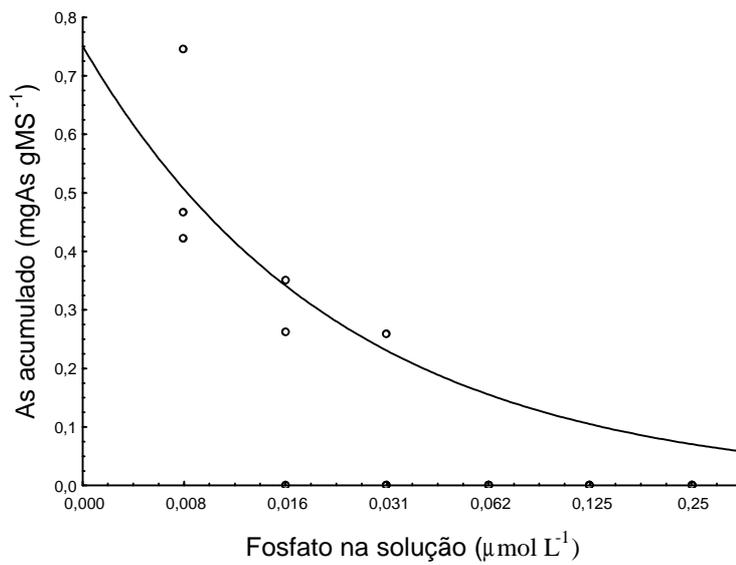
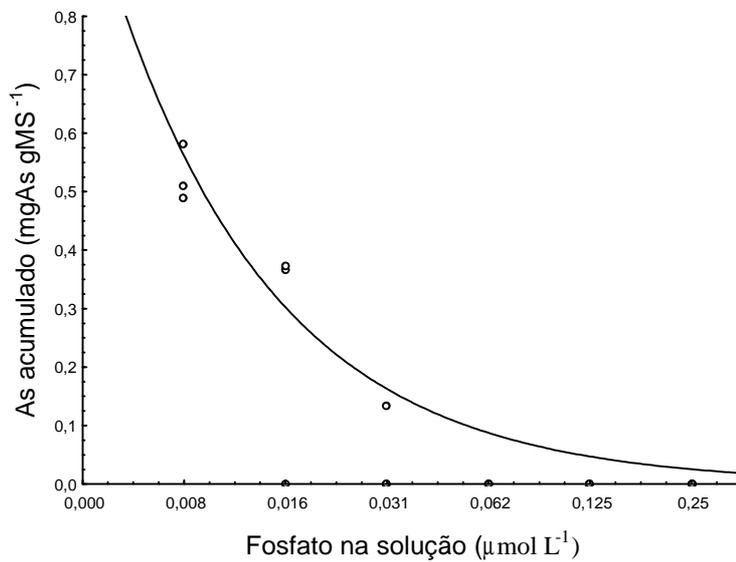


Figura 6: Absorção de As pelas macrófitas estudadas, em diferentes concentrações de fosfato. Os pontos (o) representam as repetições.

3.6. Teor de clorofila total, carotenóides e antocianina

A presença de As, em solução, não alterou os teores de clorofila total e carotenóides em *A. caroliniana*, de acordo com a análise de variância, com 3 graus de liberdade (clorofila: $F=1,9$; $p=0,202$; carotenóides: $F=2,326$; $p=0,151$), como mostrado na Figura 7. Entretanto, a presença de As em solução, influenciou o teor de antocianina nesta espécie (Anova, $gl=3$; $F=6,05$; $p=0,019$). *A. caroliniana* quando exposta a solução de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de As apresentou densidade ótica (DO), em média $0,226$ a 512 nm por grama de massa fresca. Este valor foi superior aos $0,187$; $0,197$ e $0,202 \text{ DO gMF}^{-1}$ apresentado pelas plantas controle, e também para as plantas expostas a $0,5$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente (Figura 8).

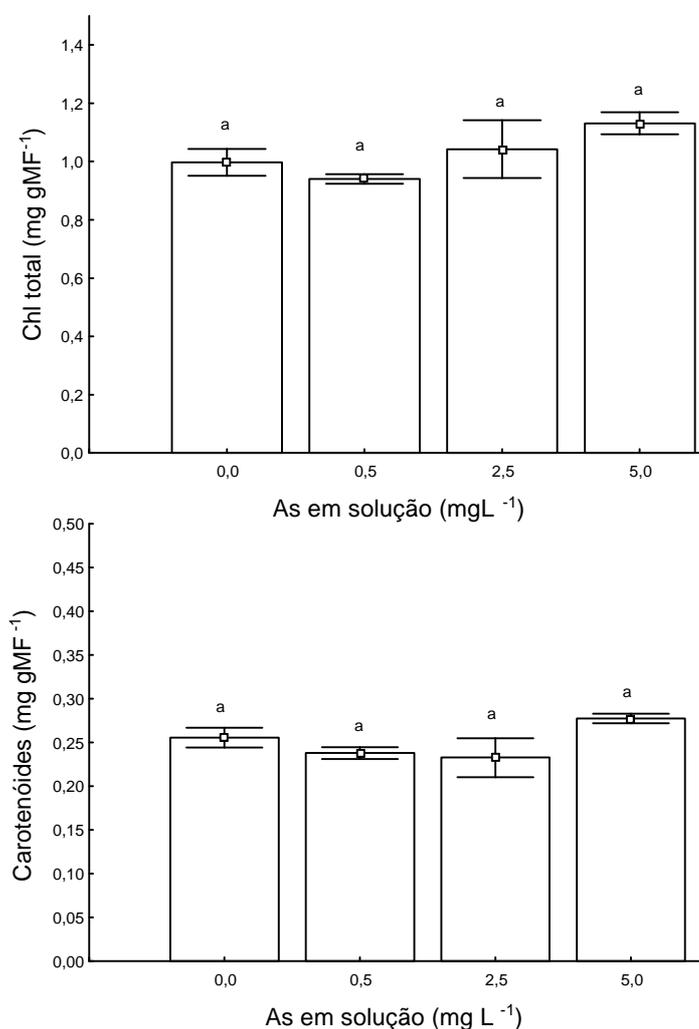


Figura 7: Teor de clorofila total e carotenóides em *A. caroliniana* exposta a diferentes concentrações de As. Os pontos (\bar{x}) representam as médias e as barras (\perp) representam o erro padrão.

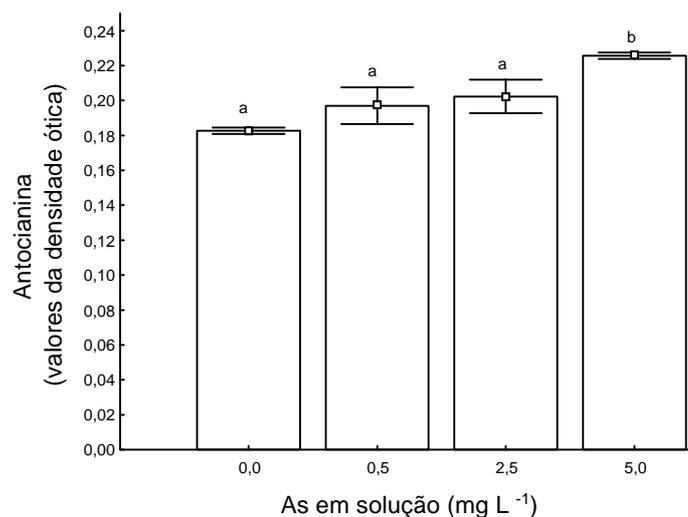


Figura 8: Teor de antocianina em *A. caroliniana* exposta a diferentes concentrações de As. Os pontos (\bar{x}) representam as médias e as barras (\perp) representam o erro padrão. Letras diferentes representam médias diferentes (Teste de Tukey).

Os teores de clorofila total e de carotenóides de *L. gibba* foram influenciados pela presença de As, em solução (clorofila: Anova, gl=3; F= 13,3764 ; p=0,002 ; carotenóides: Anova, gl=3; F= 12,138; p=0,002). Quanto maior a concentração de As, em solução, menor o teor de clorofila em *L. gibba* (Figura 9). As plantas expostas às concentrações de 0,5 e 2,5 mg L⁻¹ de As apresentaram em média 1,031 e 0,756 mgChl gMF⁻¹. Tais valores são semelhantes aos 0,806 g MF⁻¹ obtidos pelas plantas controle. As plantas expostas a 5,0 mg L⁻¹ de As obtiveram em média 0,522 mgChl MF⁻¹, menor que os demais tratamentos.

O teor de carotenóides em *L. gibba*, também diminuiu com o aumento da concentração de As em solução (Figura 9). As plantas controles e aquelas expostas a 0,5 e 2,5 mg L⁻¹ de As apresentaram 0,219; 0,287 e 0,233 mg carotenóides por grama de massa fresca, respectivamente. Esses valores foram considerados iguais, e superiores aos 0,141mg g MF⁻¹ obtidos pelas plantas expostas a 5,0 mg L⁻¹ de As.

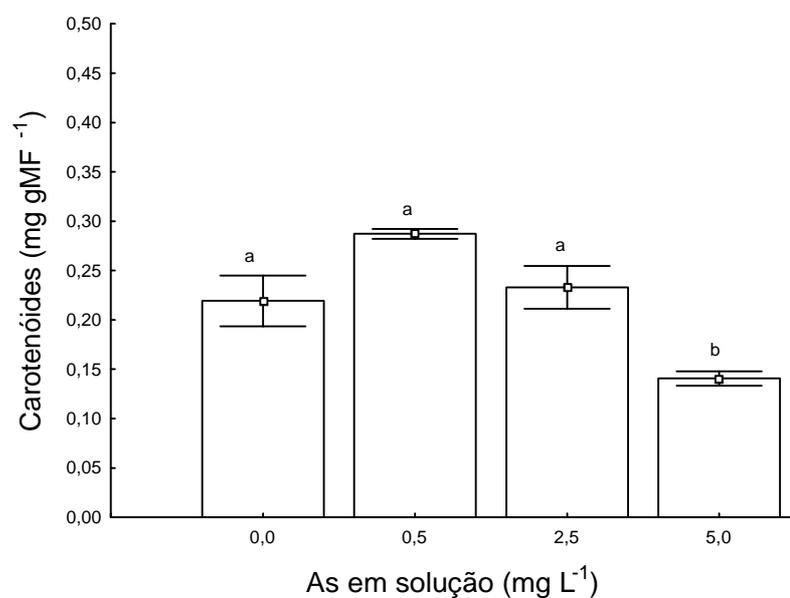
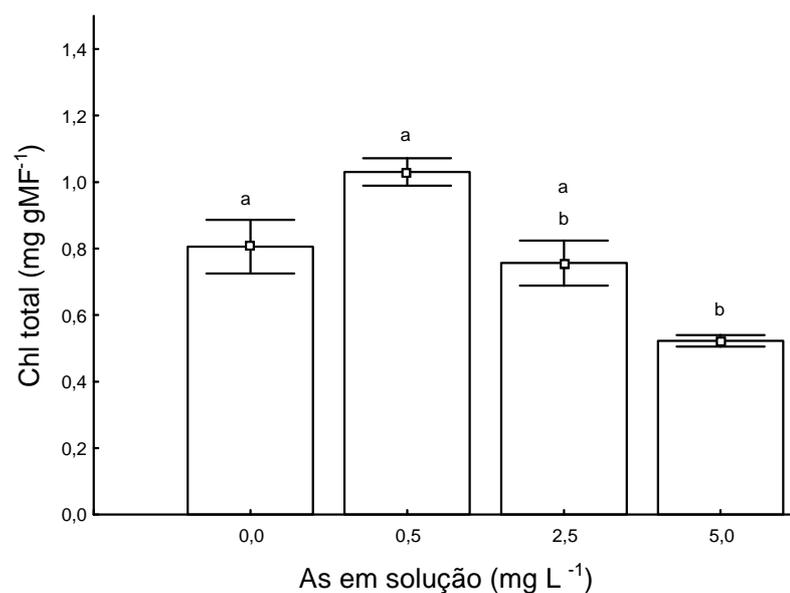


Figura 9: Teor de clorofila total e carotenóides em *L. gibba* exposta a diferentes concentrações de As. Os pontos (◻) representam as médias e as barras (⊥) representam o erro padrão. Letras diferentes, na mesma figura, representam médias diferentes (Teste de Tukey).

3.8. Sintomatologia

As macrófitas aquáticas apresentaram sintomas de toxicidade para o metalóide, quando expostas as concentrações de 2,5 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ de As. *A. caroliniana* apresentou as extremidades das folhas arroxeadas, a partir do terceiro dia de exposição. *S. minima* apresentou necroses marginais nas folhas flutuantes, entretanto, foram capazes de reproduzir e liberar plantas-filhas, livres de quaisquer sintomas visuais. *L. gibba* apresentou redução no tamanho das folhas e aumento da incidência de plantas cloróticas, por vaso (Figura 10).

Em nível ultraestrutural, as plantas de *A. caroliniana*, quando expostas a concentração de 5,0 mg L⁻¹ de As apresentaram folíolos com células epidérmicas desorganizadas e plasmolisadas, o que tornou os bordos dos folíolos enrolados. Não foi visualizada nenhuma colônia de cianobactéria simbiótica alojada nos folíolos. A ultraestrutura de *L. gibba*, tratada com 5,0 mg L⁻¹ de As, evidenciou uma epiderme com células desorganizadas e plasmolisadas, e grande quantidade de cera removida nas superfícies adaxial e abaxial. A maioria dos estômatos, presentes na face adaxial, permaneceram fechados, ao contrário do que foi observado em plantas controle (Figura 11).

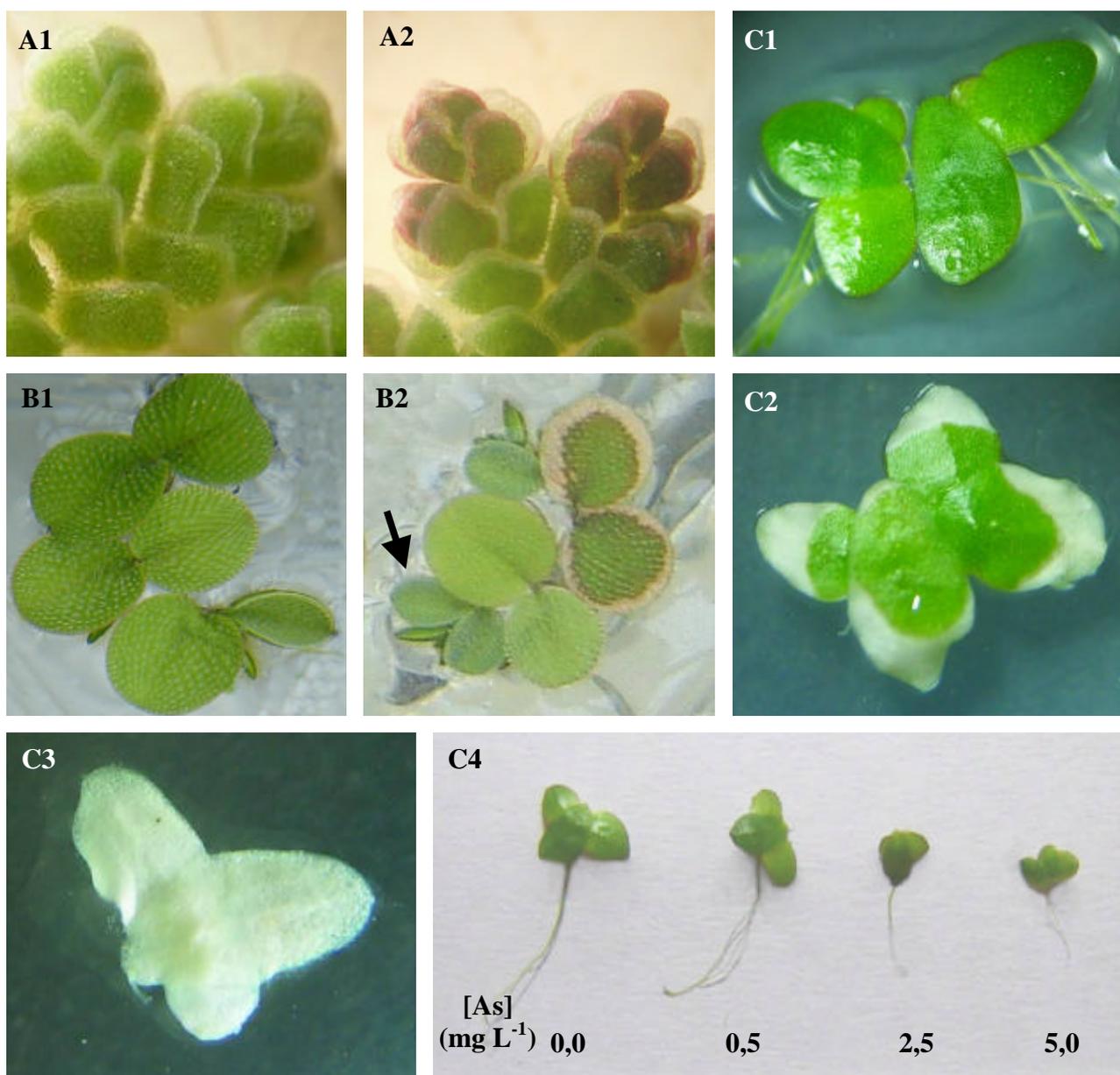


Figura 10: Sintomatologia das plantas exposta ao As. A1- *A. caroliniana*: folhas saudias; A2 – acúmulo de antocianina em *A. caroliniana* exposta a $5,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ As}$; B1 – *S. minima*: folhas saudias; B2 – necroses foliares. A seta indica plantas-filhas saudias; C1 – *L. gibba*: folhas saudias; C2 e C3: processo de clorose de *L. gibba*; C4 – Redução do tamanho das folhas de *L. gibba* expostas a diferentes doses de As.

Figura 11: Eletromicrografias de varredura.

A: *Azolla caroliniana*, cultivada em solução de Hoagland, durante 6 dias.

A1: Visão geral de folíolos saudáveis.

A2: Detalhe da extremidade de folíolos jovens e saudáveis.

A3: Detalhes das células epidérmicas normais e túrgidas de folíolos saudáveis (ep).

B: *Azolla caroliniana*, cultivada em solução de Hoagland contendo 5,0 mg L⁻¹ de As (5 dias de exposição).

B1: Visão geral da extremidade de folíolos danificados

B2: Região ventral de folíolos, mostrando ausência de cianobactérias (ac).

B3: Células epidérmicas desorganizadas e plasmolisadas (cp) e os bordos enrolados dos folíolos.

C: *Lemna gibba*, cultivada em solução de Hoagland, durante 6 dias.

C1: Visão geral da superfície adaxial da folha saudável.

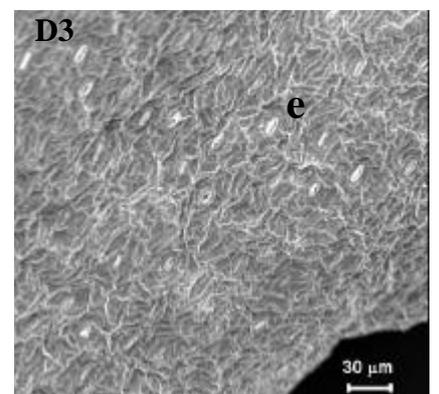
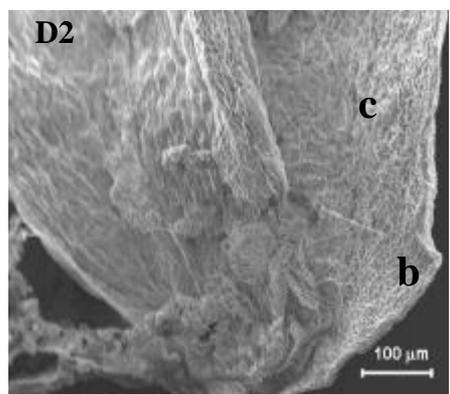
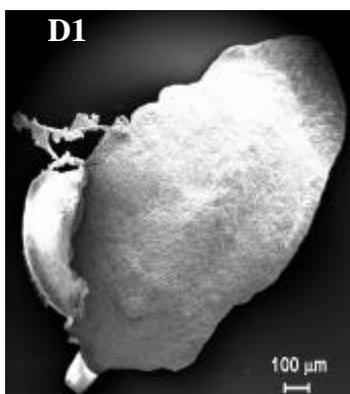
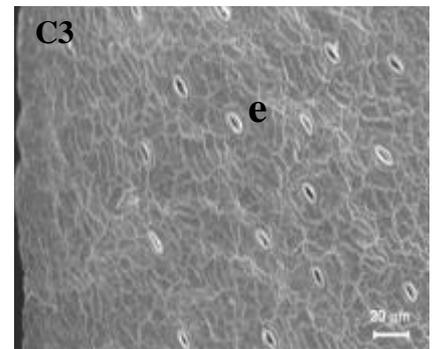
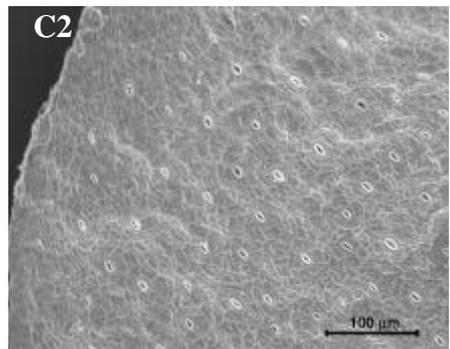
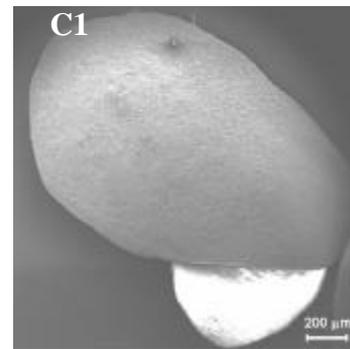
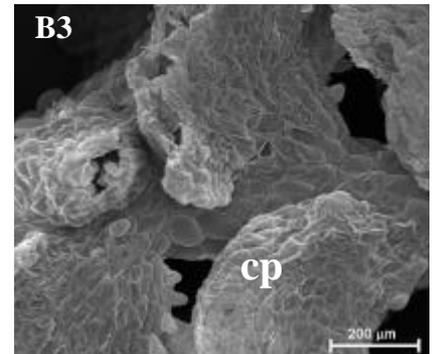
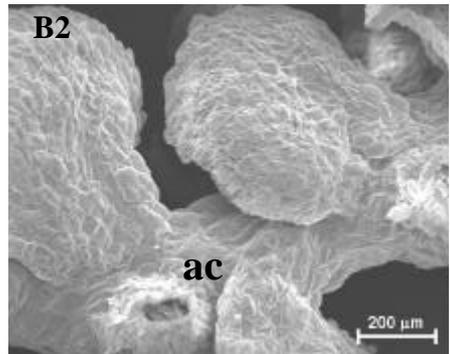
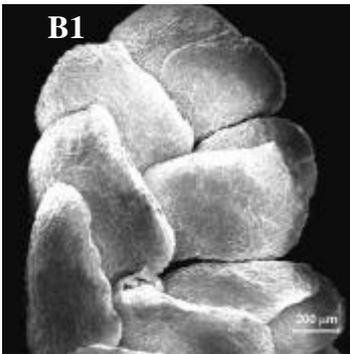
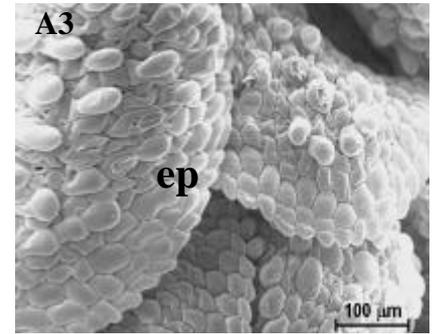
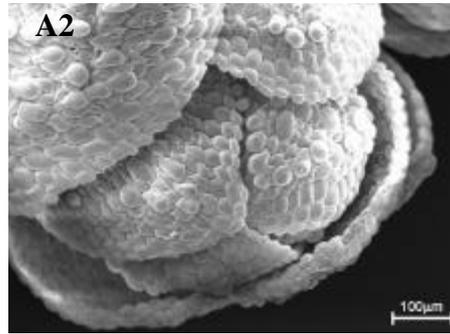
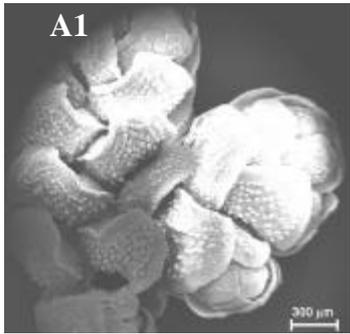
C2 e C3: Detalhe da epiderme com células túrgidas e estômatos normais (e).

D: *Lemna gibba*, cultivada em solução de Hoagland contendo 5,0 mg L⁻¹ de As (6 dias de exposição).

D1: Visão geral da superfície adaxial da folha exposta ao As.

D2: Superfície abaxial com bordos enrolados (b), células plasmolisadas e cera epicuticular removida (c).

D3: Superfície adaxial com células desorganizadas, plasmolisadas, estômatos fechados (e) e remoção de cera epicuticular (c).



4. DISCUSSÃO

Plantas “ideais” para serem utilizadas em remediação de ambientes poluídos, devem ser capazes de remover e tolerar altas concentrações do contaminante. Barker *et al.* (2000) consideram que uma planta é hiperacumuladora quando esta acumula mais que 1 mg gMS^{-1} do metal. De acordo com este critério, *L. gibba*, estudada neste trabalho, demonstrou ser uma espécie hiperacumuladora de *As*, enquanto *A. caroliniana* e *S. minima* não apresentaram o mesmo potencial. De modo geral, as lemnaáceas têm demonstrado grande potencial para remoção de contaminantes do meio, tais como *As*, *Cr*, *Pb* e *Ni*, podendo ser utilizadas em fitorremediação de áreas contaminadas por estes poluentes (Jain *et al.*, 1990; Zayed *et al.*, 1998; Axtell *et al.*, 2003; Mkandawire e Dudel, 2005).

Várias espécies têm sido estudadas para avaliação do potencial de remoção de *As* da água. *A. caroliniana* e *S. minima* acumularam $0,13$ e $0,20 \text{ mg gMS}^{-1}$, respectivamente, sendo consideradas plantas não acumuladoras deste metalóide. No entanto, foram capazes de acumular mais *As* que *Eichhornia crassipes*, quando expostas às mesmas condições ($0,044 \text{ mg gMS}^{-1}$) (Zhu *et al.*, 1999). Estudos similares mostram que *Colocasia esculenta* e *Pistia stratiotes* são capazes de acumular $0,195$ e $0,177 \text{ mg gMS}^{-1}$ (Qian *et al.*, 1999; Aksorn e Visoottiviseth, 2004), sendo consideradas boas acumuladoras, pelos autores. Os valores apresentados por estas espécies são inferiores à média apresenta por *L. gibba* ($1,397 \text{ mg gMS}^{-1}$) neste estudo, confirmando o potencial desta espécie na remoção de *As* do ambiente.

Com relação à influência do fosfato na remoção de *As*, quanto maior a concentração de fosfato, em solução, menor a absorção de *As* pelas três espécies estudadas. Este processo ocorre em virtude da similaridade entre o arseniato e o fosfato. O arseniato, apesar de não ser essencial para as plantas é análogo ao fosfato, competindo, pelos mesmos sítios de absorção (Dembitsky e Rezanka, 2003; Aksorn e Visoottiviseth, 2004; Mkandawire *et al.*, 2005). Uma vez absorvido, o arseniato, continuará competindo com o fosfato pelos mesmos sítios de ligação afetando o metabolismo vegetal, comprometendo a produção de fosfato-açúcares e de

metabólitos intermediários da respiração e da fotossíntese; alterando os fosfolipídeos que compõem as membranas vegetais, e danificando as moléculas de ATP, DNA e RNA (Taiz e Zeiger, 1991). Portanto, os sintomas típicos de toxicidade do As estão intimamente relacionados aos sintomas de deficiência de fosfato, tais como, necroses, cloroses e baixo ganho de massa fresca e seca (Sing *et al.*, 2005).

Em 24 horas de exposição ao As, *A. caroliniana* e *S. minima* não foram capazes de remover As da solução contendo $0,062 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato, demonstrando que quando a concentração de fosfato é maior do que a de As, em solução, ocorre absorção preferencial do fosfato. No entanto, em solução com $0,008 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato, *S. minima* removeu 6 vezes mais As do que aquelas plantas expostas a solução com concentração de arsênio igual a de fosfato, valores estes superiores aos encontrados por Hoffmann *et al.* (2004). Nas mesmas condições experimentais, *A. caroliniana* removeu 12 vezes mais As, quando em solução de menor concentração de fosfato. Estas espécies possuem potencial para acumular As, quando cultivadas em solução com baixa concentração de fosfato, no entanto, provavelmente, estariam sujeitas aos efeitos tóxicos do metalóide.

Dentre as três espécies estudadas, *L. gibba* foi a única a acumular As, de forma significativa, quando exposta a concentração de $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato (concentração padrão utilizada nos experimentos). Nesta concentração, *L. gibba* acumulou cerca 10 vezes menos As do que quando exposta a solução de $0,008 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato corroborando com os dados de Mkandawire *et al.* (2004). Neste trabalho, *L. gibba* foi capaz de remover cerca de 4% de As da solução contendo $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato, enquanto que em solução com ausência de fosfato *L. gibba* foi capaz de remover cerca de 40% do As da solução (Mkandawire *et al.*, 2004), demonstrando o seu potencial para extração do metalóide do meio.

A produção de clorofila total e carotenóides pelas plantas crescidas em solução com As, mostrou que quanto maior a concentração de As nos tecidos de *L. gibba*, menor o teor de clorofila encontrado. Este fato foi evidenciado pela ocorrência de cloroses presentes nas folhas desta planta. Sugere-se que a presença de As na planta, afeta a síntese de clorofila total, assim como os relatos apresentados para *Pteris ensiformis* (Sing *et al.*, 2005), *Zea mays* (Jain e Gadre, 1997) e *Trifolium*

pretense (Mascher *et al.*, 2002). O As presente nos tecidos vegetais, provavelmente interferiu no teor de clorofila total em virtude da sua competição com o fosfato.

O teor de carotenóides encontrado em *L. gibba* também foi afetado pela exposição da planta as altas concentrações de As. Os carotenóides são pigmentos acessórios fundamentais para o processo fotossintético. Dessa forma, a presença de As nos tecidos de *L. gibba* provavelmente tenha afetado as membranas dos tilacóides e a síntese de carotenóides, comprometendo a fotossíntese. O baixo teor de clorofila total e de carotenóides encontrado em *L. gibba* justificam o baixo ganho de massa fresca e seca das plantas expostas a concentrações de 5,0 mg L⁻¹ de As.

Azolla caroliniana, ao contrário de *L. gibba*, não teve o teor de clorofila total afetado pela presença de As. Este fato pode ser explicado pela menor absorção de As por esta pteridófitas. Em outras pteridófitas, no entanto, a exposição ao As resultou em aumento na produção de clorofila e carotenóides como ocorre em *Pteris vittata* e em diminuição do teor destes pigmentos em *Pteris ensiformis* (Sing *et al.*, 2005).

Apesar do teor de clorofila total de *A. caroliniana* não ter sido afetado pela concentração de As, a planta apresentou baixo ganho de massa fresca, massa seca e produção de antocianina, os quais estão relacionados à toxicidade do metalóide.

Apesar da diferença de potencial de remoção de As pelas plantas, as três espécies estudadas apresentaram sintomas típicos de toxicidade ao metalóide, tais como, necroses, cloroses e baixo ganho de massa fresca e seca, corroborando com os dados de Sing *et al.* (2005). No entanto, alguns sintomas de toxicidade foram peculiares para cada espécie. O arroxamento das folhas de *A. caroliniana*, necroses das folhas de *S. minima* e a diminuição do tamanho das folhas de *L. gibba* observadas neste trabalho.

Quando expostas a altas concentrações de As, *A. caroliniana* teve o teor de antocianina aumentado, garantindo uma coloração arroxada nas extremidades das folhas. A antocianina é um metabólito secundário que pode ser produzido em resposta a deficiência de PO₄³⁻, em virtude da competição com o arseniato. Dessa forma, plantas com deficiência de fosfato podem apresentar produção de antocianinas, garantindo coloração arroxada nas folhas (Taiz e Zeiger, 1991; Marschener, 1995). A antocianina, assim como os carotenóides, são metabólitos secundários que podem ser produzidos em resposta a estresse oxidativo,

desempenhando um papel importante de proteção (Taiz e Zeiger, 1991; Winkel-Shirley, 2002). A produção elevada de antocianina nas plantas expostas a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ também pode estar relacionada a deficiência de nitrogênio. As colônias de cianobactérias presentes nos lobos inferiores das folhas de *A. caroliniana* são fixadoras de nitrogênio e vivem em simbiose com a pteridófita. Os folíolos de *A. caroliniana* foram completamente danificados, não sendo detectada a presença de colônias de cianobactérias. Dessa forma, a relação simbiótica certamente foi comprometida. O comprometimento do fornecimento de nitrogênio para as plantas de *A. caroliniana*, pode ter levado a pteridófita a produzir antocianinas, que refletem sintomas evidentes de deficiência de nitrogênio.

O baixo potencial de acumulação de *As* apresentado por *S. minima* e o aparecimento de necroses e cloroses a partir do segundo dia de exposição ao *As*, corroboram com os dados de Hoffmann *et al.* (2004). Apesar da sintomatologia apresentada pelas plantas, ocorreu emissão de plantas-filhas saudias. Portanto, é provável que este potencial esteja relacionado à mobilidade do fósforo (P) nos tecidos da planta. O fósforo, presente nas plantas-mãe, por ser um nutriente móvel, é translocado das folhas mais velhas para as folhas mais jovens, sendo os sintomas de deficiência visualizados, primeiramente, nas folhas mais velhas. Nas plantas que se propagam vegetativamente, quando são expostas a ambientes sob estresse, as plantas-mãe dão suporte nutricional para as plantas-filhas, a fim de que elas cresçam com menos estresse (Outridge *et al.*, 1991). Outra hipótese é que plantas-filhas de *S. minima* tenham sofrido um processo de aclimação no ambiente contaminado. Este processo pode envolver a produção de fitoquelatinas e tióis induzidos pela exposição ao metal. O aumento destas substâncias nas plantas-filhas pode ocorrer pela translocação de moléculas prontas da planta-mãe ou, pela produção *de novo* em resposta a translocação do metal. Esse fenômeno já foi comprovado em *S. minima* expostas a diferentes concentrações de cádmio (Outridge e Hutchinson, 1991; Outridge *et al.*, 1991).

Apesar do potencial apresentado por *L. gibba* para remoção de *As* do meio, foi observado uma diminuição do tamanho das folhas de plantas expostas a soluções com elevada concentração de *As*. Mkandawire *et al.* (2004, 2005) sugerem que a redução do tamanho das folhas de *L. gibba*, seja uma estratégia de sobrevivência

quando as plantas estão submetidas a condições ambientais desfavoráveis. É possível que a diminuição do tamanho dos indivíduos esteja relacionada a uma resposta a escassez de nutrientes no meio (Damuth, 2001; Mkandawire *et al.*, 2005).

Uma das características desejáveis para fins de remediação é a alta produção de biomassa (Pilon-Smits e Pilon, 2002; Lasat, 2002; Adler *et al.*, 2003; Pilon-Smits, 2005). Esta característica foi constatada neste trabalho para as três espécies estudadas, quando crescidas em solução nutritiva. No entanto, *L. gibba*, foi a única macrófita que apresentou potencial fitorremediador para o As, comportando-se como uma planta hiperacumuladora deste metalóide. Além disso, esta espécie teve seu desempenho otimizado quando em condições de baixas concentrações de fosfato.

A diminuição da eficiência de remoção de As, em solução, na presença de concentrações elevadas do metalóide demonstra a viabilidade do uso da técnica de fitorremediação, principalmente em ambientes com média a baixa concentração do poluente (Schnoor, 1997; Lasat, 2002; Pilon-Smits e Pilon, 2002; Williams, 2002; Tsao, 2003; Pilon-Smits, 2005).

5. CONCLUSÃO

As três macrófitas avaliadas neste estudo apresentaram diminuição do ganho de massa fresca e seca quando expostas a concentrações elevadas de *As*, além de demonstrarem diferenças na eficiência de remoção do metalóide em solução. Entre as espécies estudadas, *L. gibba* demonstrou o maior potencial para remover *As* da solução, apesar de ter apresentado diminuição do teor de clorofila total e carotenóides.

O acúmulo de *As* pelas plantas foi maior com o aumento da concentração do metalóide em solução. No entanto, a eficiência de remoção diminuiu quando as plantas foram expostas a altas concentrações do metalóide, demonstrando a limitação do uso destas espécies na remediação de ambientes aquáticos altamente impactados.

O potencial das plantas em absorver *As* da solução, aumentou com a diminuição da concentração de fosfato no meio. *L. gibba* foi a única planta considerada hiperacumuladora. Sugere-se que o potencial fitorremediador desta espécie possa vir a ser otimizado através de técnicas moleculares, a fim de ser utilizada e recomendada para a remoção de *As* em ambientes com baixas concentrações de fosfato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, P. R., Summerfelt, S. T., Glenn, D. M., e Takeda, F. 2003. Mechanistic approach to phytoremediation of water. *Ecological Engineering* 20:251-264.
- Aksorn, E., e Visoottiviseth, P. 2004. Selection of suitable emergent plants for removal of arsenic from arsenic contaminated water. *ScienceAsia* 30:105-113.
- Axtell, N. R., Sternberg, S. P. K., e Claussen, K. 2003. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. *Bioresource Technology* 89:41-48.
- Barker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D., e Smith, J. A. C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *In* Terry, N., e Bañuelos, G. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publishers, Boca Raton, Flórida.
- Barra, C. M., Santelli, R. E., Abrão, J. J., e De La Guardia, M. 2000. Especificação do arsênio - Uma revisão. *Química Nova* 23:58-70.
- Conama. 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providências. Disponível em <http://www.mma.gov.br>. Acessado em 10-6-0005.
- Cunningham, S., e Ow, D. W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110:715-719.
- Damuth, J. 2001. Scaling of growth: Plants and animals are not so different. *PNAS* 98:2113-2114.

- Dembitsky, V. M., e Rezanka, T. 2003. Natural occurrence of arseno compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms. *Plant Science* 165:1177-1192.
- Deschamps, E., Ciminelli, V. S. T., Lange, F. T., Matschullat, J., Raue, B., e Schmidt, H. 2002. Soil and sediment geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil: The Case of Arsenic. *Journal of Soils and Sediments* 2:216-222.
- Dushenkov, V., Kumar, P. B. A. N., Motto, H., e Raskin, I. 1995. Rizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science & Technology* 29:1239-1245.
- Garbisu, C., e Alkorta, I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* 77:229-236.
- Graeme, K. A., e Pollack, C. V. Jr. 1998. Heavy metal toxicity, Part I: arsenic and mercury. *The Journal of Emergency Medicine* 16:45-56.
- Grimalt, J. O., Ferrer, M., e Macpherson, E. 1999. The mine tailing accident in Aznalcollar. *The Science of the Total Environment* 242:3-11.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Bookum, W. T., Schat, H., e Meharg, A. A. 2001. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiology* 126:299-306.
- Hoagland, D. R., e Arnon, D. I. 1950. The water - culture method for growing plants without soil. University of California, Berkeley.
- Hoffmann, T., Kutter, C., e Santamaría, J. 2004. Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Engineering in Life Sciences* 4:61-65.
- Jain, C. K., e Ali, I. 2000. Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research* 34:4304-4312.

- Jain, M., e Gadre, R. P. 1997. Effect of As on chlorophyll and protein contents and enzymic activities in greening maize tissues. *Water, Air, & Soil Pollution* 93:109-115.
- Jain, S. K., Vasudevan, P., e Jha, N. K. 1990. *Azolla pinnata* R.Br. and *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water. *Water Research* 24:177-183.
- Kamal, M., Ghaly, A. E., Mahmoud, N., e Cote, R. 2004. Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environment International* 29:1029-1039.
- Kamperidou, I., e Vasilakakis, M. 2006. Effect of propagation material on some quality attributes of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, var. Selva). *Scientia Horticulturae* 107:137-142.
- Lasat, M. M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31:109-120.
- Lichthenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *In* Colowick, S. P., e Kaplan, N. O. *Methods in Enzimology*. Academic Press, San Diego.
- Lytle, C. M., Lytle, F. W., Yang, N., Qian, J. H., Hansen, D., Zayed, A., e Terry, N. 1998. Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: Potential for in situ heavy metal detoxification. *Environmental Science and Technology* 32:3087-3093.
- Marschener, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., e Bergmann, H. 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science* 163:961-969.

- Matschullat, J., Borba, R. P., Deschamps, E., Figueiredo, B. R., Gabrio, T., e Schewenk, M. 2000. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *Applied Geochemistry* 15:193-202.
- Meharg, A. A., e Hartley-Whitaker, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist* 154:29-43.
- Misbahuddin, M., e Fariduddin, A. 2002. Water hyacinth removes arsenic from arsenic-contaminated drinking water. *Archives of Environmental Health* 57:516-518.
- Mkandawire, M., e Dudel, E. G. 2005. Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L.(duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *The Science of the Total Environment* 336:81-89.
- Mkandawire, M., Lyubun, Y. V., Kosterin, P. V., e Dudel, E. G. 2004. Toxicity of arsenic species to *Lemna gibba* L. and the influence of phosphate on arsenic bioavailability. *Environmental Toxicology* 19:26-34.
- Mkandawire, M., Taubert, B., e Dudel, E. G. 2005. Limitations of growth-parameters in *Lemna gibba* bioassays for arsenic and uranium under variable phosphate availability. *Ecotoxicology and Environmental Safety In Press, Corrected Proof*.
- Outridge, P. M., e Hutchinson, T. C. 1991. Induction of cadmium tolerance by acclimation transferred between ramets of clonal fern *Salvinia minima* Baker. *New Phytologist* 117:597-605.
- Outridge, P. M., Rauser, W. E., e Hutchinson, T. C. 1991. Changes in metal-binding peptides due to acclimation to cadmium transferred between ramets of *Salvinia minima*. *Oecologia* 88:109-115.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 56:15-39.

- Pilon-Smits, E., e Pilon, M. 2002. Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Science* 21:439-456.
- Qian, J.-H., Zayed, A., Zhu, Y.-L., Yu, M., e Terry, N. 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *Journal of Environmental Quality* 28:1448-1455.
- Raghothama, K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:665-693.
- Raghothama, K. G. 2000. Phosphate transport and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 3:182-187.
- Sakuma, A. M., De Capitani, E. M., e Tiglia, P. 2003. Arsênio. *In* Azevedo, F. A., e Chasim, A. A. D. M. *Metais: gerenciamento da toxicidade*. Atheneu, São Paulo. 554p.
- Samecka-Cymerman, A., e Kempers, A. J. 1996. Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macrophytes around Wroclaw, Poland. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35:242-247.
- Schnoor, J. L. 1997. Phytoremediation. *Technology Evaluation Report TE-98-01:1-31*.
- Sing, N., Ma, L. Q., Srivastava, M., e Rathinasabapathi, B. 2005. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science. In Press, Corrected Proof*.
- Sivaci, E. R., Sivaci, A., e Sokmen, M. 2004. Biosorption of cadmium by *Myriophyllum spicatum* L. and *Myriophyllum triphyllum* orchard. *Chemosphere* 56:1043-1048.

- Suresh, B., e Ravishankar, G. A. 2004. Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical Reviews in Biotechnology* 24:97-124.
- Taiz, L., e Zeiger, E. 1991. *Plant physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, Redwood City, California. 565p.
- Tryon, R. M., e Tryon, A. F. 1982. *Ferns and Allied Plants*. Springer-Verlag, New York.
- Tsao, D. T. 2003. Overview of Phytotechnologies. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 78:1-50.
- Williams, J. B. 2002. Phytoremediation in wetland ecosystems: progress, problems, and potencial. *Critical Reviews in Plant Science* 21:607-635.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5:218-223.
- Zayed, A., Gowthaman, S., e Terry, N. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality* 27:715-721.
- Zhu, Y.-L., Zayed, A., Qian, J.-H., e Terry, N. 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *Journal of Environmental Quality* 28:339-344.

CAPÍTULO II:

POTENCIAL DE MACRÓFITAS NA REMOÇÃO DE ATRAZINE (2-CLORO-4-ETILAMINO-6-ISOPROPILAMINO-S-TRIZINA) EM SOLUÇÃO AQUOSA

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso intensivo e indiscriminado de defensivos agrícolas cresceu de forma desordenada devido, principalmente, à necessidade premente de aumentar a produção agrícola, controlar pragas e impedir a invasão de plantas daninhas em áreas agricultáveis (Garcinuno *et al.*, 2003). Os benefícios advindos do uso destes produtos são inquestionáveis, porém, o uso excessivo tem causado contaminações ambientais e riscos à saúde humana.

O mercado mundial de agroquímicos movimenta, atualmente, cerca de US\$ 30 bilhões por ano, sendo os herbicidas os responsáveis pela maior parcela destes produtos (Ueta *et al.*, 1999; Sindag, 2003; Ueta, 2004; IBGE, 2005; Cerdeira *et al.*, 2005). Dentre estes, a atrazine (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-trizina), merece atenção especial, pois é um dos herbicidas mais utilizados, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Anderson e Noyes, 2002; EPA, 2002).

A atrazine é um herbicida triazínico, utilizado em culturas de milho, cana-de-açúcar e sorgo, podendo também ser utilizado em áreas não agricultáveis tais como campos de golfe, campos com árvores ornamentais, áreas de recreação, áreas industriais e gramados residenciais (Ueta *et al.*, 1999; EPA, 2003a; Rodrigues e Almeida, 2005). Sendo um herbicida de pré e pós emergência que bloqueia o transporte de elétrons no fotossistema II, a atrazine impede a produção de ATP, do NADPH e, conseqüentemente, a fixação do carbono, necessário para o crescimento das plantas (Brian, 1969; Health Canada, 1993; EPA, 2003b).

O Brasil consome cerca de 20 mil toneladas de atrazine por ano, somente na cultura canvieira (Ueta *et al.*, 1999; Ueta, 2004; Cerdeira *et al.*, 2005). Os dados do

uso deste herbicida são preocupantes à medida que a atrazine, por apresentar uma elevada persistência nos solos e hidrólise lenta, é considerada um potencial contaminante de solos, águas superficiais e subterrâneas (Health Canada, 1993; Ueta *et al.*, 1999; Andersona *et al.*, 2002; EPA, 2003a; Ueta, 2004), além de causar problemas hormonais, nos seres humanos e, ser um potencial agente carcinogênico (EPA, 2003a).

Nos EUA e na Grécia, os cursos d'água, adjacentes a áreas agrícolas, contém um teor igual ou superior a $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de um ou mais defensivos agrícolas, sendo os teores mais altos associados à presença de atrazine, metolachlor, cianazina e alachlor (Gilliom e Barbash, 1999; Papadopoulou-Mourkidou *et al.*, 2004a; Papadopoulou-Mourkidou *et al.*, 2004b; Konstantinou *et al.*, 2005). Nos EUA, a concentração máxima de atrazine aceitável em água para consumo é de $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ (EPA, 2005), enquanto que no Brasil, o máximo permitido é de $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ do herbicida na água (Conama, 2005).

Algumas plantas, como o milho, o sorgo e a cana-de-açúcar são tolerantes a atrazine, sendo capazes de mobilizar o herbicida antes que este iniba o processo de fotossíntese. Os diferentes níveis de tolerância destas espécies estão relacionados à atividade da enzima glutationa-S-transferase que liga uma molécula de atrazine a uma molécula de glutationa, translocando para o vacúolo, impedindo, portanto, a ação do herbicida (De Prado *et al.*, 1995; Prade *et al.*, 1998; Marcacci *et al.*, 2005; Rodrigues e Almeida, 2005). Dessa forma, é possível a utilização da atrazine como herbicida nestas lavouras, visto que este afetará somente a fotossíntese das plantas daninhas sem alterar a produtividade da lavoura (EPA, 2003b).

A existência de plantas comprovadamente tolerantes a atrazine indica a possibilidade de existirem mecanismos que possam ser utilizados em estudos de fitorremediação. Muitas plantas são capazes de absorver compostos orgânicos, metabolizando-os, ou ainda, liberando exsudados que estimulam a população microbiana e, conseqüentemente, degradam ou complexam os poluentes ainda na rizosfera (Burken e Schnoor, 1996). Em geral, torna-se mais difícil trabalhar com contaminantes orgânicos, em razão da diversidade molecular, da complexidade de análise e das constantes transformações a que estão sujeitos (Cunningham e Ow, 1996), além da possibilidade de transformação do poluente em subprodutos mais

tóxicos que o original. Alguns microrganismos (bactérias, microalgas e fungos), também têm demonstrado capacidade para biodegradar, parcial ou totalmente, a molécula de atrazine, resultando na formação de amônia (NH₃) e dióxido de carbono (CO₂) (Ueta *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000; Andersona *et al.*, 2002; Lanyi e Dinya, 2003; Ueta, 2004; Lanyi e Dinya, 2005).

A demanda do mercado para a implantação de sistemas de descontaminação de águas poluídas tende a crescer em busca de tecnologias de baixo custo, porém eficientes, visando atender as exigências de uma sociedade esclarecida, o rigor das leis ambientais e a necessidade de proteção à saúde do homem. Neste contexto, a fitorremediação apresenta-se como uma alternativa eficiente na descontaminação de ambientes poluídos.

A identificação e a seleção de espécies vegetais tolerantes, capazes de remover e/ou metabolizar a atrazine, é de suma importância, pois permitirá sua aplicação na descontaminação de ambientes impactados. Várias espécies de macrófitas aquáticas têm demonstrado potencial de remediação de poluentes inorgânicos, em ambientes aquáticos, tais como a *Azolla caroliniana* Willd, *Salvinia minima* Baker e *Lemna gibba* Linnaeus (Jain *et al.*, 1990; Zayed *et al.*, 1998; Axtell *et al.*, 2003; Mkandawire e Dudel, 2005). Dessa forma, é válida a seleção de plantas com potencial para serem utilizadas em estudos de remediação de ambientes aquáticos contaminados por atrazine.

Azolla caroliniana é uma samambaia aquática, flutuante e de pequeno porte. Possui raízes finas e folhas bilobadas que se sobrepõem. Nos lobos foliares inferiores da planta, se alojam colônias de cianobactérias do gênero *Anabaena*, importantes fixadoras de nitrogênio atmosférico. *A. caroliniana* é amplamente distribuída nos trópicos e na região das Américas, sendo especialmente encontrada em águas paradas (Tryon e Tryon, 1982). Possui crescimento rápido, justificando desta maneira, o seu uso em pesquisas de fitorremediação.

Salvinia minima é uma pteridófita aquática, flutuante, cujos ramos consistem de duas folhas flutuantes opostas, unidas por um caule central (rizoma) e, uma folha submersa modificada, semelhante a uma raiz. Os indivíduos podem se conectar a outros indivíduos por intermédio dos rizomas apicais, formando extensas colônias. É

uma pteridófita que possui um crescimento rápido, podendo ser encontrada em lagos e rios, em várias partes do mundo (Tryon e Tryon, 1982).

Lemna gibba é uma monocotiledônea aquática, flutuante, de pequeno porte que, apresenta crescimento rápido, adaptando-se facilmente a várias condições ambientais. É amplamente distribuída, em várias partes do mundo, onde desempenham um importante papel na extração e acumulação de íons metálicos presentes na água (Zayed et al., 1998).

O presente estudo teve como objetivo determinar o potencial das espécies de macrófitas aquáticas *A. caroliniana*, *S. minima* e *L. gibba* na remoção de atrazine, em solução, para serem utilizadas em programas de fitorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das plantas

Exemplares das macrófitas aquáticas flutuantes *A. caroliniana*, *S. minima* e *L. gibba* foram coletadas em tanques do Horto Botânico pertencente ao Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em janeiro de 2005.

Após desinfecção, em solução de hipoclorito a 1% e água deionizada, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em bandejas plásticas contendo solução de Hoagland (¼ força iônica) (Hoagland e Arnon, 1950). As plantas utilizadas nos experimentos tiveram origem a partir de duas plantas-mãe, o que resultou em variações genotípicas e pré-experimentais mínimas, conforme recomendação de Outridge e Hutchinson (1991).

2.3. Exposição das plantas a atrazine

Os experimentos foram montados com 1,5 g de massa fresca de plantas por unidade amostral, as quais foram transferidas para vasos pretos contendo 1500 mL de solução de Hoagland (¼ força iônica), e as seguintes concentrações de atrazine: 0; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 mg L⁻¹. Os vasos, com cinco repetições por tratamento, foram deixados em casa de vegetação, durante seis dias.

As plantas foram pesadas a cada dois dias, com auxílio de uma peneira e secadas em papel toalha, para obtenção da massa fresca, retornando as plantas para os respectivos vasos. Ao final do experimento, 0,5 g de massa fresca foram acondicionadas em freezer, para posterior extração de atrazine. O restante da massa fresca foi seca a estufa a 70°C, por 3 dias, para obtenção da massa seca. A massa seca correspondente a 0,5 g de massa fresca utilizada na extração de atrazine, foi acrescida à massa seca final do material seco em estufa. A massa seca inicial foi calculada a partir da média obtida de 5 repetições, contendo cada uma 1,5 g de massa fresca por espécie (Cedergreen *et al.*, 2004).

Para os experimentos foi utilizada atrazine comercial Gesaprin[®] 500 (Giba-Geigy), cujo princípio ativo corresponde a 500 g L⁻¹.

A temperatura mínima da casa de vegetação foi de 17°C e a máxima de 38°C. O volume de água foi completado, diariamente, com água deionizada, a fim de compensar a perda pela transpiração e evaporação (Aksorn e Visoottiviset, 2004).

Os vasos plásticos, utilizados no experimento, foram forrados com sacos de polietileno, a fim de evitar a contaminação dos vasos e facilitar o armazenamento dos resíduos para posterior descarte em aterro especializado.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP-DBV), em delineamento inteiramente casualizado, sendo realizados diariamente o rodízio dos vasos.

2.2. Determinação de atrazine

Para a quantificação de atrazine em plantas frescas e inteiras, a extração foi feita utilizando-se 0,5 g de massa fresca de cada unidade amostral. As amostras foram maceradas em 10 mL de solução metanólica (metanol:água, 1:1, v:v), homogenizadas e centrifugadas a 1500xg por 10 min (Lawrence *et al.*, 1996; Garcinuno *et al.*, 2003). O sobrenadante foi analisado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, Class-LC 10, Shimadzu, Japão, 1992), pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Milho e Sorgo), Sete Lagoas, MG. A coluna utilizada na determinação de atrazine foi do tipo Supelcosil LC 18S (150 x 4,6mm, 5µm), sendo a fase móvel constituída de uma solução de MeOH: H₂O (60:40), em volume injetado de 20 µL e fluxo de eluição de 1 mL por minuto.

2.6. Eficiência de remoção de atrazine

A eficiência de remoção de atrazine, em solução, foi calculada pela porcentagem de atrazine removido pelas plantas. A quantidade de atrazine presente em solução foi considerada 100%. A concentração de atrazine absorvida pelas plantas (mg gMF⁻¹) foi multiplicada pela quantidade de massa fresca produzida durante o período de exposição ao metalóide, obtendo-se portanto, a quantidade real

de atrazine removida da solução. Dessa forma, foi calculado o percentual de atrazine que as plantas removeram do meio.

2.3. Análise estatística

Foi utilizada a análise de variância (Anova), ao nível de 5% de probabilidade, para verificar se as diferentes concentrações de atrazine influenciaram a absorção e o ganho de massa fresca e seca, pelas espécies de macrófitas estudadas. Foram testadas a normalidade e a homogeneidade das variâncias, como pressupostos para realização da Anova. Posteriormente, foi feito o Teste de Tukey para diferenciar tratamentos aplicados.

2.4. Sintomatologia visual das plantas expostas a atrazine

O registro fotográfico da sintomatologia das plantas expostas as diferentes concentrações de atrazine foi feito utilizando-se uma câmera digital (Sony DSC-S60). Também foi utilizado um microscópio estereoscópico (Olympus, Micronal VM VMT, Brasil) para evidenciar as injúrias ocorridas nas macrófitas estudadas.

2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os danos causados a parte aérea de *A. caroliniana* e *L. gibba* expostas à concentração de 0,1 mg L⁻¹ de atrazine e das plantas controle foram analisados com auxílio da microscopia eletrônica de varredura. As plantas foram fixadas em glutaraldeído (5%), pós-fixadas em tetróxido de ósmio (2%) e, após sucessivas lavagens, foram desidratadas em série etanólica. As amostras foram submetidas ao processo de desidratação utilizando-se um aparelho de ponto crítico (CPD-030, Baltec, Alemanha). Posteriormente, as amostras foram montadas em “stubs” e metalizadas em equipamento de metalização modelo FDU-010, Balzers, Alemanha, acoplado a um conjunto de pulverização catódico, modelo SCA-010. O material foi observado em um microscópio eletrônico modelo LEO 1430 VP (Zeiss, Alemanha), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3. RESULTADOS

3.1. Ganho de massa fresca

Foi observado aumento exponencial da massa fresca das plantas controle e para aquelas expostas a concentração de 0,01 mg L⁻¹ de atrazine (Figura 1). A concentração de 0,1 mg L⁻¹ reduziu o crescimento exponencial das plantas, quando comparadas ao controle. Plantas expostas às concentrações de 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ de atrazine não apresentaram crescimento significativo, conforme mostra a Figura 1.

Dentre as macrófitas estudadas, *S. minima* foi a única espécie que apresentou redução da massa fresca, quando exposta a 0,01 mg L⁻¹ de atrazine, mesmo ocorrendo crescimento exponencial. Quando *S. minima* foi exposta a concentração de 0,1 mg L⁻¹ de atrazine, houve rápida redução no ganho de massa quando comparado as demais espécies estudadas. Dessa forma, a atrazine, mesmo em baixas concentrações, afetou o crescimento de *S. minima*.

As plantas de *A. caroliniana* e *L. gibba*, quando expostas a concentração de 0,01 mg L⁻¹ de atrazine apresentaram crescimento igual ao grupo controle, não sendo possível a distinção das respectivas curvas no gráfico (Figura 1).

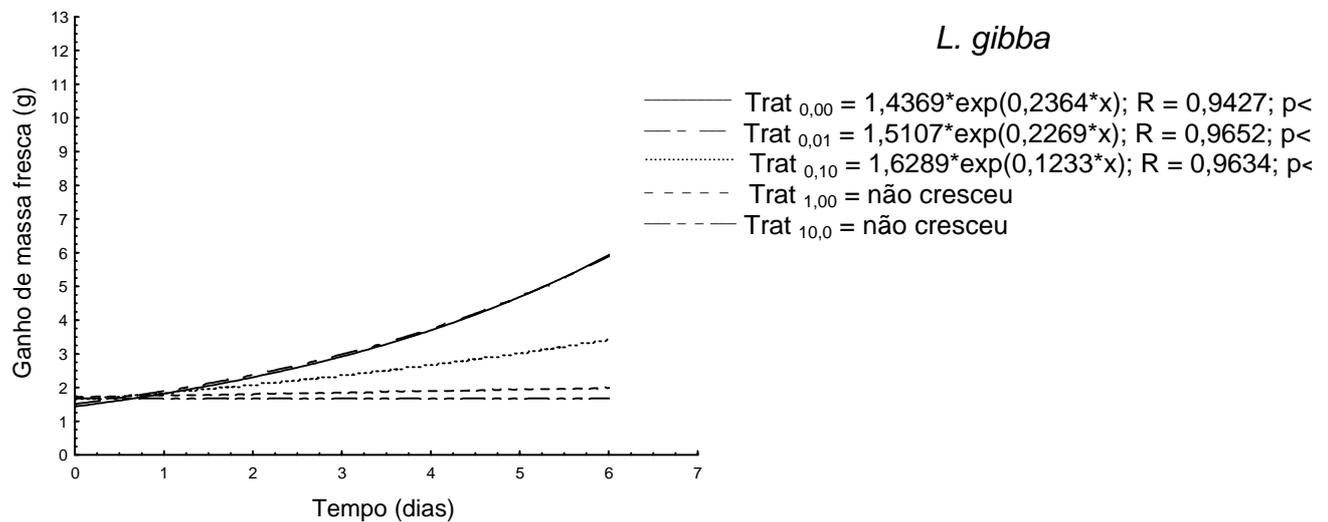
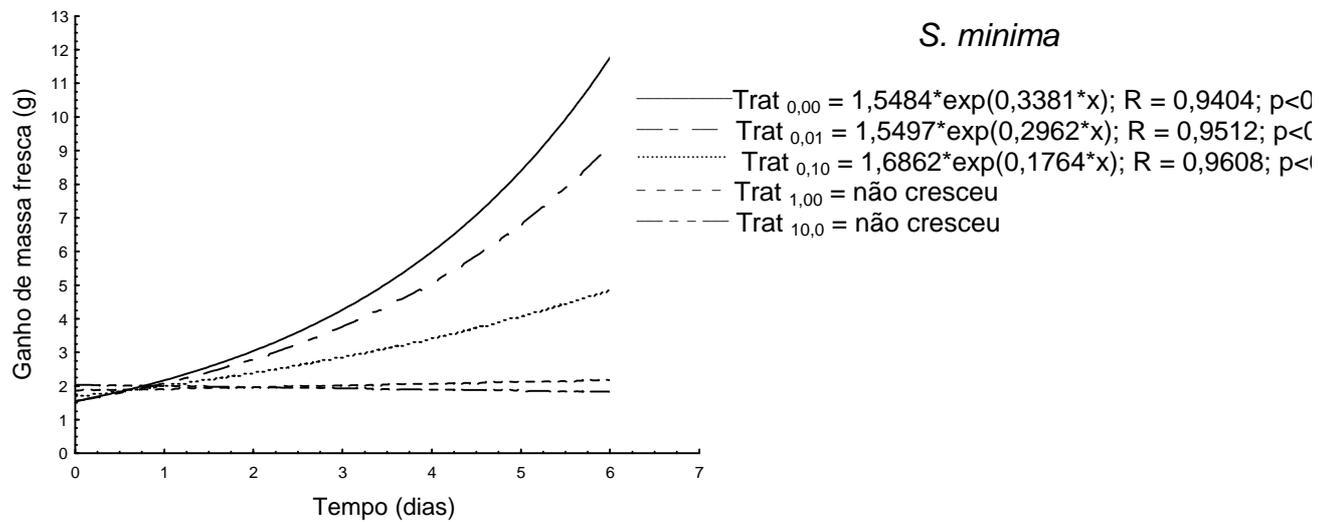
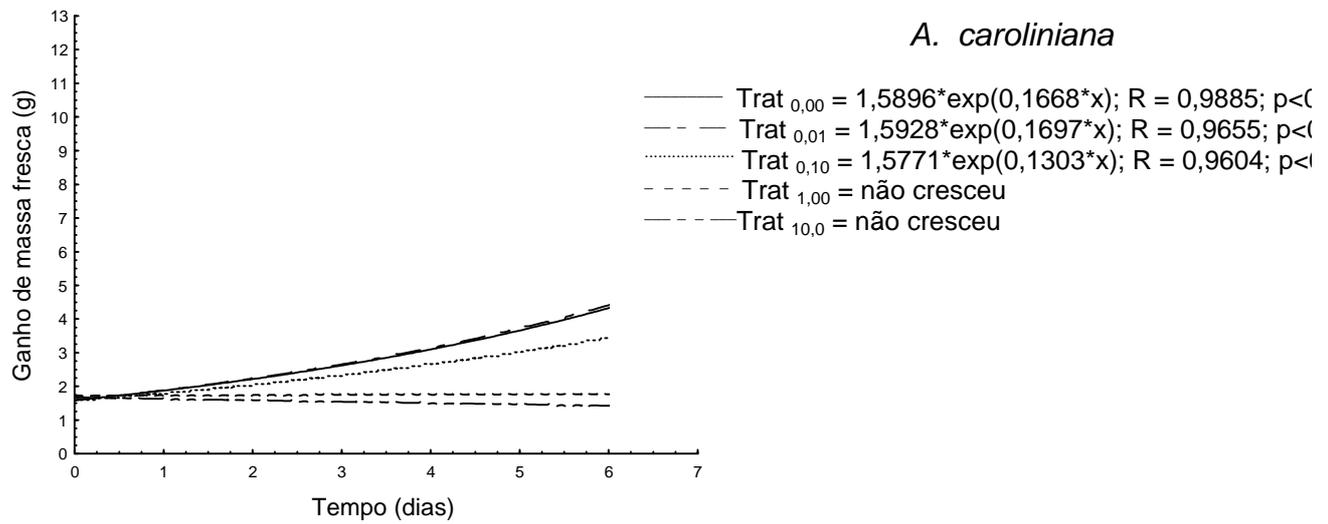


Figura 1: Ganho de massa fresca, em macrófitas aquáticas, quando expostas a diferentes concentrações de atrazine, ao longo do período experimental (6 dias).

3.2. Ganho de massa seca

A quantidade de massa seca produzida, por dia, pelas três espécies de macrófitas flutuantes foi influenciada pela concentração de atrazine, em solução, de acordo com a análise de variância e com o teste de tukey (Figura 2). Quanto maior a concentração de atrazine, em solução, menor o ganho de massa seca observado em *A. caroliniana* (gl=4; F=12,369; p=0), *S. minima* (gl=4; F=38,448; p=0) e *L. gibba* (gl=4; F=35,428; p=0) (Figura 2).

Azolla caroliniana, quando exposta as soluções de 0,01 e 0,1mg L⁻¹ de atrazine, obteve ganho de 0,011 e 0,007 g de massa seca por dia, respectivamente. Estes valores são iguais aos 0,006 g obtidos pelas plantas do grupo controle. As plantas expostas às concentrações mais elevadas de atrazine (1,0 e 10,0 mg L⁻¹) não apresentaram ganho de massa seca conforme mostrado na Figura 2.

Salvinia minima obteve ganho de massa seca equivalente a 0,020 g por dia, quando expostas a solução de 0,01 mg L⁻¹ de atrazine, correspondente a 0,024 g obtida pelo grupo controle. Não foi observado ganho de massa seca em plantas expostas à 0,1; 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ (Figura 2).

Lemna gibba seguiu o mesmo padrão exibido por *S. minima*, apresentando crescimento de 0,015 g de massa seca por dia, quando exposta a concentração de 0,01 mg L⁻¹, que foi igual aos 0,017 g dia⁻¹ de crescimento apresentado pelo grupo controle. Além disso, não foi observado crescimento das plantas quando estas foram expostas as outras concentrações de atrazine (Figura 2).

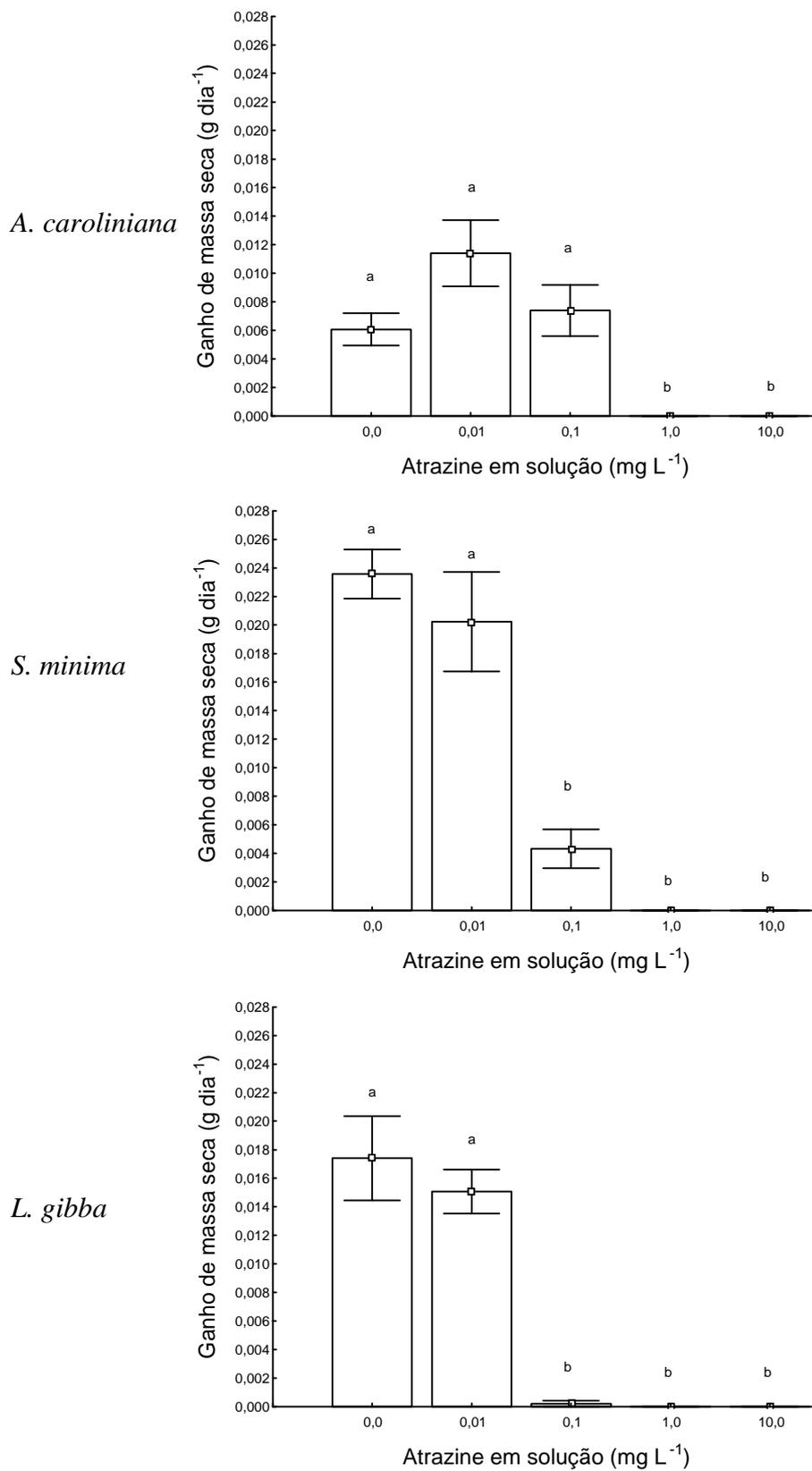


Figura 2: Ganho de massa seca, em macrófitas aquáticas, expostas a diferentes concentrações de atrazine. Os pontos (◻) representam as médias e as barras (⊥) representam o erro padrão. Letras diferentes, na mesma figura, representam médias diferentes, de acordo com Teste de Tukey.

3.3. Absorção de atrazine pelas macrófitas aquáticas

Quanto maior a concentração de atrazine, em solução, maior a absorção do herbicida pelas três macrófitas estudadas, de acordo com a análise de variância com 4 graus de liberdade e com o teste de Tukey (*A. caroliniana*, $F=5375,780$; $p=0$; *S. minima*, $F=110,526$; $p=0$ e *L. gibba*, $F=129,307$; $p=0$), conforme mostra a Figura 3.

Azolla caroliniana acumulou, em média, 0,003; 0,004 e 0,018 mg gMF⁻¹, quando em concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 mg L⁻¹, respectivamente. *S. minima* acumulou 0,002; 0,004 e 0,013 e *L. gibba* acumulou 0,002; 0,003 e 0,016 mg de atrazine por grama de massa fresca, quando expostas as concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ de atrazine, respectivamente.

Lemna gibba foi capaz de absorver 0,001 mg de atrazine quando exposta a solução de 0,01 mg L⁻¹ do herbicida, ao contrário das demais espécies que não registraram absorção do herbicida em quantidades detectáveis pelo equipamento (HPLC). Nesta concentração, no entanto, a quantidade absorvida do herbicida foi desprezível.

As três espécies de macrófitas estudadas neste trabalho apresentaram o mesmo potencial de remoção de atrazine da água, diferindo, apenas, na concentração de 10 mg L⁻¹ de atrazine, conforme mostrado na Figura 4. Nesta concentração, *A. caroliniana* e *L. gibba* foram capazes de remover 0,018 e 0,016 mg gMF⁻¹, respectivamente, valores estes superiores aos 0,013 mg de atrazine removidos por *S. minima* (Anova; $gl=2$; $F=13,523$; $p=0,000843$ e Teste de Tukey).

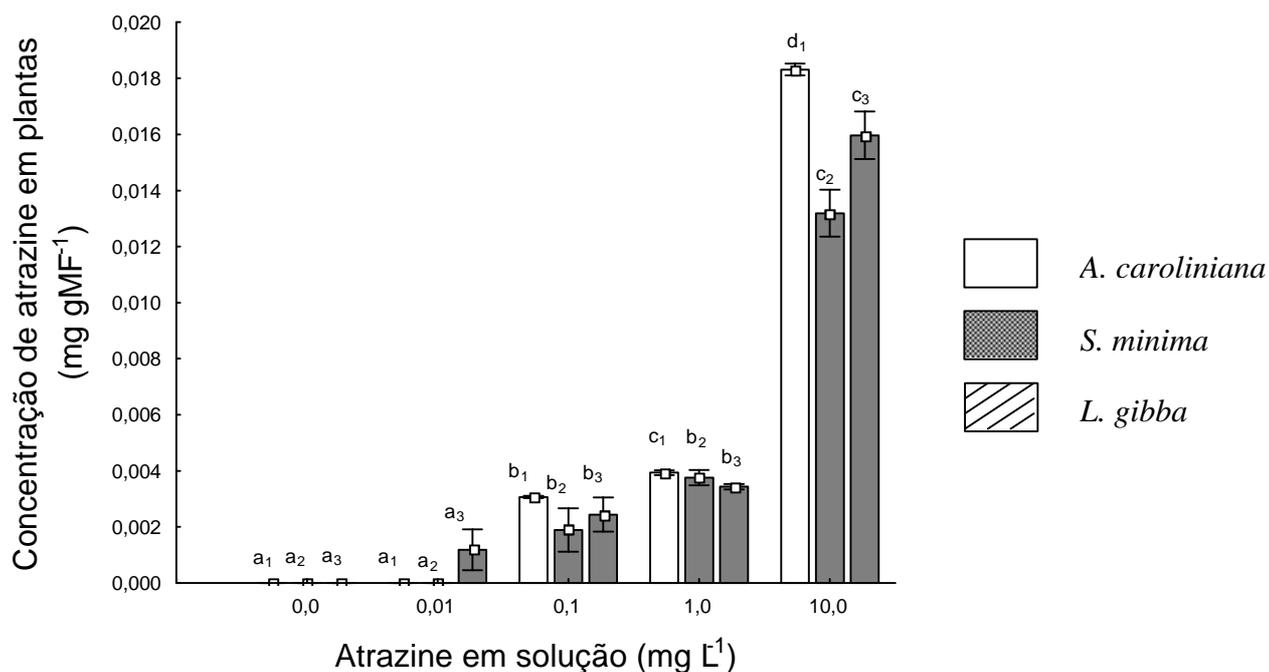


Figura 3: Concentração de atrazine, em macrófitas aquáticas, em diferentes tratamentos. Os pontos (\bar{x}) representam as médias e as barras (\pm) representam o erro padrão. Letras diferentes representam médias diferentes (Teste de Tukey). Os índices representam cada espécie: 1-*A. caroliniana*; 2-*S. minima*; 3-*L. gibba*.

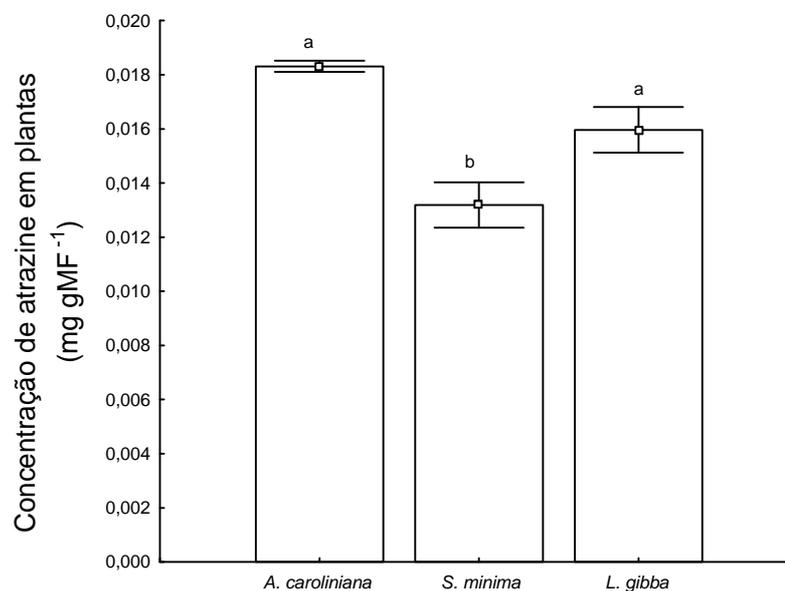


Figura 4: Concentração de atrazine em macrófitas expostas a concentração de 10,0 mg L⁻¹. Os pontos (\bar{x}) representam as médias e as barras (\pm) representam o erro padrão. Letras diferentes representam médias diferentes (Teste de Tukey).

3.4. Eficiência de remoção de atrazine

O percentual de atrazine absorvido pelas plantas foi reduzido com o aumento da concentração do herbicida em solução. *A. caroliniana*, *L. gibba* e *S. minima* removeram maior percentual de atrazine quando foram expostas a concentração de 0,1 mg L⁻¹ (Figura 5). *A. caroliniana* removeu 6,56; 0,43 e 0,16% (Anova, gl=2;F=1209,824; p=0), *L. gibba* 5,07; 0,38 e 0,15% e *S. minima* 5,6; 0,45; 0,12% de atrazine (Anova, gl=2;F=5,382; p=0,0214), nos respectivos tratamentos 0,1; 1,0; 10,0 mg L⁻¹.

As três espécies estudadas, no entanto, demonstraram o mesmo padrão de eficiência quando foram expostas as mesmas concentrações de atrazine (Anova; gl=2; F=0,245; p=0,786702) (Figura 5).

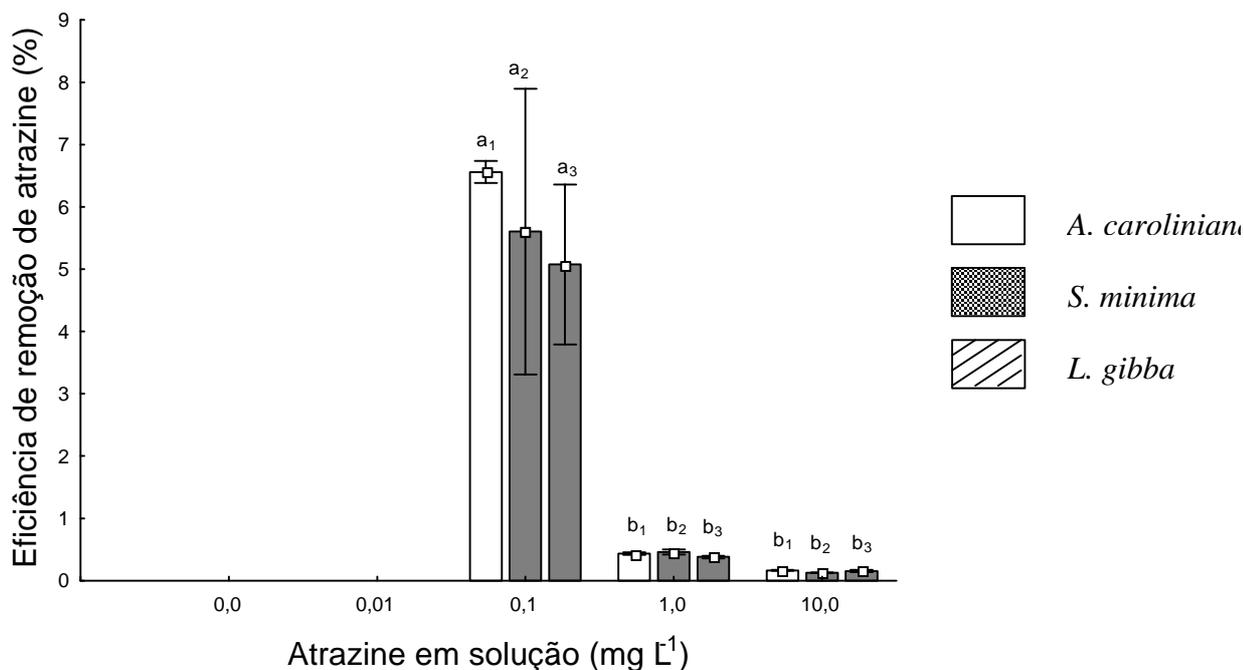


Figura 5: Eficiência de remoção de atrazine (%), em solução, para diferentes tratamentos. Os pontos (\bar{x}) representam as médias e as barras (\perp) representam o erro padrão. Letras diferentes representam médias diferentes (Teste de Tukey). Os índices representam cada espécie: 1-*A. caroliniana*; 2-*S. minima*; 3-*L. gibba*.

3.5. Sintomatologia

As plantas começaram a apresentar sintomas de toxicidade à atrazine, a partir do segundo dia de exposição ao herbicida, principalmente para as concentrações de 1,0 e 10 mg L⁻¹. *A. caroliniana* e *S. minima* apresentaram necroses em toda a folha, enquanto *L. gibba* apresentou clorose foliar. Ao final de 6 dias, as tres espécies estavam mortas conforme mostrado na Figura 6.

Azolla caroliniana, quando exposta a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de atrazine, durante 3 dias, apresentou os folíolos totalmente alterados. As células epidérmicas foram completamente plasmolisadas e os folíolos apresentaram os bordos enrolados. Não foi detectada a presença de colônias de cianobactérias simbióticas do gênero *Anabaena* em *A. caroliniana*. A ultraestrutura de *L. gibba*, tratada com solução contendo 1,0 mg L⁻¹ de atrazine, durante 3 dias, evidenciou o tecido epidérmico contendo células desorganizadas e plasmolisadas, associado a grande quantidade de cera removida sobre as superfícies adaxial e abaxial. O meristema apical da raiz foi danificado, ficando as células plasmolisadas. Os estômatos, presentes somente na região adaxial da folha, permaneceram fechados e, as células-guarda foram danificadas (Figura 7).

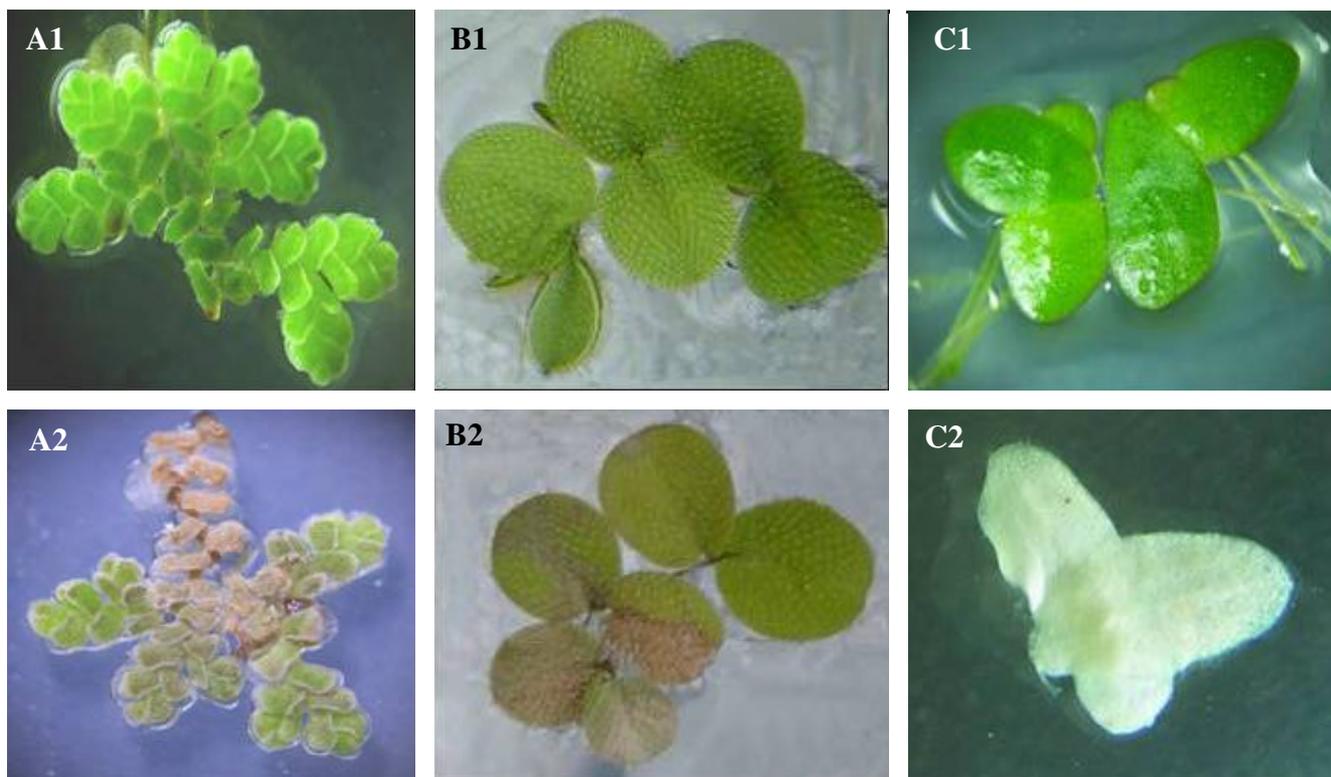


Figura 6: Sintomatologia das macrófitas aquáticas expostas a atrazine. A1- *A. caroliniana*: folhas saudáveis; A2 –necrose nos folíolos; B1 – *S. minima*: folhas saudáveis; B2 –necroses; C1 – *L. gibba*: folhas saudáveis; C2 - clorose foliar.

Figura 7: Eletromicrografias de varredura

A: *Azolla caroliniana*, cultivada em solução de Hoagland, durante 6 dias de exposição.

A1: Visão geral de folíolos saudáveis;

A2: Detalhes dos folíolos jovens;

A3: Detalhe do tecido epidérmico de folíolos com células normais e túrgidas (ep).

B: *Azolla caroliniana*, cultivada em solução de Hoagland, contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de atrazine (3 dias de exposição).

B1: Visão geral de folíolos afetados;

B2 e B3: Folíolos totalmente alterados: epiderme com bordos enrolados e células plasmolisadas (cp).

C: *Lemna gibba*, cultivada em solução de Hoagland, durante 6 dias de exposição

C1: Visão geral da superfície adaxial de folha sadia;

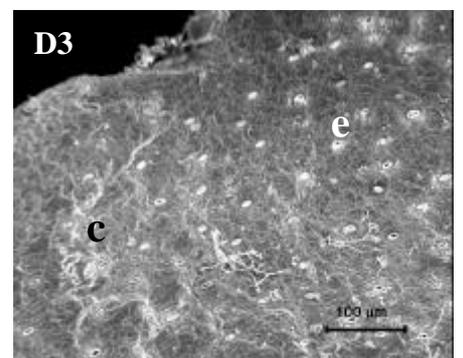
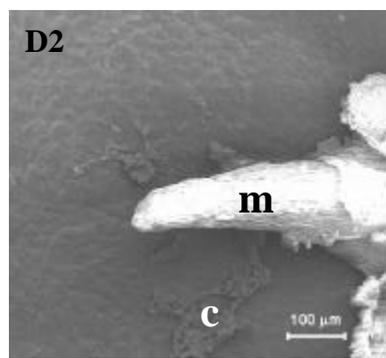
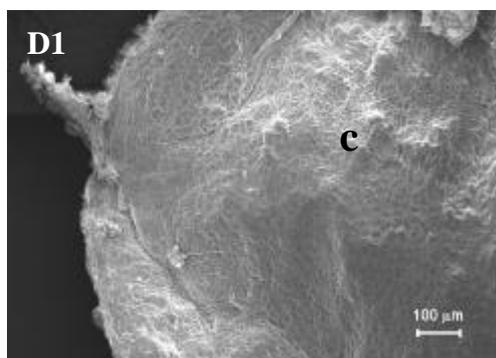
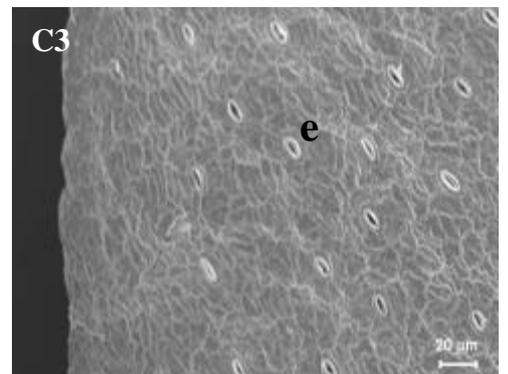
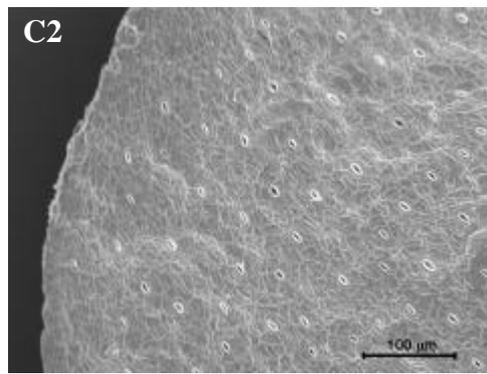
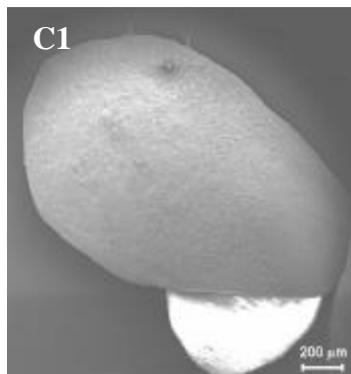
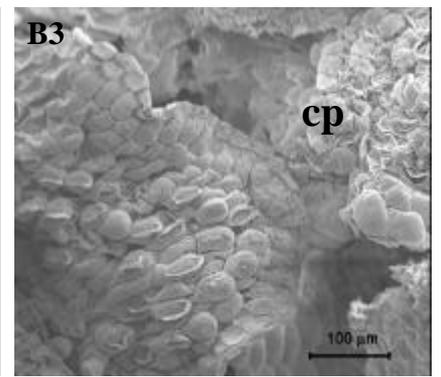
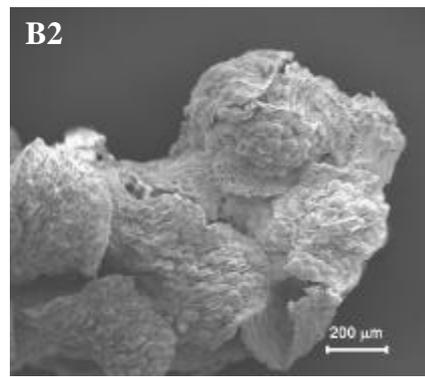
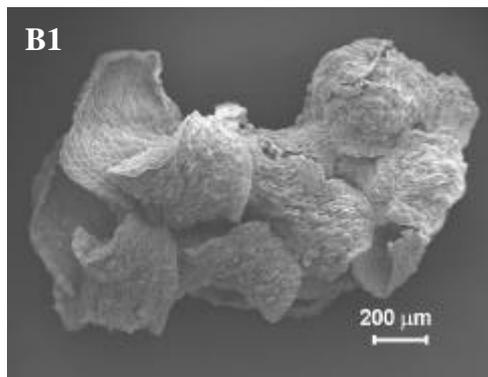
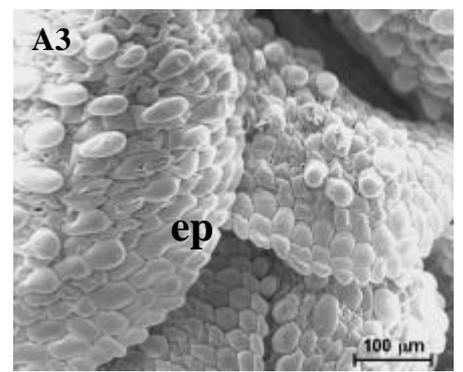
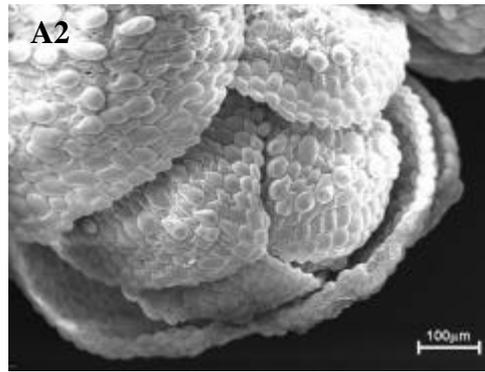
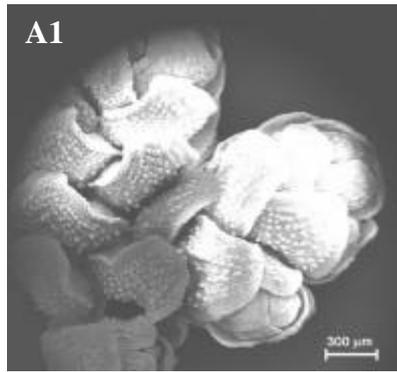
C2 e C3: Epiderme com células túrgidas saudáveis e estômatos íntegros (e).

D: *Lemna gibba* cultivadas em solução de Hoagland contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de atrazine, (3 dias de exposição).

D1: Superfície abaxial de folha, com bordos enrolados e cera removida (c);

D2: Superfície abaxial com cera removida (c), meristema apical da raiz danificado com células plasmolisadas (m);

D3: Superfície adaxial com células desorganizadas, cera removida (c), estômatos fechados (e) com células-guarda danificadas.



4. DISCUSSÃO

As macrófitas aquáticas estudadas neste trabalho tiveram toda a superfície abaxial da folha em contato constante com a solução. Este fato permitiu que a atrazine tenha sido absorvida por dois mecanismos diferentes: absorção pelas raízes e translocação do herbicida até as folhas e, absorção direta pelas folhas que ficaram em contato direto com a solução (Rodrigues e Almeida, 2005).

O modo de ação da atrazine consiste em bloquear o fluxo de elétrons do fotossistema II, impedindo a produção de energia e do poder redutor, essenciais para a etapa de fixação de carbono no processo da fotossíntese (Brian, 1969; Health Canada, 1993; De Prado *et al.*, 1995; EPA, 2003b). A atrazine provoca fitotoxicidade com manifestações de clorose e necrose, levando as plantas susceptíveis à morte. O bloqueio da fotossíntese, pode ser diagnosticado pelas cloroses e necroses das folhas, ausência de ganho de massa seca, seguida de morte das plantas. Estes sintomas foram observados nas três espécies de macrófitas estudadas neste trabalho, quando estas foram expostas as concentrações acima de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ do herbicida. Em função destes fatos, deduz-se que *A. caroliniana*, *S. minima* e *L. gibba*, provavelmente, não possuem mecanismos eficientes para tolerar e minimizar os efeitos da atrazine nas concentrações estudadas, demonstrando baixa eficiência de remoção do herbicida em ambientes contaminados.

Lemna gibba foi capaz de remover atrazine, em pequenas quantidades, quando exposta a solução cuja concentração foi igual a $0,01 \text{ mg L}^{-1}$, mantendo inalterado o ganho de massa fresca e seca pelas plantas e demonstrando baixo potencial, para remover atrazine nestas condições. Este herbicida é usado em culturas de monocotiledôneas, como o milho, que apresentam mecanismos de tolerância ao herbicida, os quais envolvem a ação de glutatona (De Prado *et al.*, 1995; Prade *et al.*, 1998; Cedergreen *et al.*, 2004; Marcacci *et al.*, 2005). *L. gibba*, por ser uma monocotiledônea, pode também possuir mecanismos de detoxificação semelhante, com envolvimento de glutatona. Além disso, algumas espécies de Lemnáceas são consideradas tolerantes a herbicidas triazínicos (Fairchild *et al.*, 1998). É comum a presença de mecanismos de tolerância semelhantes dentre espécies evolutivamente próximas. Marcacci *et al.* (2005) demonstraram o potencial de *Chrysopogon*

zizanioides, na remediação de atrazine quando as plantas foram cultivadas em solução hidropônica. Esta espécie é filogeneticamente próxima ao sorgo, que é uma cultura resistente a atrazine. *C. zizanioides* apresentou processos de detoxificação envolvendo a atuação de glutationas, em folhas, semelhante às plantas de sorgo, sendo, portanto, extremamente positiva para ser utilizada na descontaminação do ambiente. Portanto, é possível que espécies filogeneticamente próximas possuam os mesmos mecanismos de resistência. Entretanto, em altas concentrações de atrazine no meio, ao final de 6 dias, *L. gibba* apresentou cloroses e as plantas morreram, evidenciando a ineficiência dos mecanismos de detoxificação.

As três macrófitas estudadas removeram a mesma quantidade percentual de atrazine da solução, quando considerada a concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. No entanto, *A. caroliniana* e *L. gibba* produziram menor quantidade de massa fresca que *S. minima*, nas mesmas condições experimentais. Como possuem a mesma eficiência de remoção do herbicida, é recomendável que estas plantas sejam utilizadas como biorremediadoras, visto que um menor ganho de biomassa diminuiria o volume de resíduo vegetal a ser tratado, posteriormente. Apesar da produção abundante de biomassa ser uma característica desejável para fins de remediação (Cunningham e Ow, 1996; Schnoor, 1997; Williams, 2002; Pilon-Smits e Pilon, 2002; Pilon-Smits, 2005), se a eficiência de remoção é a mesma para as três espécies, é aconselhável a utilização daquela que produz menor quantidade de biomassa. Dessa forma, o uso de *A. caroliniana* e *L. gibba* seria indicado para remediação de ambientes com concentrações de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de atrazine na água, visto que produziram menor quantidade de massa fresca. No entanto, *A. caroliniana* produziu menor quantidade de massa seca sendo, portanto, o seu uso mais vantajoso do que o de *L. gibba*.

Quando expostas a solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de atrazine, as três espécies aquáticas foram capazes de remover o mesmo percentual de atrazine da solução (0,42%), entretanto, as plantas estavam mortas, não favorecendo o potencial de nenhuma espécie para a finalidade de remediação.

Na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de atrazine, *A. caroliniana* e *L. gibba* apresentaram maior eficiência de remoção do herbicida, em solução, do que *S. minima*. Sugere-se que este fato esteja relacionado aos processos de adsorção do herbicida nos tecidos vegetais. Como não foi utilizado nenhum meio para retirar a

atrazine adsorvida nas folhas das plantas e, como estas espécies estavam mortas ao final do experimento, a alta concentração de atrazine pode estar associada a maior superfície de contato que as plantas tiveram com a solução, em virtude do tamanho reduzido das plantas. Portanto, é importante verificar a capacidade destas macrófitas em adsorver atrazine, através de experimentos realizados com plantas mortas. Caso o potencial de adsorção seja maior que o de absorção, a utilização de matéria orgânica morta para remoção de atrazine de ambiente aquáticos poluídos seria vantajosa, visto que não existiria a necessidade de monitoramento do crescimento das plantas no ambiente, evitando-se, portanto, a proliferação desordenada das espécies, no ambiente.

Rice *et al.* (1997) demonstraram que a presença de vegetação aquática tolerante a herbicidas pode acelerar a remoção e biotransformação de atrazine em água. *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* e *Lemna minor* foram capazes de remover 58,3, 36,8 e 15% de atrazine em água, respectivamente, enquanto, as macrófitas estudadas nesse trabalho: *A. caroliniana*, *S. minima* e *L. gibba* removeram 6,5, 5,1 e 5,6 % da atrazine presente em solução. Além disso, a ocorrência de clorose, seguida de morte das plantas, poderia ser um indicativo de que as plantas possuem mecanismos ineficientes de detoxificação de atrazine (Burken e Schnoor, 1996; Burken e Schnoor, 1997), associada a uma baixa eficiência para remediar ambientes aquáticos contaminados pelo herbicida.

Para solos contaminados com herbicidas, já existem bons resultados de plantas arbóreas com potencial fitorremediador. Estudos realizados por Burker e Schnoor (1996; 1997) demonstraram que *Populus deltoides* nigra DN34 foi capaz de absorver cerca de 90% da atrazine do meio, em 10 dias, sem apresentar sintomas característicos de toxicidade, tais como clorose. Singh *et al.* (2004) demonstraram que *Pennisetum clandestinum* é capaz de degradar 45% da atrazine presente no solo, em 80 dias, sem apresentar sintomatologia características de toxicidade por atrazine. Esses dados são bastante satisfatórios, visto que a meia vida da atrazine no campo é de 60 dias (Rodrigues e Almeida, 2005). As plantas resistentes, apresentaram mecanismos de detoxificação do herbicida envolvendo a ação de glutatona, via atividade da enzima glutatona-S- transferase (De Prado *et al.*, 1995; Prade *et al.*, 1998; Marcacci *et al.*, 2005). Warwick (1991) sugere que o mecanismo de resistência

de várias plantas a atrazine esteja, também, relacionado às modificações genéticas de genes que codificam proteínas do fotossistema II.

O processo de degradação de atrazine no ambiente, também, está fortemente relacionado à presença de microrganismos. A degradação de atrazine, em solos vegetados, é maior do que em solos sem plantas, em virtude da relação harmônica existente entre plantas e microrganismos da rizosfera (Pires *et al.*, 2003a; Pires *et al.*, 2003b; Singh *et al.*, 2004). Este processo está relacionado à liberação de exsudatos pelas plantas que estimulam o crescimento microbiano e favorecem a rizodegradação (Burken e Schnoor, 1996; Andersona *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2003a; Pires *et al.*, 2003b; Singh *et al.*, 2004). Os microrganismos utilizam os herbicidas como fonte de carbono e nitrogênio, metabolizando-os e mineralizando o poluente (Pires *et al.*, 2003a; Pires *et al.*, 2003b; Singh *et al.*, 2004). É possível que essa relação se mantenha nos sistemas aquáticos. Portanto, o uso de macrófitas, com sistema radicular volumoso torna-se recomendável, a fim de criar um ambiente propício à atividade microbiana. No entanto, este trabalho se preocupou em verificar o potencial das plantas para serem utilizadas em futuros estudos de remediação, sendo as plantas previamente desinfetadas, a fim de evitar a interferência e a proliferação dos microrganismos nos experimentos em curso.

A formação de metabólitos de atrazine é considerada um processo de detoxificação (Burken e Schnoor, 1997). Dessa forma, estudos de subprodutos do herbicida nas macrófitas estudadas poderiam indicar a existência de algum mecanismo de detoxificação de atrazine, pelas mesmas. No entanto, em virtude dos sintomas de toxicidade apresentados, é provável que as plantas, deste trabalho, possuam mecanismos ineficientes de detoxificação ao herbicida.

O potencial apresentado pelas espécies estudadas para remediação de ambientes contaminados, com altas concentrações de atrazine, provavelmente, estejam relacionados aos processos de adsorção do herbicida. Dessa forma, um fato importante que deverá ser considerado é a permanência das plantas, em local contaminado, visto que o herbicida poderá retornar ao ambiente.

É importante ressaltar que, a eficiência da remediação de atrazine, em solução, diminuiu com o aumento da concentração do poluente no meio, demonstrando a eficiência do uso da técnica de fitorremediação para os ambientes

com baixa a média contaminação (Cunningham e Ow, 1996; Garbisu e Alkorta, 2001; Williams, 2002; Tsao, 2003; Suresh e Ravishankar, 2004; Pilon-Smits, 2005).

5. CONCLUSÃO

A atrazine, inibidora do processo de fotossíntese, comprometeu o ganho de massa fresca e seca das macrófitas aquáticas, flutuantes, estudadas neste trabalho, causando, inclusive a morte das plantas. A ocorrência de cloroses e necroses demonstraram a sensibilidade das espécies ao herbicida.

Das três espécies estudadas, *L. gibba* foi a que apresentou maior potencial de remoção de atrazine, da solução, quando exposta a baixas concentrações. No entanto, em altas concentrações de atrazine, *A. caroliniana* apresentou o mesmo potencial que *L. gibba*.

As três espécies estudadas, apesar de apresentarem grande potencial fitorremediador para poluentes inorgânicos, não foram potencialmente eficientes na remoção de atrazine, nas condições estudadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksorn, E., e Visoottiviseth, P. 2004. Selection of suitable emergent plants for removal of arsenic from arsenic contaminated water. *ScienceAsia* 30:105-113.
- Anderson, C. e Noyes, S. W. 2002. Agriculture Chemical Usage. Disponível em <http://www.usda.gov>. Acessado em 27-1-2005.
- Andersona, K. L., Wheelerb, K. A., e Robinsonb, J. B. 2002. Atrazine mineralization potential in two wetlands. *Water Research* 36:4785-4794.
- Axtell, N. R., Sternberg, S. P. K., e Claussen, K. 2003. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. *Bioresource Technology* 89:41-48.
- Brian, R. C. 1969. The Classification of Herbicides and Types of Toxicity. *In* Audus, L. J. editor. *The Physiology and Biochemistry of Herbicides*. Academic Press, London. 555p.
- Burken, J. G., e Schnoor, J. L. 1996. Phytoremediation: Plant uptake of atrazine and role of root exudates. *Journal of Environmental Engineering* 958-963.
- Burken, J. G., e Schnoor, J. L. 1997. Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environmental Science & Technology* 31:1399-1406.
- Cedergreen, N., Streibig, J. C., e Spliid, N. H. 2004. Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron-methyl. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57:153-161.
- Cerdeira, A. L., Santos, N. A. G., Pessoa, M. C. P. Y., Gomes, M. A. F., e Lanchote, V. L. 2005. Herbicide Leaching on a Recharge Area of the Guarany Aquifer in Brazil. *Journal of Environmental Science and Health*, 40:159-165.
- Conama. 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento

de efluentes, e dá outras providências. Disponível em <http://www.mma.gov.br>. Acessado em 10-6-0005.

Cunningham, S., e Ow, D. W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110:715-719.

De Prado, R., Romera, E., e Menendez, J. 1995. Atrazine detoxification in *Panicum dichotomiflorum* and target site *Polygonum lapathifolium*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 52:1-11.

EPA. 2002. Overview of atrazine risk assessment. Disponível em <http://www.epa.gov>. Acessado em 29-1-2005.

EPA. 2003a. Atrazine Interim Reregistration Eligibility Decision (IRED) Q&A's. Disponível em <http://www.epa.gov>. Acessado em 10-10-2005a.

EPA. 2003b. Atrazine: Analysis of risks. Disponível em <http://www.epa.gov>. Acessado em 1-11-2005b.

EPA. 2005. List of Drinking Water Contaminants & MCLs. Disponível em <http://www.epa.gov>. Acessado em 1-12-2005

Fairchild, J. F., Ruessler, D. S., e Carlson, A. R. 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Journal of Environmental Toxicology and Chemistry* 17:1830-1834.

Gao, J., Garrison, A. W., Hoehamer, C., Mazur, C. S., e Wolfe, N. L. 2000. Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:6114-6120.

Garbisu, C., e Alkorta, I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* 77:229-236.

- Garcinuno, R. M., Fernandez-Hernando, P., e Camara, C. 2003. Evaluation of pesticide uptake by *Lupinus* seeds. *Water Research* 37:3481-3489.
- Gilliom, R. J., e Barbash, J. E. 1999. Testing water quality for pesticide pollution. *Environmental Science and Technology* 33:164-169.
- Health Canada. Atrazine. Government of Canada Publications [H48-10/1-11-1993-IN]. 1993. Canada. 20-6-2005.
- Hoagland, D. R., e Arnon, D. I. 1950. The water - culture method for growing plants without soil. University of California, Berkeley.
- IBGE. 2005. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 20-1-2005.
- Jain, S. K., Vasudevan, P., e Jha, N. K. 1990. *Azolla pinnata* R.Br. and *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water. *Water Research* 24:177-183.
- Konstantinou, I. K., Hela, D. G., e Albanis, T. A. 2005. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution In Press, Corrected Proof*.
- Lanyi, K., e Dinya, Z. 2003. Photodegradation study of some triazine-type herbicides. *Microchemical Journal* 75:1-14.
- Lanyi, K., e Dinya, Z. 2005. Photodegradation study for assessing the environmental fate of some triazine-, urea- and thiolcarbamate-type herbicides B. *Microchemical Journal* 80:79-87.
- Lawrence, J. F., Menard, C., Hennion, M. C., Pichon, V., LeGoffic, F., e Durand, N. 1996. Evaluation of immunoaffinity chromatography as a replacement for organic solvent clean-up of plant extracts for the determination of triazine

- herbicides by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 752:147-154.
- Marcacci, S., Raveton, M., Ravanel, P., e Schwitzguebel, J.-P. 2005. Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany In Press, Corrected proof*.
- Mkandawire, M., e Dudel, E. G. 2005. Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L.(duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *The Science of the Total Environment* 336:81-89.
- Outridge, P. M., Rauser, W. E., e Hutchinson, T. C. 1991. Changes in metal-binding peptides due to acclimation to cadmium transferred between ramets of *Salvinia minima*. *Oecologia* 88:109-115.
- Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, D. G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., e Vlachou, P. 2004a. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part I. Monitoring study in the north part of the basin. *Science of the Total Environment* 321:127-146.
- Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, D. G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., e Vlachou, P. 2004b. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin. Part II. Monitoring study in the south part of the basin. *Science of the Total Environment* 321:147-164.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 56:15-39.
- Pilon-Smits, E., e Pilon, M. 2002. Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Science* 21:439-456.

- Pires, F. R., Souza, C. M., Silva, A. A., Procópio, S. O., e Ferreira, L. R. 2003a. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. *Planta Daninha* 21:335-341.
- Pires, F. R., Souza, C. M., Silva, A. A., Queiroz, M. E. L. R., Procópio, S. O., Santos, J. B., Santos, E. A., e Cecon, P. R. 2003b. Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de Tebuthiuron. *Planta Daninha* 21:451-458.
- Prade, L., Huber, R., e Bieseler, B. 1998. Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione-S-transferase explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure* 6:1445-4452.
- Rice, P. J., Anderson, T. A., e Coats, J. R. 1997. Phytoremediation of herbicide-contaminated surface water with aquatic plants. *In* American Chemical Society editor. *Phytoremediation of soil and water contaminants*. Washington, DC.
- Rodrigues, B. N., e Almeida, F. S. 2005. Guia de herbicidas, 5^a edição. Editora Gráfica, Londrina
- Schnoor, J. L. 1997. Phytoremediation. *Techonology Evaluation Report* TE-98-01:1-31.
- Sindag. 2003. Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa agrícola. Disponível em <http://www.sindag.com.br>. Acessado em 20-1-2005.
- Singh, N., Megharaj, M., KooKana, R. S., e Naibu, R. 2004. Atrazine and simazine degradation in *Pennisetum* rhizosphere. *Chemosphere* 56:257-263.
- Suresh, B., e Ravishankar, G. A. 2004. Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical Reviews in Biotechnology* 24:97-124.
- Tryon, R. M., e Tryon, A. F. 1982. *Ferns and allied plants*. Springer-Verlag, New York.

- Tsao, D. T. 2003. Overview of phytotechnologies. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 78:1-50.
- Ueta, J. M. 2004. Biorremédio é mais eficiente na degradação de herbicidas no solo. Disponível em <http://www.biotechnologia.com.br>. Acessado em 20-1-2005.
- Ueta, J. M., Pereira, N. L., Shuhama, I. K., e Cerdeira, A. L. 1999. Biodegradação de herbicidas e biorremediação. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 10:10-13.
- Warwick, S. I. 1991. Herbicide resistance in weedy plants: physiology and population biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:95-114.
- Williams, J. B. 2002. Phytoremediation in wetland ecosystems: progress, problems, and potencial. *Critical Reviews in Plant Science* 21:607-635.
- Zayed, A., Gowthaman, S., e Terry, N. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality* 27:715-7.

CONCLUSÃO GERAL

Dentre as três macrófitas aquáticas testadas, neste estudo, *L. gibba* demonstrou o maior potencial para remoção de arsênio da solução. Apesar de apresentar sintomas de toxicidade ao metalóide esta planta pode ser considerada uma hiperacumuladora de As. O potencial fitorremediador desta espécie pode ser otimizado em ambientes com baixas concentrações de fosfato ou, através de técnicas de melhoramento genético.

Lemna gibba, também, apresentou maior potencial do que as demais espécies para remediação de atrazine, quando exposta a baixas concentrações do herbicida. No entanto, as três macrófitas demonstraram sensibilidade ao herbicida, quando expostas a elevadas concentrações. Nestas condições, quando as plantas estavam mortas, *A. caroliniana* demonstrou potencial igual ao de *L. gibba* para remoção de atrazine, provavelmente, devido a processos de adsorção.

A eficiência de remoção dos poluentes estudados (arsênio e atrazine), diminuiu quando as plantas foram expostas a altas concentrações dos mesmos, demonstrando a limitação do uso destas espécies para a fitorremediação de ambientes aquáticos altamente impactados.