

**JURACI ALVES DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A ABSORÇÃO, A  
DISTRIBUIÇÃO E A ASSIMILAÇÃO DE ENXOFRE EM AGUAPÉ  
(*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) e SALVÍNIA (*Salvinia auriculata* Aubl.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
DEZEMBRO - 1998

JURACI ALVES DE OLIVEIRA

EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A ABSORÇÃO, A  
DISTRIBUIÇÃO E A ASSIMILAÇÃO DE ENXOFRE EM AGUAPÉ  
(*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) e SALVÍNIA (*Salvinia auriculata* Aubl.)

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Curso de Fisiologia  
Vegetal, para obtenção do título de  
“Doctor Scientiae”.

APROVADA: 6 de outubro de 1998



---

Marcelo Valle de Sousa  
(Co-Orientador)

---

Cláudio Pereira Jordão  
(Conselheiro)

---

Paulo Roberto Mosquim

---

Renildes Lúcio Ferreira Fontes

---

José Cambraia  
(Orientador)

A Deus, por mais esta oportunidade.

A minha esposa, Marta, pelo amor e pela compreensão.

## AGRADECIMENTO

Às seguintes instituições: Universidade Federal de Viçosa (UFV); Universidade de Brasília (UnB), por meio do Centro Brasileiro de Seqüenciamento e Química de Proteínas (CBSQP); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela oportunidade de realizar o Curso e pelas facilidades no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores: José Cambraia (orientador), com admiração, pela orientação; Marcelo Valle de Sousa (co-orientador), pelo apoio e pela receptividade na UnB e no laboratório do CBSQP; Taís A. Pitta Cotta, do Departamento de Química da UnB, pelo apoio, pela amizade e pela valiosa colaboração; Geraldo Resende Boaventura, do Departamento de Geoquímica e Recursos Minerais, do Instituto de Geociências da UnB, pela disponibilidade do equipamento nas análises de Cd; Pedro José Portugal Zanotta, Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima e Carlos André Ricart, do Departamento de Bioquímica da UnB, pela amizade e colaboração; e Marco Antônio Oliva Cano, Cláudio Pereira Jordão, Renato Sant'Anna, Raimundo Santos Barros, Aristéa Alves, Paulo Roberto Mosquim, Rolf Puschmann, Fábio Murilo da Matta, Carlos Martinez e Júlio Neves, todos da UFV, pela amizade e pela agradável convivência.

Ao Nuno M. Domingues, Químico do Centro Brasileiro de Seqüenciamento e Química de Proteínas (CBSQP), pela valiosa colaboração.

Ao Gilmar Valente, do Herbário da UFV, pela preparação das plantas de salvinia enviadas para identificação.

Ao Dr. Jefferson Prado, Pteridólogo do Instituto de Botânica de São Paulo, pela identificação da espécie de salvinia utilizada neste estudo.

A José Luís e Lúcia Helena, técnicos do Laboratório de Química Ambiental da UFV, pela prestação na realização das análises de Cd.

A José A. Bhering, Carlos Torres e Jorge Luís, funcionários do Laboratório de Biofísica da UFV; Antônio Cordeiro, José Mauro Balbino, Marco Antônio Aguilar, Carlos Moacir Bonato, Jamil de Moraes Pereira, José Francisco de Carvalho Gonçalves, Paulo Henrique Pereira Peixoto e Nátia Élen Auras, colegas de curso; e Marluci Ribeiro, Sílvia das Graças Pompollo, Tânia Mara Salomão, Mara Tavares, Everaldo Barros e José Eduardo Serrão, colegas do Departamento de Biologia Geral da UFV, pela amizade, pela colaboração e pelo companheirismo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

Juraci Alves de Oliveira, filho de José Lucas de Oliveira e Maria Alves dos Santos, nasceu na Cidade de Vila Matias, MG, no dia 23 de abril de 1965.

Em julho de 1988, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde, nesse mesmo ano, iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na área de Ecofisiologia Vegetal, defendendo tese em dezembro de 1991.

Em março de 1992, iniciou o Curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na UFV.

Em maio de 1993, foi contratado pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), de onde saiu, em dezembro daquele mesmo ano, para ser contratado pelo Departamento de Biologia Geral da UFV.

No dia 6 de outubro de 1998, defendeu tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal na UFV.

## CONTEÚDO

	Página
EXTRATO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1. Obtenção e adaptação das plantas .....	15
3.2. Escolha da solução nutritiva .....	15
3.3. Efeito do cádmio sobre a taxa de crescimento relativo .....	16
3.4. Determinação do cádmio adsorvido e absorvido .....	18
3.5. Cinética de absorção de cádmio .....	18
3.6. Acúmulo e distribuição de cádmio .....	19
3.7. Efeito do cádmio sobre a absorção e a assimilação de enxofre .	20
3.7.1. Cinética de absorção de enxofre .....	20
3.7.2. Determinação da atividade da enzima sulfurilase do ATP ...	21
3.7.3. Determinação de compostos tiolados .....	22
3.7.3.1. Extração e determinação da concentração de compostos tiolados totais .....	22

	Página
3.7.3.2. Extração e determinação das concentrações de cisteína, $\gamma$ -glutamilcisteína e glutathiona .....	23
3.7.3.3. Extração e determinação de compostos complexantes de Cd .....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4.1. Escolha da solução nutritiva .....	26
4.2. Sintomas externos de toxidez do Cd .....	30
4.3. Efeito do Cd sobre a taxa de crescimento relativo .....	31
4.4. Influência do tempo e da concentração de Cd sobre as frações adsorvidas e absorvidas deste elemento .....	35
4.4.1. Dessorção de Cd em função do tempo .....	35
4.4.2. Efeito da concentração de Cd sobre as frações adsorvida e absorvida deste elemento .....	36
4.5. Absorção de Cd .....	38
4.6. Acúmulo e distribuição de Cd .....	42
4.7. Efeito do Cd sobre a absorção e a assimilação de enxofre .....	49
4.7.1. Cinética de absorção de enxofre .....	49
4.7.2. Efeito do Cd sobre a atividade da sulfúrilase do ATP .....	52
4.7.3. Efeito do Cd sobre a concentração de tióis solúveis totais, cisteína, $\gamma$ -glutamilcisteína e glutathiona .....	53
4.7.4. Efeito do Cd sobre a produção e o acúmulo de compostos complexantes de Cd .....	60
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
APÊNDICE .....	83



## EXTRATO

OLIVEIRA, Juraci Alves de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 1998. **Efeito do cádmio sobre a absorção, a distribuição e a assimilação de enxofre em aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) e salvinia (*Salvinia auriculata* Aubl.)**. Orientador: José Cambraia. Co-orientador: Marcelo Valle de Sousa. Conselheiros: Marco Antônio Oliva Cano e Cláudio Pereira Jordão.

A absorção e a distribuição do cádmio (Cd) em níveis tóxicos, assim como os seus efeitos sobre a absorção, redução e assimilação do enxofre e algumas variáveis de crescimento, foram estudadas em duas espécies aquáticas: *Eichhornia crassipes* (aguapé) e *Salvinia auriculata* (salvinia). A salvinia sofreu maior redução na taxa de crescimento relativo que o aguapé, estando essa redução correlacionada diretamente com as concentrações de Cd nos tecidos. Os Km para absorção de Cd<sup>2+</sup> pelas duas espécies foram semelhantes, mas o Vmax foi maior em salvinia. A absorção de Cd por salvinia e aguapé, elevada nas primeiras horas de exposição, decresceu rapidamente a seguir, permanecendo constante e baixa por até 10 dias. A concentração de Cd nos tecidos de aguapé e salvinia aumentou com a elevação do tempo de exposição, sendo maior em salvinia. O percentual de Cd retido nas raízes de aguapé decresceu com o aumento do tempo de exposição, enquanto em salvinia sua distribuição entre sistema radicular e parte aérea não sofreu alteração. A adição de Cd à solução nutritiva apenas no momento da avaliação cinética da absorção do sulfato resultou em redução do Km e aumento do Vmax em aguapé, mas aumento do Km e nenhuma alteração do Vmax em salvinia. Em presença de Cd, a atividade da sulfúrilase do ATP aumentou nas raízes e na

parte aérea de aguapé; em salvinia, apenas nas folhas. A presença de Cd não alterou as concentrações de tióis solúveis totais em aguapé e salvinia, mas as concentrações de cisteína aumentaram na parte aérea de aguapé e as concentrações de  $\gamma$ -glutamilcisteína, no sistema radicular e na parte aérea de aguapé e salvinia. As concentrações de glutathione reduziram-se apenas no sistema radicular de aguapé, acompanhado de aumento nas concentrações de “outros tióis solúveis”, no sistema radicular e na parte aérea. De modo geral, as plantas de aguapé apresentaram maiores concentrações de tióis do que a salvinia. Em presença de Cd, a maior razão  $A_{265}/A_{280}$  foi 1,64 e 1,74 para folhas e raízes de aguapé, respectivamente, e 1,68 para folhas e raízes de salvinia, o que sempre coincidiu com as maiores concentrações de Cd. A tolerância ao Cd foi maior em aguapé, possivelmente por apresentar menor absorção de Cd em relação à salvinia, tolerância essa associada à maior produção de compostos tiolados relacionados com o mecanismo de tolerância.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Juraci Alves de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, December 1998. **Effects of cadmium on sulphur uptake, distribution and assimilation in water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) and salvinia (*Salvinia auriculata* Aubl.)**. Adviser: José Cambraia. Co-adviser: Marcelo Valle de Sousa. Committee members: Marco Antônio Oliva Cano and Cláudio Pereira Jordão.

Cadmium uptake and distribution at toxic levels and their effects on sulphur uptake, reduction and assimilation as well as some growth variables were studied in the aquatic species *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) and *Salvinia auriculata* (salvinia). Salvinia showed a greater reduction in the relative growth rate than water hyacinth, and this reduction directly correlated with cadmium concentrations in the tissues. The  $K_m$  were similar for uptake of  $Cd^{2+}$  in both species, while the  $V_{max}$  was greater in salvinia. The Cd uptake in both salvinia and water-hyacinth was high at the first hours under exposure, but then it quickly decreased and approximately maintained constant and low for 10 days. The Cd concentration in the water hyacinth and salvinia tissues increased when the exposure time was increased, being higher in salvinia. The Cd percent retained in the water-hyacinth roots decreased with the increasing exposure time, whereas in salvinia its distribution between the root system and the aerial part showed no changes. The addition of Cd to the nutritive solution only when kinetically evaluating the sulphate uptake led to either  $K_m$  reduction and  $V_{max}$  increase in water hyacinth, however a  $K_m$  decreasing and no  $V_{max}$  changes in salvinia. In Cd presence the activity of the ATP sulphurylase increased in the water hyacinth roots

and aerial part, while in salvinia this increase occurred only in the leaves. The Cd presence did not change the concentrations of the total soluble thiols in both the water hyacinth and salvinia, but the concentrations of cysteine increased in the water hyacinth aerial part, and so did those of  $\gamma$ -glutamylcysteine in the water hyacinth and salvinia root systems and aerial parts. Glutathione concentrations only reduced in the water hyacinth root system followed by increase in the root system and aerial part concentrations of “other soluble thiols”. In general, the water hyacinth plants presented higher thiol concentrations than salvinia did. In Cd presence, the greater ratio  $A_{265}/A_{280}$  was 1.64 and 1.74 for the water hyacinth leaves and roots respectively, and 1.68 for salvinia leaves and roots which always coincided with higher Cd concentrations. Water hyacinth showed a greater tolerance to Cd probably because presenting a lower Cd uptake in relation to salvinia; this tolerance was associated with a greater production of those thiolated compounds related to the tolerance mechanism.

## 1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental é um dos principais problemas do mundo moderno, e o entendimento dos seus efeitos sobre os organismos vivos tem envolvido pesquisadores de todo o planeta. Dentre as várias formas de contaminação do meio ambiente resultante de diversas atividades industriais e agrícolas, a com metais pesados tem recebido muita atenção por parte de pesquisadores e órgãos governamentais envolvidos no controle de poluição. Dos diversos problemas ambientais, a poluição das águas tem sido considerada um dos mais sérios.

Os metais pesados tóxicos, além de constituírem formas bastante solúveis, podem concentrar-se em sedimentos fluviais, tornando-se disponíveis para organismos aquáticos e para o homem, dependendo das condições do meio (SALOMONS e FÖRSTNER, 1980). É o caso, por exemplo, do metal pesado cádmio, que se liga preferencialmente às frações carbonácea e residual dos sedimentos, de tal forma que redução acidental do pH da água pode resultar na liberação desse elemento, possibilitando sua conversão para formas biodisponíveis (JORDÃO et al., 1990).

A biodisponibilidade e a toxicidade da maioria dos metais estão diretamente relacionadas à concentração do metal na forma de íon livre na solução e não à sua concentração total. Íons hidrogênio, assim como outros cátions e ânions, podem também influenciar no efeito tóxico de metais pesados nos organismos aquáticos, por meio de vários tipos de interações competitivas. Dentre esses outros íons, o  $\text{Ca}^{2+}$  é um dos mais importantes, podendo proteger o

organismo da absorção do metal ou de sua expressão tóxica (CAMPBELL e SOKES, 1985; KAWASAKI e MORITSUGU, 1987).

O cádmio foi escolhido para este estudo por constituir um problema significativo em vários ambientes aquáticos, sendo tóxico em quantidades traços, além de ser móvel nas plantas. Sua persistência no ambiente e sua presença em uma variedade de formas químicas complexadas e livres resultam em sua incorporação em ciclos biológicos, onde pode exercer efeitos tóxicos a longo prazo (BAKER e WALKER, 1989).

Vários trabalhos têm sido conduzidos, a fim de estudar a capacidade de macrófitas aquáticas em reter metais pesados de soluções poluídas e os mecanismos de tolerância ao metal. Particularmente, o aguapé tem-se demonstrado potencialmente importante na remoção de Cd da água (SELA et al., 1990; FETT et al., 1994).

Outras plantas aquáticas, à semelhança do aguapé, têm sido usadas em processos de purificação de água, manifestando também capacidade de remover vários metais pesados da solução. Entretanto, segundo DUSHENKOV et al. (1995), a eficiência da remoção de metal por algumas plantas é baixa, devido ao seu pequeno tamanho e lento crescimento radicular. Além disso, o alto conteúdo de água dessas plantas poderia, posteriormente, complicar a secagem, a compostagem ou a incineração do material vegetal.

Outras plantas, como a salvinha, pela facilidade de manipulação experimental e por se encontrar disseminada em todo o país, têm sido utilizadas em estudos de tolerância ao Cd e como indicadoras biológicas da presença e dos níveis de metais pesados nos corpos d'água (OUTRIDGE e HUTCHINSON, 1990 e 1991).

Em geral, os organismos vivos são seriamente injuriados por metais pesados como Cd, Pb, Hg e Cu (FUJITA e KAWANISHI, 1986). Entretanto, vários deles são resistentes ou toleram certas quantidades desses metais, pelo fato de possuírem mecanismos de tolerância que lhes permitem desempenhar, dentro de certa “normalidade”, suas funções metabólicas.

O fenômeno de tolerância a metais pesados em plantas tem atraído a atenção de ecologistas, fisiologistas e bioquímicos (REDDY e PRASAD, 1990). A tolerância pode-se manifestar por um processo de exclusão do metal pelas plantas, o que mantém baixos os níveis dos elementos tóxicos na cadeia alimentar, ou por

um processo de inclusão seguido de mecanismos internos de tolerância aos elevados níveis do metal. Esse processo ocorre mais comumente, conferindo às plantas que os exibem utilização potencial em estudos de desintoxicação e despoluição de ambientes aquáticos (VAN STEVENINCK et al., 1992).

A tolerância a metais pesados tem sido relacionada com a capacidade dos organismos em sintetizar peptídios de baixo peso molecular, ricos em enxofre, que participariam na complexação desses metais (DE VOS et al., 1992; GRILL et al., 1989; RUEGSEGGER et al., 1990; RUEGSEGGER e BRUNOLD, 1992).

Este trabalho foi, pois, conduzido com a finalidade de avaliar a absorção e a distribuição do Cd em níveis tóxicos, assim como os seus efeitos sobre a absorção, redução e assimilação do enxofre e algumas variáveis de crescimento em duas espécies de plantas aquáticas: *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms e *Salvinia auriculata* Aubl.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O metal pesado cádmio tem sido muito estudado nos últimos anos, desde a constatação de sua relação com uma severa doença de “quebra de ossos”, denominada “itai-itai” em Toyama, no Japão (KOBAYASHI, 1970). A ocorrência dessa doença foi atribuída ao acúmulo de níveis tóxicos de Cd pela ingestão prolongada de arroz produzido em solos irrigados com água contaminada (FRIBERG, 1974).

As complexas reações dos ecossistemas aquáticos em função da introdução de substâncias tóxicas são governadas pelos seguintes fatores básicos: natureza e concentração do poluente, tempo de exposição, fatores ambientais do sistema afetado, características biológicas dos organismos expostos e presença de outras substâncias tóxicas (MALM et al., 1988).

A FAO/WHO (1972) estabeleceu que a ingestão máxima tolerável de cádmio é de 0,070 a 0,084 mg dia<sup>-1</sup>, para um adulto de 70,0 kg (FOX, 1988). A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera como potável a água cuja concentração de Cd não exceda a 5,0 µg L<sup>-1</sup> (EPA, 1980). No Brasil, entretanto, a concentração máxima permitida em águas destinadas a consumo doméstico, recreação, irrigação de hortaliças e criação de espécies destinadas à alimentação humana é de apenas 1 µg L<sup>-1</sup> (BRASIL, 1986), isto é, 1/5 do valor admissível pela OMS. No rio Paraíba do Sul, em Itatiaia, RJ, entretanto, já foram detectadas concentrações de até 3 µg L<sup>-1</sup> (MALM et al., 1988).



Vários estudos têm mostrado que o Cd é tóxico mesmo em concentrações muito baixas e que é muito lenta a sua eliminação pelo organismo humano (FRIBERG et al., 1974), acumulando-se principalmente no fígado e nos rins. Sua presença em níveis tóxicos pode causar, no homem, problemas cardiovasculares, calcificação dos rins (SALIM et al., 1992), hipertensão (SCHROEDER, 1965) e doenças dos ossos (WALDBOTT, 1973).

O cádmio é um metal altamente tóxico e sem função biológica definida, ocorrendo naturalmente como impureza dos minérios de Zn. É utilizado em grande quantidade pelas indústrias de produção de plásticos, pilhas, baterias, esmaltes, borracha, vidro, tintas e lâmpadas fluorescentes, dentre vários outros produtos (PAGE e BINGHAM, 1973). As principais fontes de contaminação de águas superficiais por Cd são efluentes industriais, metalúrgicos, urbanos ou de mineração, além da deposição de partículas em suspensão no ar (PEYTON et al., 1976). Métodos convencionais de sua remoção do meio incluem troca iônica, precipitação e floculação. Quando esse elemento está em concentrações muito baixas, tais métodos de remoção podem-se tornar ineficazes (DUSHENKOV et al., 1995).

A água de descargas industriais contendo esse metal representa, pois, ameaça para o ambiente aquático e, conseqüentemente, para a cadeia alimentar. O Cd na água pode prejudicar a saúde humana não só pelo seu consumo direto, mas pelo consumo de peixes e outros animais aquáticos ou pelo consumo de produtos agrícolas irrigados com água contaminada por esse metal.

Nas últimas décadas tem surgido grande discussão acerca dos danos potenciais causados pelos metais pesados quando despejados continuamente em ambientes aquáticos. Usualmente, as avaliações desses danos baseiam-se em análises químicas e físicas, sem levar em consideração o impacto dos poluentes sobre o meio ambiente (KOVACS e PODANI, 1986). Dessa forma, é importante monitorar não apenas a introdução desses produtos no ambiente, mas também analisar seus efeitos nas plantas, nos animais e no homem. No primeiro caso, espécies capazes de acumular grandes quantidades de poluentes parecem ser as mais apropriadas. Organismos vivos têm sido mais e mais usados na detecção dos complexos efeitos da poluição ambiental. Um dos objetivos do programa “Man and Biosphere” organizado pela UNESCO é a seleção de bioindicadores que possam ser úteis na detecção do impacto ambiental dos poluentes no ar, no solo e na água.

O referido programa preconiza que bioindicadores devem ser usados adicionalmente às medições de parâmetros físicos e químicos dos ecossistemas.

Na bioindicação direta, embora seja utilizado material biológico, o critério de qualidade ambiental é não-biológico. Nesse caso, as espécies devem ser capazes de acumular concentrações relativamente elevadas de dado poluente sem que o bioindicador seja danificado. No caso da bioindicação indireta, critérios biológicos como alterações morfológicas, citológicas, fisiológicas e bioquímicas são utilizados para avaliar a qualidade ambiental (KOVACS e PODANI, 1986).

Nos estudos de bioindicação (direta ou indireta) em ambientes aquáticos, as plantas devem integrar e monitorar rapidamente variações nas concentrações dos elementos na água, fato esse que justifica a utilização de macrófitas e outras plantas como bioindicadoras (GUILIZZONI, 1991).

Plantas de aguapé têm recebido muita atenção recentemente, tanto pela produção de biomassa como pelo seu potencial uso em programas de proteção ambiental. Essas plantas da espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms são do gênero *Eichhornia* e pertencentes à classe das monocotiledôneas, da família Pontederiaceae. Morfológicamente, são constituídas de um rizoma, do qual partem as raízes e as folhas. O rizoma flutua logo abaixo da superfície da água, protegido por certo número de folhas. A base do pecíolo das folhas normalmente dilata-se, e as células do parênquima aerífero produzem grandes lacunas cheias de ar, permitindo a flutuação das plantas (JOLY, 1976). Essas plantas têm a particular capacidade de absorver e tolerar quantidades de íons de metais pesados muito maiores, comparativamente, que a maioria dos organismos vivos (MURAMOTO e OKI, 1983). De acordo com a literatura, íons de metais pesados absorvidos pela planta acumulam-se em muito maior quantidade nas raízes do que em outros órgãos (WOLVERTON e McDONALD, 1978; COOLEY e MARTIN, 1979). Aparentemente, essas plantas apresentam, pois, grande potencial para serem utilizadas na despoluição de ambientes aquáticos contaminados com metais pesados.

O aguapé, além disso, tem sido considerado um dos mais promissores candidatos ao papel de indicador biológico de níveis traços de metais pesados em sistemas aquáticos. Em experimentos de laboratório, essa planta tem demonstrado grande capacidade para absorver e concentrar Cd, assim como outros metais pesados como o mercúrio, o chumbo e o níquel (WOLVERTON, 1975;

WOLVERTON e McDONALD, 1975). Essa planta foi usada com sucesso pela “National Aeronautics and Space Administration/National Space Technology Laboratories (NASA/NSTL)” para remover substâncias orgânicas e metais pesados de resíduos químicos antes de sua descarga nos cursos d’água (WOLVERTON et al., 1977). Algumas cidades dos Estados Unidos, como San Diego, na Califórnia, e Austin, no Texas, têm utilizado o aguapé no tratamento do esgoto doméstico, o que revela a possibilidade de uso desse sistema em larga escala (COELHO, 1994).

O aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) é uma planta aquática, nativa do Brasil, com raízes exuberantes que servem de “habitat” a microrganismos que ajudam na degradação de matéria orgânica. Essa planta apresenta grande capacidade de sobrevivência e absorção de metais pesados de ambientes poluídos, exercendo, pois, ações filtrante e bioquímica. Assim, suas raízes são capazes de reter partículas sólidas, bem como absorver nutrientes (nitrogênio e fósforo), metais pesados e outras substâncias tóxicas.

Outra vantagem desse vegetal é que não apenas reduz o grau de contaminação dos rejeitos industriais, como também concentra em seus tecidos os materiais absorvidos. Naqueles casos em que as substâncias poluentes são de valor elevado, como o ouro, sua recuperação a partir das plantas justifica sua reciclagem na própria indústria.

Outra espécie utilizada em estudos relacionados à poluição aquática por metais pesados é a salvinia. A *Salvinia auriculata* Aubl. é uma pteridófito aquática rizomatosa, em que cada indivíduo consiste de duas folhas flutuantes com 1,2 a 3,0 cm de largura, opostas e cobertas de pequeníssimos pêlos constituindo o sistema de flutuação da planta, e uma folha submersa, que é finamente dividida em porções filiformes, que se assemelham a raízes, todas ligadas a um nó central; esporocarpos pedicelados; tricomas unidos pelo ápice; e lâmina glabra entre as papilas ou com poucos tricomas esparsos. Outras plantas-filhas surgem vegetativamente de meristemas localizados apical e lateralmente ao nó. Essas plantas poderiam ser utilizadas como indicadores biológicas da presença de metais pesados ou em estudos de tolerância a esses metais (OUTRIDGE e HUTCHINSON, 1990).

Plantas aquáticas podem, dessa forma, ser utilizadas no tratamento de águas oriundas das mais diversas origens, desde aquelas provenientes de atividades

domésticas até aquelas que constituem os efluentes industriais, ou atuar como bioindicadoras de poluentes aquáticos.

A comercialização do processo de rizofiltração, isto é, o uso de raízes de planta para absorver e concentrar metais pesados de efluentes poluídos, parece depender de aspectos econômicos e de vantagens técnicas. As plantas, além de possibilitarem a descontaminação de ambientes poluídos com vários tipos de metais, podem ser aplicadas no tratamento de grandes volumes, mesmo que o metal pesado esteja em baixa concentração (DUSHENKOV et al., 1995).

Reduções de crescimento e de produção de biomassa são respostas gerais da toxicidade dos metais pesados nas plantas (LEPP, 1981) que interferem em importantes processos fisiológicos, como transpiração, respiração e fotossíntese (LEE et al., 1976; VAN ASSCHE et al., 1988).

Os efeitos da toxicidade do Cd nas plantas podem ser detectados, visualmente, por meio de sintomas como clorose, necrose, epinastia e coloração amarronzada das nervuras foliares (RAUSER, 1978). A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais afetados por níveis tóxicos de Cd. Há inibições da biossíntese de clorofila (VAN ASSCHE e CLIJSTERS, 1990; BASZINSKY, 1986; OLIVEIRA et al., 1994), da biossíntese de proteínas do sistema de transporte de elétrons (DE FILIPPIS et al., 1981; BASZINSKY et al., 1980), da fotofosforilação fotossintética (CLIJSTERS e VAN ASSCHE, 1985) e da redução da fixação de CO<sub>2</sub> fotossintético pela inibição da enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (STIBOROVÁ, 1988). Outras enzimas do ciclo de Calvin podem, também, ser inibidas, como a desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato, a cinase da ribulose 5-fosfato (HAMPP et al., 1973) e a anidrase carbônica (LEE et al., 1976).

A interferência dos metais pesados nas enzimas envolvidas na fotossíntese dá-se por dois principais mecanismos de ação: ligação a grupos funcionais, principalmente grupos -SH, envolvidos na ação catalítica e, ou, alterações na integridade estrutural da enzima combinada com a substituição do metal essencial pelo elemento tóxico. Em relação à enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase, tem sido demonstrado que o Cd, em concentrações muito baixas, liga-se *in vitro* a sítios ativos da enzima e, também, provoca alteração na estabilização da estrutura quaternária dessa enzima. Devido ser tal ligação de difícil dissociação, a enzima dissocia-se em suas subunidades e perde a atividade catalítica (STIBOROVÁ, 1988). Em excesso, o Cd inibe a atividade da rubisco na alga *Laminaria*

*saccharina*. Nesse caso, entretanto, o Cd não interage diretamente com a enzima *in vivo*, mas inibe a sua síntese *de novo* (KREMER e MARKHAM, 1982).

Em outros processos metabólicos, ao contrário, a capacidade enzimática pode ser aumentada significativamente, como resultado da síntese *de novo* ou pela ativação de enzimas já presentes, sob níveis elevados de metal pesado (VAN ASSCHE e CLIJSTERS, 1990). Aumento na atividade da enzima peroxidase é considerado resposta comum das plantas à absorção de quantidades tóxicas de Cd (LEE et al., 1976; VAN ASSCHE et al., 1988; OLIVEIRA et al., 1994). Esse efeito, associado ao aumento da atividade de outras enzimas hidrolíticas (ribonuclease, desoxirribonuclease e fosfatase ácida) (LEE et al., 1976), tem sido usado para caracterizar uma resposta prematura de senescência (VAN ASSCHE et al., 1988).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as diferenças de tolerância a metais pesados entre diferentes espécies de plantas. MACNAIR (1981) sugeriu três tipos de mecanismos de tolerância: (1) exclusão do metal do protoplasma pela sua ligação à parede celular; (2) transporte diferencial através das membranas celulares; e (3) complexação e, ou, conversão do metal pesado em espécies de menor toxicidade ou não-tóxicas.

A tolerância a metais pesados parece depender, pelo menos em parte, do decréscimo na absorção desses metais, pois o conteúdo deles nos tecidos das plantas tolerantes é, invariavelmente, menor do que nos das sensíveis. Isso, provavelmente, se torna necessário porque, de modo geral, as enzimas citossólicas das plantas tolerantes são tão sensíveis aos metais pesados quanto as das plantas sensíveis. Dessa forma, o(s) mecanismo(s) de tolerância deve(m) incluir um sistema capaz de manter a atividade química do metal pesado no citossol abaixo de seu limite de toxicidade (ERNST et al., 1992).

Os metais pesados na forma iônica penetram nas raízes e movem-se, apoplásticamente, num fluxo em massa pelo córtex até a endoderme. Na parede radial da endoderme de raízes primárias, as estrias de Caspary constituem barreiras efetivas ao movimento apoplástico desses metais, forçando-os a passar através da membrana plasmática (MARSCHNER, 1995).

Diferenças entre variedades e, ou, cultivares sensíveis e tolerantes dentro de uma mesma espécie têm sido atribuídas a diferenças na capacidade da parede celular em ligar-se a esses metais pesados. A parede celular, por meio de suas cargas elétricas negativas, adsorve diversos íons, reduzindo os efeitos de metais

pesados e, assim, protegendo o protoplasma (FOSTER, 1977). Entretanto, não está claro ainda se essa adsorção é suficiente para conferir tolerância sob condições de concentrações potencialmente tóxicas. A influência da parede celular está limitada a uma faixa específica de concentração de cada metal fitotóxico. Dependendo da concentração do metal pesado, a presença da parede celular parece não influenciar na toxicidade do metal. Assim, acima de certa concentração do metal, a redução no crescimento ocorre na mesma proporção, tanto em espécie tolerante como sensível, o que parece ser reflexo da saturação dos sítios adsortivos da parede celular (MACFIE et al., 1994). Um fator que pode influenciar a adsorção de metais pesados nas paredes celulares é o pH do meio. As cargas negativas da parede celular são dependentes da ionização de grupos químicos de suas moléculas constituintes, essa ionização, por sua vez, depende do pH da solução circundante (VALLEE e ULMER, 1972).

Vários pesquisadores têm relacionado a tolerância a metais pesados com a capacidade dos organismos (animais, fungos e plantas) em sintetizar peptídios de baixo peso molecular que participariam na complexação desses metais pesados. Em animais e fungos são produzidas certas proteínas, denominadas metalotioneínas, que, aparentemente, desempenham papel na desintoxicação de metais pesados na célula. As plantas possuem, também, substâncias similares com capacidade de ligar metais pesados, reduzindo sua toxicidade citoplasmática (KNEER e ZENK, 1992), denominadas fitoquelatinas (GRILL et al., 1985). Esses peptídios são ricos em cisteína e podem-se ligar a metais pesados por meio de seus grupos sulfidrílicos (GRILL et al., 1987). Quimicamente, são poli( $\gamma$ -glutamilcisteinil)glicinas com a estrutura geral  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$  ( $n=2-11$ ) (GEKELER et al., 1989). Essas fitoquelatinas são sintetizadas a partir da glutatona, em reação catalisada pela  $\gamma$ -glutamil-cisteína dipeptidil transpeptidase ou fitoquelatina sintase. Esta enzima requer a presença de íons de metais pesados para sua ativação, sendo o  $\text{Cd}^{2+}$  um dos seus principais ativadores (GRILL et al., 1989). É interessante notar que as diferentes espécies de plantas expostas a metais pesados essenciais ou não produzem esses peptídios, ricos em grupos sulfidrílicos, a partir de um mesmo precursor, que é a glutatona (DE VOS et al., 1992; GRILL et al., 1989; RUEGSEGGER et al., 1990; RUEGSEGGER e BRUNOLD, 1992).

A glutatona, por sua vez, é sintetizada pela ação das enzimas sintetase da  $\gamma$ -glutamilcisteína e sintetase da glutatona, com gasto de ATP (RUEGSEGGER et

al., 1990; STEFFENS, 1990). A glutationa (GSH) é um tripeptídeo ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) que parece estar envolvido em vários processos metabólicos das células vegetais (RENNENBERG, 1987; TUKENDORF, 1993). Constitui fonte endógena de enxofre reduzido, sendo importante na redução, no armazenamento e na translocação do enxofre (SCHMIDT e JAGER, 1992). Desempenha papel na proteção de membranas biológicas contra a ação de radicais livres (ALSCHER, 1989) e participa do mecanismo de tolerância das plantas a vários poluentes gasosos (SMITH et al., 1990) e íons de metais pesados (GRILL et al., 1985).

STEFFENS (1990) observou que plantas expostas a níveis tóxicos de Cd cresciam melhor quando eram supridas com altos níveis de sulfato. Com a maior absorção de S, ele verificou mais intensa assimilação de sulfato e, conseqüentemente, maior tolerância a altos níveis de metal pesado. Os grupos -SH, além de importantes em reações de oxirredução na célula, atuam na quelatação de metais, suprimindo S para formar sulfetos nos complexos fitoquelatina-metal.

Devido à sua capacidade de se ligar a metais pesados, tem sido atribuído às fitoquelatinas importante papel na homeostase e na desintoxicação desses metais (GRILL et al., 1988; RAUSER, 1990; STEFFENS, 1990). Em diversas espécies, o aumento na tolerância a metais pesados tem sido relatado ser devido à elevação nos níveis de fitoquelatinas, precedida de aumento da atividade das enzimas envolvidas em sua biossíntese (STEFFENS et al., 1986; JACKSON et al., 1987), ou a uma produção mais rápida de moléculas mais longas de fitoquelatinas, que formariam complexos mais estáveis com os metais pesados (DELHAIZE et al., 1989). Além disso, aumento na tolerância tem sido atribuído a acréscimo na incorporação de íons sulfeto no complexo metal-fitoquelatina (REESE e WINGE, 1988; VERKLEIJ et al., 1990), elevando-se a estabilidade e a quantidade potencial de metal ligado por unidade de SH-fitoquelatina (STEFFENS, 1990).

A capacidade de a fitoquelatina se ligar ao Cd e a outros metais pesados é fortemente dependente do pH, uma vez que os grupos sulfidrílicos podem-se apresentar mais ou menos protonados. No entanto, a dissociação do complexo Cd-fitoquelatina também depende do valor do pH do meio, da espécie de planta e do tamanho da cadeia peptídica. Deslocamento de cerca de 50% do Cd que estava sob a forma de complexo ocorreu em pH 4,4 em plantas de repolho e entre pH 5 e 5,8 em plantas de fumo (WAGNER, 1984). HAYASHI et al. (1988) observaram dissociação de 50% do metal da glutationa ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), da ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>2</sub>-Gly e

da  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_3\text{-Gly}$ , nos valores de pH 6,4, 5,4 e 4,9, respectivamente, indicando que o aumento no comprimento da cadeia elevou a afinidade de ligação do Cd (HAYASHI e NAKAGAWA, 1988).

O aumento de tolerância das plantas ao Cd, entretanto, não está ligado apenas à produção de fitoquelatinas, mas envolve também o seu giro metabólico e a taxa de transporte dos complexos fitoquelatina-Cd através do tonoplasto. Assim, um sistema mais eficiente de transporte do complexo fitoquelatina-Cd para o vacúolo resultaria em maior tolerância das plantas (DE KNECHT et al., 1994).

Segundo VÖGELI-LANGE e WAGNER (1990), as fitoquelatinas poderiam ser consideradas como carregadores de metais pesados para o vacúolo e não apenas um sistema para complexação puramente citoplasmático. Isso significa que a capacidade de complexação das fitoquelatinas dependeria do giro metabólico e não apenas de sua concentração na célula.

A participação efetiva de fitoquelatinas nos processos de tolerância diferencial a metal pesado, entretanto, tem sido questionada por alguns pesquisadores. Segundo DE KNECHT et al. (1992), as evidências de um papel das fitoquelatinas nesses processos apresentadas até agora não são convincentes. Em diversos estudos, as plantas tolerantes ao Cd produziram mais fitoquelatinas que as sensíveis (STEFFENS et al., 1986; JACKSON et al., 1987), dando suporte à hipótese de participação das fitoquelatinas no processo de tolerância. Entretanto, em vários outros experimentos, tais diferenças não foram observadas (HUANG et al., 1987; DELHAIZE et al., 1989; VERKLEIJ et al., 1990). Infelizmente, várias comparações entre plantas tolerantes e sensíveis têm sido feitas após períodos de exposição muito longos (semanas) ou sob concentrações extremamente elevadas. As aparentes diferenças na quantidade de fitoquelatinas ou na incorporação de sulfeto lábil podem não ser boa indicação da sensibilidade das plantas expostas ao Cd.

A produção de grande quantidade desse polipeptídeo ligante de metal não confere, por si só, tolerância das plantas ao metal (JACKSON et al., 1989), mas parece representar apenas parte do mecanismo de tolerância. A incorporação de várias moléculas de cisteína nas fitoquelatinas requer aumento na taxa de redução assimilatória do sulfato em plantas expostas ao Cd (RUEGSEGGER et al., 1990).



A maior parte do S absorvido é transportada para a parte aérea, onde se dá a redução, embora algumas espécies sejam capazes de reduzir parte do sulfato em suas raízes (PATE, 1965).

O sulfato transportado para as células foliares pode ser incorporado em compostos orgânicos via rota assimilatória ou armazenado como sulfato livre nos vacúolos. O sulfato vacuolar constitui, em alguns casos, até 99% do S total, como se observou em *Lemna minor* (SALYSBURY e ROSS, 1992). Além de aumentarem a absorção, as plantas precisam manter elevada a atividade das enzimas sulfúrilase do ATP e adenosina 5'-fosfossulfato sulfotransferase (APSSTase), enzimas fundamentais no processo de redução assimilatória do sulfato.

O primeiro passo na assimilação do S é a ativação do íon  $SO_4^{2-}$  por reação com o ATP. Nessa reação, a enzima sulfúrilase do ATP catalisa a substituição de dois grupos fosfatos do ATP por um grupo sulfúril, formando adenosina fosfossulfato (APS) e pirofosfato. Em seguida, a enzima APSSTase catalisa a transferência do sulfato do APS para a glutationa-SH, formando a glutationa-S-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Segue-se a transferência de elétrons da ferredoxina para a redução do grupo tiosulfato e a incorporação/assimilação do grupo -SH à ortoacetil serina, resultando em acetato e cisteína. A cisteína, como primeiro produto estável formado, atua como precursor da síntese de todos os outros compostos orgânicos sulfurados, sendo essencial para a síntese de proteínas (MARSCHNER, 1995).

A enzima sulfúrilase do ATP, como descrito anteriormente, catalisa a primeira reação do processo de assimilação do sulfato inorgânico (ADAMS e JOHNSON, 1968). Essa enzima é amplamente distribuída na natureza e parece ser formada por um dímero assimétrico de 57 kD por subunidade (OSSLUND et al., 1982). A atividade da enzima é regulada tanto pela nutrição do S quanto do N. A sulfúrilase do ATP é reprimida quando existe S suficiente para suportar um crescimento ótimo, sendo desreprimida quando o S se torna limitante para o crescimento (REUVENY e FILNER, 1977). Dessa forma, a assimilação do S estaria sujeita a dois tipos de controle: um mecanismo de controle negativo, em que o produto final, possivelmente um composto contendo S reduzido, atuaria no sentido de reprimir a síntese da enzima; e um mecanismo de controle positivo, em que os produtos da assimilação do N atuariam na desrepressão da síntese da enzima sulfúrilase do ATP (REUVENY e FILNER, 1977; ZINK, 1984).

Recentemente, DE KNECHT et al. (1995) demonstraram uma relação direta entre a atividade da sulfúrilase do ATP e o aumento na concentração de fitoquelatinas, em plantas expostas a metais pesados.

Intensa síntese de fitoquelatinas provocada pela presença de metal pesado no meio de cultivo requererá, provavelmente, grandes quantidades de cisteína para sustentar sua biossíntese (STEFFENS, 1990), tornando-se imperativo o suprimento adequado de sulfato para as plantas. Espera-se que haja, portanto, íntima relação entre absorção, redução e incorporação de enxofre e tolerância das plantas a metais pesados, assumindo que as fitoquelatinas sejam importantes componentes do complexo mecanismo de tolerância das plantas a metais pesados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção e adaptação das plantas

Plantas aquáticas das espécies *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms e *Salvinia auriculata* Aubl. foram coletadas na Estação de Piscicultura e na lagoa do Belvedere da Universidade Federal de Viçosa, respectivamente, por serem locais que não recebem qualquer despejo de resíduos laboratoriais ou de animais em criação. Elas foram selecionadas quanto a uniformidade de tamanho e aspectos das folhas e raízes, lavadas por 1 min em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) e em água corrente e mantidas por 24 horas em água desmineralizada, antes de qualquer tratamento. Após esse período, foram transferidas para recipientes de polietileno ( $0,35 \times 0,30 \times 0,17$  m) com 10 L de solução nutritiva de Hoagland, com 1/5 da força iônica original, pH 7, e colocadas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $230 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), sob fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por três dias, tendo a solução nutritiva sido trocada diariamente.

#### 3.2. Escolha da solução nutritiva

A escolha da solução nutritiva utilizada nos diversos experimentos foi feita pela comparação de dois tipos de soluções nutritivas comumente recomendadas: a de HOAGLAND e ARNON (1950) e a de CLARK (1975). Em um primeiro ensaio

foram utilizadas as soluções conforme recomendadas por esses autores, com 1/5 da força iônica original e pH ajustado para 7,0. As soluções nutritivas, após a diluição, apresentavam as seguintes concentrações de nutrientes:

- **Solução de Hoagland e Arnon**

$N - NO_3^- = 2,8$ ;  $N - NH_4^+ = 0,2$ ;  $P = 0,2$ ;  $K = 1,2$ ;  $Ca = 0,8$ ;  $Mg = 0,4$ ;  
 $S = 0,4$  (mmol L<sup>-1</sup>);  $Mn = 1,8$ ;  $Zn = 0,16$ ;  $Cu = 0,06$ ;  $B = 9,3$ ;  
 $Mo = 0,02$ ; e  $Fe = 6,4$  (μmol L<sup>-1</sup>).

- **Solução de Clark**

$N - NO_3^- = 1,4$ ;  $N - NH_4^+ = 0,18$ ;  $P = 0,01$ ;  $K = 0,36$ ;  $Ca = 0,52$ ;  
 $Mg = 0,12$ ;  $S = 0,1$  (mmol L<sup>-1</sup>);  $Mn = 1,4$ ;  $Zn = 0,4$ ;  $Cu = 0,1$ ;  $B = 3,8$ ;  
 $Mo = 0,12$ ; e  $Fe = 7,6$  (μmol L<sup>-1</sup>).

No segundo ensaio, essas mesmas soluções foram comparadas, tendo, nesse caso, todo o N sido fornecido na forma de nitrato. Nos dois ensaios foram colocadas plantas em número suficiente para se atingir uma massa fresca de aproximadamente 10 g por vaso contendo 500 mL de solução nutritiva. As determinações de pH, após a homogeneização da solução, foram realizadas com a utilização de potenciômetro, sendo uma no início dos ensaios e as demais em intervalos de 6 h até completar 24 h.

Ambos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com parcela dividida, no esquema fatorial 2 × 2 × 3 (espécies vegetais × soluções nutritivas × repetições).

### **3.3. Efeito do cádmio sobre a taxa de crescimento relativo**

Após o período de adaptação, conforme descrito em 3.1, determinou-se o peso da matéria fresca inicial, sendo as plantas imediatamente transferidas para vasos de polietileno com 2 L da solução nutritiva anteriormente selecionada (item 3.2), ou seja, solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) com 1/5 da força iônica, em pH 7, com todo o nitrogênio fornecido na forma de nitrato, contendo ou

não Cd na forma de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , nas seguintes concentrações (em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ): 0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; e 20,0. As plantas foram selecionadas de modo que o peso da matéria fresca em cada vaso fosse aproximadamente o mesmo. O peso de matéria seca inicial foi estimado a partir de amostras de plantas tomadas do mesmo lote daquelas utilizadas no experimento.

No quinto dia a partir do início dos tratamentos, a solução nutritiva foi trocada e, no décimo dia, o material vegetal foi colhido. As plantas foram lavadas em água corrente por 1 min, em solução de HCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  por 1 min e, em seguida, enxaguadas em água desmineralizada por 1 min. Após a eliminação do excesso de água com papel absorvente, foram determinados os pesos de matéria fresca das raízes e da parte aérea.

O material vegetal foi, então, colocado para secar em estufa convencional a 80°C até a obtenção de peso seco constante. Após determinação do peso de matéria seca, o material vegetal foi moído num almofariz elétrico (compartimento de moagem em aço inox) por 3 min, a fim de se obter um produto com textura bastante fina. Esse material foi submetido à mineralização por via úmida, usando-se uma mistura nítrico-perclórica (ALLAN, 1969). As concentrações de cádmio nos extratos minerais foram, então, determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (PULIDO et al., 1966).

As taxas de crescimento relativo do sistema radicular e da parte aérea foram calculadas, utilizando-se a equação proposta por HUNT (1978):

$$Rw = (\ln W_1 - \ln W_0) \times 1.000 / (t_1 - t_0)$$

em que

Rw = taxa de crescimento relativo, em termos de matéria seca, no período experimental ( $\text{mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ );

$\ln W_1$  e  $\ln W_0$  = logaritmo neperiano do peso da matéria seca no final e no início do experimento, respectivamente; e

$t_1 - t_0$  = duração do experimento (dias).

O experimento foi montado no delineamento de blocos ao acaso, em um total de quatro blocos, dentro do esquema fatorial  $2 \times 6 \times 4$  (espécies vegetais  $\times$  níveis de Cd  $\times$  blocos).

### **3.4. Determinação do cádmio adsorvido e absorvido**

Plantas das duas espécies, após o período de adaptação de três dias, foram lavadas e enxaguadas com água desmineralizada por 5 min e, em seguida, transferidas para vasos de polietileno com 500 mL de solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) com 1/5 da força iônica, em pH 7, com todo o nitrogênio fornecido na forma de nitrato, sem cálcio, contendo Cd nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{moles L}^{-1}$ , onde permaneceram por 30 min. Após esse período, as plantas foram retiradas e lavadas em água desmineralizada, sob agitação magnética por 30 segundos, e, então, transferidas para vasos contendo 500 mL de solução 1,25  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . A solução de Ca foi substituída, a cada 10 min, por um período de 60 min. As soluções coletadas a cada 10 min foram concentradas em evaporador rotativo a 80°C, sendo as concentrações de Cd, então, determinadas por espectrofotometria de absorção atômica.

Ao final do período de dessorção, as plantas foram lavadas, separadas em parte aérea e sistema radicular e secadas em estufa convencional a 80°C até a obtenção de peso seco constante, sendo determinada a quantidade de Cd absorvida, conforme descrito no procedimento analítico do item 3.3.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial com três blocos  $2 \times 2 \times 6$  (2 espécies  $\times$  2 concentrações de Cd  $\times$  3 blocos).

### **3.5. Cinética de absorção de cádmio**

A cinética de absorção de cádmio foi determinada sob duas formas de exposição das plantas ao cádmio. Plantas de aguapé e de salvinia, após o período de adaptação de três dias, foram transferidas para vasos de polietileno contendo 1 L de solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) com 1/5 da força iônica, em pH 7, com todo o nitrogênio fornecido na forma de nitrato, com ou sem Cd na concentração de 5  $\mu\text{moles L}^{-1}$ , na forma de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , permitindo-se ou não o contato das folhas com a solução nutritiva. Essas plantas foram mantidas em

ambiente com temperatura e luminosidade controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $230 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) durante o ensaio de absorção de Cd. Alíquotas de 1 mL de cada vaso foram retiradas, inicialmente, de 15 em 15 min durante a primeira hora e de 30 em 30 min durante a segunda hora e, em seguida, de hora em hora até que a concentração de Cd da solução nutritiva se estabilizasse.

Ao final do ensaio, foram medidos os volumes das soluções nutritivas restantes e as plantas foram lavadas sucessivamente em água de torneira, HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e em água desmineralizada, por 1 min em cada etapa, e divididas em raiz e parte aérea para determinação do peso de matéria seca, como anteriormente descrito.

As concentrações de Cd nas alíquotas coletadas foram, então, determinadas por espectrofotometria de absorção atômica, sendo os dados obtidos utilizados para estimar os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  por aproximação gráfico-matemática, conforme sugerido por RUIZ (1985). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, num total de quatro blocos, no fatorial  $2 \times 2 \times 4$  (2 espécies  $\times$  2 formas de exposição  $\times$  4 blocos).

### **3.6. Acúmulo e distribuição de cádmio**

Plantas das duas espécies, após o período de adaptação de três dias, foram transferidas para vasos de polietileno contendo 2 L de solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) com 1/5 da força iônica, em pH 7, com todo o nitrogênio fornecido na forma de nitrato e submetidas ao tratamento com Cd na concentração de  $5 \mu\text{moles L}^{-1}$ , por períodos de 12 horas, 3, 5 e 10 dias, tendo a solução nutritiva sido trocada diariamente, a fim de manter constante o valor de pH e a concentração de Cd.

Em outro experimento, as plantas foram expostas a soluções de cádmio nas concentrações de 1 e de  $5 \mu\text{moles L}^{-1}$ , por período de três dias, impedindo-se ou não que as folhas das duas espécies tivessem contato direto com a solução nutritiva.

Nos dois experimentos, transcorrido o período de exposição, procedeu-se à coleta do material vegetal. As plantas foram lavadas por 1 min em água corrente, em seguida por 1 min em solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e finalmente em água desmineralizada por 1 min. As plantas foram divididas em raízes e parte aérea e

secadas em estufa a 80°C até peso constante, sendo determinados os pesos de matéria seca.

As raízes e parte aérea foram maceradas em almofariz de porcelana após a aplicação de nitrogênio líquido e, novamente, levadas à estufa a 80°C. Amostras de matéria seca (aproximadamente 100 mg cada) foram digeridas num meio constituído de 3 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (p/v), em forno de microondas, conforme a seguinte programação: 7 min a 850 W, 3 min a 500 W, 2 min a 250 W e 10 min a 0 W. Esse procedimento foi realizado por duas vezes para garantir a digestão total do material orgânico. A seguir, o material digerido foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com água desmineralizada. A concentração de Cd nas amostras foi, então, determinado em um espectrofotômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES).

Os experimentos seguiram o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, segundo os esquemas fatoriais 2×4×3 (duas espécies × quatro tempos de exposição × três repetições) e 2×2×2×3 (duas espécies × dois níveis de Cd × duas formas de exposição × três repetições), nos experimentos 1 e 2, respectivamente.

### **3.7. Efeito do cádmio sobre a absorção e a assimilação de enxofre**

#### **3.7.1. Cinética de absorção de enxofre**

Plantas das duas espécies, após o período de adaptação, foram expostas a soluções de Cd nas concentrações de 0 e 5 µmoles L<sup>-1</sup>, durante três dias, em vasos contendo 500 mL de solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) com 1/5 da força iônica, em pH 7, com todo o nitrogênio fornecido na forma de nitrato. Vinte e quatro horas antes do ensaio de exaustão, a solução nutritiva passou a ser renovada de seis em seis horas, mudando-se a concentração de sulfato para 5 µmoles L<sup>-1</sup>. No momento do ensaio propriamente dito, renovou-se novamente a solução nutritiva e metade das plantas recebeu tratamento com solução de 5 µmoles L<sup>-1</sup> de Cd, adicionando-se, em seguida, 1 mL de solução de Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> com atividade de 0,042 MBq mL<sup>-1</sup> a todos os vasos. O ensaio de esgotamento do sulfato da solução nutritiva foi realizado de acordo com a metodologia proposta por



CLAASSEN e BARBER (1974). Após a introdução das plantas na solução de absorção, passou-se a coletar alíquotas de 1 mL de cada vaso, a intervalos de 15 min na primeira hora e 30 min na segunda hora e, a partir daí, a cada 60 min até que houvesse equilíbrio entre o influxo e o efluxo do ânion sulfato. A quantidade de radioatividade em cada alíquota, após adição de 10 mL do coquetel de cintilação líquida, constituído de difenil oxaxol (PPO) ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), naftaleno ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) e dioxano (q.s.q. 1 L), foi, então, determinada em espectrômetro beta de cintilação líquida Beckman, modelo LS 6500. Após o término do experimento, as raízes das plantas foram destacadas, lavadas com água destilada e secadas em estufa a  $80^{\circ}\text{C}$ , até peso constante, para determinação do peso da matéria seca. De posse desses dados, estimaram-se os valores das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$ , mediante a aproximação gráfico-matemática sugerida por RUIZ (1985). Os valores de  $V_{max}$  foram expressos com base no peso de matéria seca das raízes. O delineamento experimental foi o modelo inteiramente casualizado, no fatorial  $2 \times 2 \times 2 \times 3$  (duas espécies  $\times$  dois meios de cultivo  $\times$  dois meios de absorção  $\times$  três repetições).

### **3.7.2. Determinação da atividade da enzima sulfúrilase do ATP**

Plantas das duas espécies, após o período de adaptação de três dias, foram transferidas para vasos de polietileno contendo 2 L de solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) com 1/5 da força iônica, em pH 7, e com todo o nitrogênio fornecido na forma de nitrato e submetidas a cádmio na concentração de  $5 \mu\text{moles L}^{-1}$  por período de três dias, tendo a solução nutritiva sido trocada diariamente.

A enzima sulfúrilase do ATP foi extraída segundo metodologia descrita por SCHMUTZ e BRUNOLD (1982), com algumas modificações. Amostras de 1 g de peso de matéria fresca (folha ou raiz) foram colocadas em almofariz de porcelana gelado e homogeneizadas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 10 mL de tampão Tris-HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8, contendo  $\text{MgCl}_2$   $2 \text{ mmol L}^{-1}$ , KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e DTE (ditioeritritol)  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , acrescidos de 0,1 mg de PSMF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e 50 mg de BSA (soroalbumina bovina). O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e centrifugado a  $10.000 \text{ g}$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo o sobrenadante utilizado para avaliação da atividade da enzima.

A atividade da sulfúrilase do ATP foi determinada com base na metodologia descrita por ADAMS e JOHNSON (1968), com algumas modificações. A 0,8 mL do meio de reação contendo 10  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ , 100  $\mu$ moles de solução-tampão Tris-HCl, pH 8,0, 2,5  $\mu$ moles de pCMB (p-cloromercúribenzoato) e duas unidades de pirofosfatase foi adicionado 0,2 mL do extrato enzimático, seguido de incubação a 37°C durante 5 min. Em seguida, adicionaram-se ao meio reagente 0,5 mL de solução contendo 20  $\mu$ moles de  $Na_2MoO_4$  (ou 40  $\mu$ moles de NaCl, no caso do branco) e 10  $\mu$ moles de ATP, sendo feita nova incubação a 37°C. Após 20 min, paralisou-se a reação com a adição de 1 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) gelado. Após centrifugação a 5.000 g durante 10 min a 4°C, pipetou-se uma alíquota de 0,2 mL do sobrenadante, a qual foi adicionada ao meio reagente contendo 2,4 mL de  $H_2O$  desmineralizada, 2 mL de solução de molibdato de amônio 1% em  $H_2SO_4$  1 mol  $L^{-1}$  e 0,4 mL de solução do reagente de Fiske e Subbarow. A reação foi mantida por 30 min, a 37°C, no escuro, sendo em seguida determinada a absorvância em 660 nm.

O delineamento experimental foi o modelo inteiramente casualizado, no fatorial  $2 \times 2 \times 3$  (duas espécies  $\times$  dois níveis de Cd  $\times$  três repetições).

### **3.7.3. Determinação de compostos tiolados**

#### **3.7.3.1. Extração e determinação da concentração de compostos tiolados totais**

As plantas das duas espécies, conforme relatado no item 3.7.3, foram submetidas aos tratamentos em solução nutritiva contendo ou não Cd na concentração de 5  $\mu$ moles  $L^{-1}$ , durante três dias. Ao final do experimento, as plantas foram lavadas sucessivamente em água corrente, HCl 0,1 mol  $L^{-1}$ , água desmineralizada e secadas em papel absorvente, sendo, então, determinado o peso da matéria fresca. Os tecidos foram imediatamente congelados em  $N_2$  líquido e mantidos a cerca de -20°C até a realização da etapa de extração.

Um grama de matéria fresca de cada parte da planta foi homogeneizado em almofariz de porcelana, em  $N_2$  líquido, adicionando-se a seguir, nesse recipiente, 5 mL de solução contendo Tris-HCl 20 mmoles  $L^{-1}$ , pH 8,0, sacarose 0,25 mol  $L^{-1}$ ,

ascorbato 1% (p/v) e 0,1 g de PVP (polivinilpirrolidona) (DING, 1994). Após a filtração através de quatro camadas de gaze e a centrifugação do homogenato a 10.000 g por 10 min a 4°C (MEUWLY e RAUSER, 1992), retirou-se uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, à qual foram acrescentados 2 mL do reagente de Ellman (OBATA e UMEBAYASHI, 1986), constituído de DTNB [ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)] 0,375 mmol L<sup>-1</sup> e solução-tampão fosfato 0,5 mol L<sup>-1</sup> (pH final 7,5). A concentração de tióis solúveis totais foi determinada após 15 min, a 37°C, com base na absorvância medida no comprimento de onda de 412 nm, utilizando-se uma curva-padrão de cisteína (OBATA e UMEBAYASHI, 1993). O experimento foi montado num delineamento inteiramente casualizado, no fatorial 2 × 2 × 3 (duas espécies × dois níveis de Cd × três repetições).

### **3.7.3.2. Extração e determinação das concentrações de cisteína, $\gamma$ -glutamilcisteína e glutatona**

A extração de tióis para determinação dos teores de cisteína,  $\gamma$ -glutamilcisteína e glutatona seguiu o procedimento preconizado por DING (1994), modificado pela adição de PVP ao meio de extração. Cinco gramas de matéria vegetal fresca foram homogeneizados em 10,0 mL de solução contendo Tris-HCl 20 mmoles L<sup>-1</sup>, pH 8,0, sacarose 0,25 mol L<sup>-1</sup>, ascorbato 1% (p/v) e 0,5 g de PVP, em almofariz gelado. O homogenato foi filtrado por meio de quatro camadas de gaze e centrifugado a 22.000 g por uma hora, a 4°C. O sobrenadante foi imediatamente congelado em N<sub>2</sub> líquido e mantido a -20°C até a realização das determinações.

Para quantificação de cisteína livre,  $\gamma$ -glutamilcisteína e glutatona, uma alíquota de 80  $\mu$ L do extrato bruto foi reduzida pela ação de 130  $\mu$ L de CHES [ácido 2(N-ciclohexilamino)-etanossulfônico] 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,3) e 5  $\mu$ L de DTT (ditiotreitól) 40 mmoles L<sup>-1</sup> por 20 min, à temperatura ambiente. Os tióis foram derivatizados em ambiente escuro pela adição de 20  $\mu$ L de monobromobimano 30 mmoles L<sup>-1</sup> em acetonitrila por 15 min, à temperatura ambiente. A reação foi paralisada pela adição de 165  $\mu$ L de ácido metanossulfônico 0,25% (v/v), seguida por centrifugação a 6.000 g por 15 min. Alíquotas de 100  $\mu$ L dos derivados bimano de cisteína,  $\gamma$ -glutamilcisteína e glutatona foram separadas por cromatografia líquida de alta “performance” (HPLC), em coluna de fase reversa Bondpak<sup>TM</sup> C18

10  $\mu\text{m}$  ( $4,6 \times 250$  mm) (“Waters Associates”), acoplada a uma pré-coluna. A eluição foi feita com ácido acético 0,25% (v/v) em água (pH 3,9) contendo metanol 11,5% (v/v), com gradiente de 0 a 10% de acetonitrila em ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) por 20 min; o fluxo foi de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , à temperatura ambiente. Após eluição por 20 min, a coluna foi lavada, aumentando-se a concentração de acetonitrila para 100% (v/v) em 10 min, mantendo-se também essa concentração na coluna por mais 10 min antes de retornar às condições iniciais. Após 15 min de equilíbrio, a próxima amostra foi injetada.

Misturas de cisteína,  $\gamma$ -glutamilcisteína e glutatona, em várias concentrações, tiveram o mesmo tratamento de redução e derivatização e foram usadas como padrão para determinação dos seus teores nas amostras.

Os produtos derivatizados foram detectados fluorimetricamente em comprimento de onda  $> 425$  nm, após excitação a 360 nm (MEUWLY e RAUSER, 1992).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, no fatorial  $2 \times 2 \times 3$  (duas espécies  $\times$  dois níveis de Cd  $\times$  três repetições).

### **3.7.3.3. Extração e determinação de compostos complexantes de Cd**

Este procedimento de extração foi realizado segundo FUJITA (1986), homogeneizando-se 5 g de matéria vegetal fresca em 30 mL de uma solução contendo Tris-HCl  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8, sacarose  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , ascorbato 1% (p/v) e 0,5 g de PVP, em almofariz gelado. O homogenato foi filtrado por meio de quatro camadas de gaze e centrifugado a  $22.000 \text{ g}$  por uma hora, a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante obtido foi aplicado em coluna DEAE-celulose ( $2 \times 9$  cm) pré-equilibrada com solução-tampão Tris-HCl  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8, a qual foi lavada com 90 mL desta solução. Em seguida, o complexo foi eluído com 90 mL dessa mesma solução-tampão, porém contendo KCl  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , seguido da aplicação de mais 90 mL do mesmo tampão contendo KCl  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ . Frações de 3 mL foram coletadas e analisadas para determinar a concentração de Cd, por espectrofotometria de absorção atômica, sendo a absorvância determinada, também, a 265 e 280 nm. Frações ricas em Cd e com alta relação  $A_{265}/A_{280}$  nm foram identificadas como contendo o complexo ligante de Cd (FUJITA, 1986).

O perfil de eluição do íon  $\text{Cd}^{2+}$  livre foi determinado, também, aplicando-se solução-padrão de Cd à mesma coluna, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, no fatorial  $2 \times 2 \times 3$  (duas espécies  $\times$  dois níveis de Cd  $\times$  três repetições).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Escolha da solução nutritiva

As soluções nutritivas de HOAGLAND e ARNON (1950) e de CLARK (1975) apresentam relação iônica  $NO_3^-/NH_4^+$  de 14:1 e 7:1, respectivamente. Essa relação é considerada importante componente na manutenção do pH das soluções nutritivas, uma vez que a absorção de íons  $NO_3^-$  resulta na liberação de íons  $OH^-$  ou consumo de íons  $H^+$  e a de íons  $NH_4^+$ , na liberação de íons  $H^+$  (RAVEN, 1986).

Nas duas soluções nutritivas utilizadas, observou-se decréscimo rápido e acentuado do pH, quer estivesse sendo cultivado aguapé ou salvínia (Figura 1). Nos vasos com plantas de aguapé, o pH da solução nutritiva decresceu de 7 para 4,3, nas duas soluções, num período de 24 horas. O decréscimo de pH nas soluções com plantas de salvínia foi ainda mais pronunciado, praticamente atingindo o equilíbrio após 12 horas e com valores finais de pH de 4,6 e 4,5, nas soluções de Hoagland e de Clark, respectivamente, após o período de 24 horas. Nas duas espécies, observou-se decréscimo de pH inicial mais rápido na solução de Clark, mas que se igualava à da solução de Hoagland após 24 horas. O decréscimo mais acentuado do pH ocorreu nas primeiras seis horas, nas duas soluções e espécies de plantas, tendendo à estabilização após 24 horas e atingindo praticamente a estabilização depois de 48 horas (dados não apresentados).

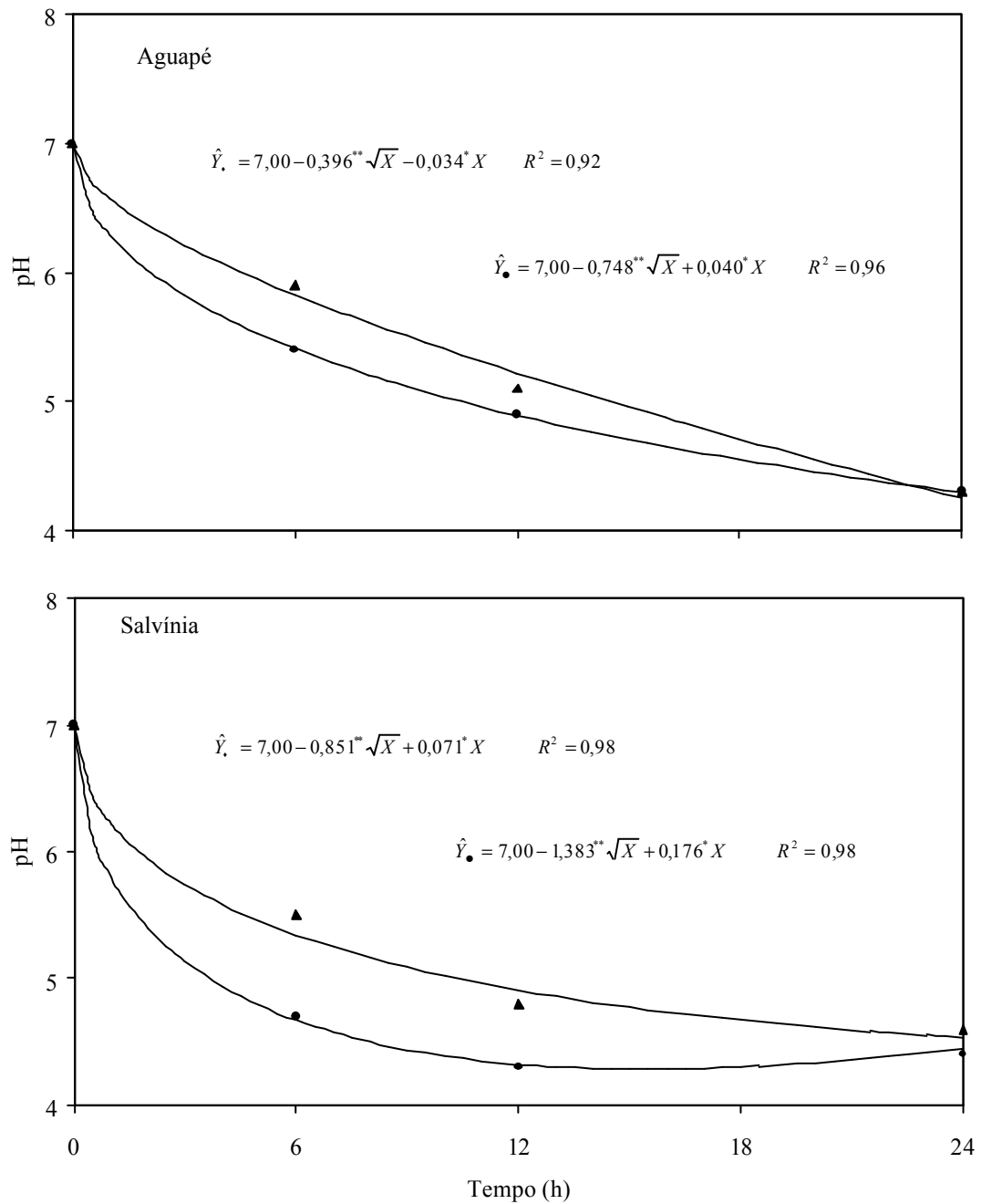


Figura 1 - Decréscimo do pH nas soluções nutritivas de Hoagland e Arnon (•) e de Clark (●) em função do tempo, em cultivo de plantas de aguapé e salvinia.

Num segundo experimento, em que as soluções nutritivas foram modificadas de modo a fornecer todo o nitrogênio na forma de nitrato, o decréscimo de pH foi bem menos acentuado, principalmente no caso da salvinia (Figura 2). O decréscimo nos valores de pH na solução de Hoagland, no período sob análise, foi sempre menor do que aquele na solução de Clark, tanto em cultivo com aguapé quanto com salvinia.

Como se pode observar na Figura 2, a modificação da composição química da solução de Hoagland e Arnon, que apresentava relação de íons  $NO_3^-/NH_4^+$  de 14:1, para conter apenas íons  $NO_3^-$ , resultou em menor decréscimo de pH ao longo do período de cultivo. Isso aconteceu porque cerca de 70% dos cátions e ânions absorvidos pelas plantas foram representados por  $NH_4^+$  ou  $NO_3^-$  (VAN BEUSICHEM et al., 1988). Assim, em princípio, plantas supridas com  $NH_4^+$  caracterizam-se por apresentar alta relação cátion-ânion, ao contrário de plantas supridas com  $NO_3^-$ , que apresentam alta relação ânion-cátion. No primeiro caso, o excesso de cátions é compensado por um aumento na excreção de prótons em razão aproximadamente equimolar à quantidade absorvida de íons  $NH_4^+$  (MARSCHNER et al., 1991; RAVEN, 1986). No segundo caso, ao contrário, durante a assimilação de íons  $NO_3^-$  ocorre produção aproximadamente equimolar de íons  $OH^-$  ou consumo de íons  $H^+$  do meio externo (RAVEN, 1986).

Vários trabalhos têm demonstrado que o pH exerce influência determinante na absorção de Cd pelas plantas, conforme relatado por HATCH et al. (1988) em quatro espécies vegetais. FETT et al. (1994), analisando o efeito do pH sobre a absorção de Cd por plantas de aguapé, concluíram que em pH 7 ocorriam as maiores taxas de acúmulo de Cd e, em razão disso, optou-se por manter o pH próximo a esse valor no decorrer do experimento, utilizando a solução nutritiva modificada de Hoagland e Arnon durante o desenvolvimento dos experimentos, uma vez que o decréscimo de pH foi menos pronunciado nessa solução nutritiva.



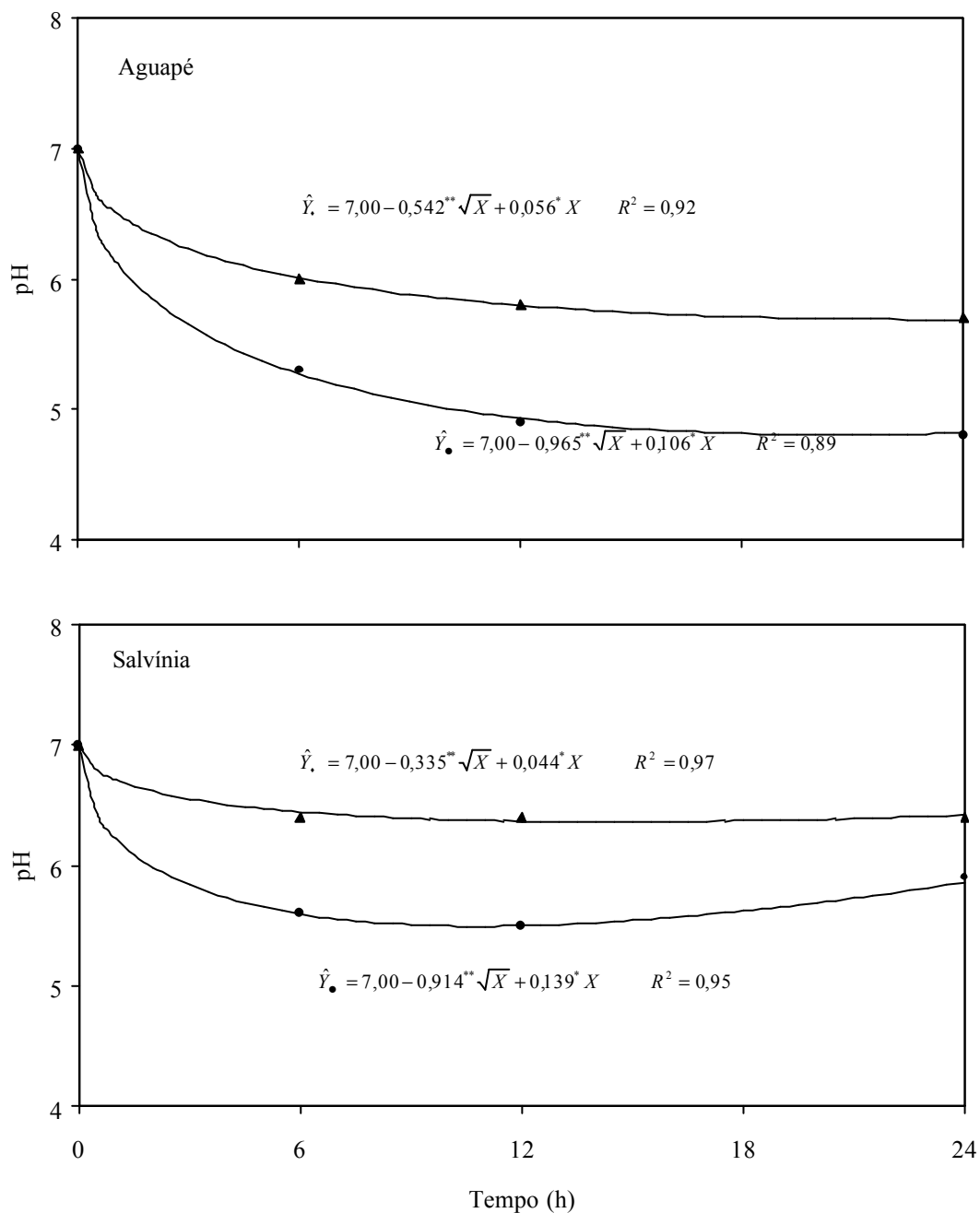


Figura 2 - Decréscimo do pH nas soluções nutritivas modificadas de Hoagland e Arnon (•) e de Clark (Δ) em função do tempo, em cultivo de plantas de aguapé e salvínia.

#### 4.2. Sintomas externos de toxidez do Cd

Em baixas concentrações de Cd, as plantas de aguapé não apresentaram sintomas de toxidez ou qualquer outra indicação de que o metabolismo estivesse sendo alterado. Os sintomas de toxidez mais comumente observados nas concentrações mais elevadas foram acúmulo de antocianinas nos pecíolos e estolões, clorose internerval das folhas e escurecimento acentuado das raízes. Além disso, observou-se redução na emissão de novas raízes e folhas, nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd. Esse sintoma, entretanto, não foi considerado específico para o Cd, uma vez que várias deficiências minerais podem resultar nesse mesmo tipo de injúria (NEWMAN e HALLER, 1988).

Em salvínia, o escurecimento de folhas e “raízes” e a inibição da formação de novas plantas tornaram-se facilmente visíveis a partir do segundo dia nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd e, a partir do quinto dia, na concentração de 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Cd. Altas concentrações de Cd no sistema radicular influenciaram não somente o modo de crescimento radicular, como também afetaram a morfologia (raio médio, coloração e desenvolvimento de pêlos radiculares) e a arquitetura radicular (número e comprimento de raízes laterais), o que levou à inibição do crescimento e ao engrossamento e encurtamento das raízes (BRECKLE, 1991). Os sintomas de toxidez observados decorreram, possivelmente, de alterações em nível de ultra-estrutura, conforme observados por GUPTA e DEVI (1992), caracterizadas por rompimento da membrana plasmática devido à perda de elasticidade e à deposição de material opaco ao longo da lamela média. O rompimento da membrana plasmática parece ser um dos mais importantes fatores, uma vez que a membrana atua como barreira regulatória para o transporte de moléculas vitais, sendo este o primeiro alvo de fitotoxicidade do Cd (GUPTA e DEVI, 1992).

Sintomas similares de toxidez do Cd foram também relatados por NUSSBAUM et al. (1988) em plantas de milho, cujas raízes apresentaram escurecimento e perda de flexibilidade, quebrando-se facilmente.

### 4.3. Efeito do Cd sobre a taxa de crescimento relativo

A taxa de crescimento relativo decresceu com o aumento da concentração de Cd na solução nutritiva nas duas partes das plantas das duas espécies analisadas (Figura 3). A análise da correlação das concentrações de Cd na raiz e na parte aérea, com as respectivas taxas de crescimento relativo, apresentou os seguintes coeficientes: -0,91 e -0,81, respectivamente para raiz e parte aérea de aguapé, e -0,72 e -0,78 para raiz e parte aérea de salvinia, respectivamente. Esses dados indicaram que a redução da taxa de crescimento relativo se deveu à toxicidade do Cd nesses tecidos vegetais. As plantas de aguapé apresentaram tolerância ao Cd significativamente maior do que as plantas de salvinia, em termos da redução da taxa de crescimento relativo. Na concentração de  $2,5 \mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd, a redução no crescimento relativo foi de 22% nas raízes e 18% na parte aérea de aguapé, enquanto em salvinia atingiu reduções de 71% nas “raízes” e 46% nas folhas, evidenciando sua maior sensibilidade ao Cd. Apesar de o Cd ter afetado mais pronunciadamente o crescimento relativo das raízes, os sintomas de toxidez foram mais evidentes na parte aérea, principalmente nas plantas de salvinia. A raiz, possivelmente por constituir a parte da planta que está diretamente em contato com o metal pesado, sofreu mais intensamente os efeitos tóxicos do Cd sobre a taxa de crescimento relativo nas duas espécies de plantas aquáticas, especialmente em concentrações mais baixas. Em concentrações mais elevadas, esse padrão permaneceu em aguapé, mas em salvinia os decréscimos na taxa de crescimento relativo foram idênticos nas duas partes desta planta.

As plantas de aguapé retiveram o Cd nas suas raízes em concentrações bem mais elevadas que em suas folhas, o que pode explicar a maior diminuição na taxa de crescimento relativo nessa parte da planta. Em salvinia, também a taxa de crescimento relativo foi menor nas raízes do que na parte aérea, mas as diferenças entre as partes da planta não foram tão intensas quanto em aguapé, talvez porque as folhas, devido à grande superfície de contato com a solução, podem absorver quantidades significativas de Cd.

Acima da concentração de  $5 \mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd, as plantas de salvinia apresentaram decréscimo significativo da capacidade de sobrevivência, com a

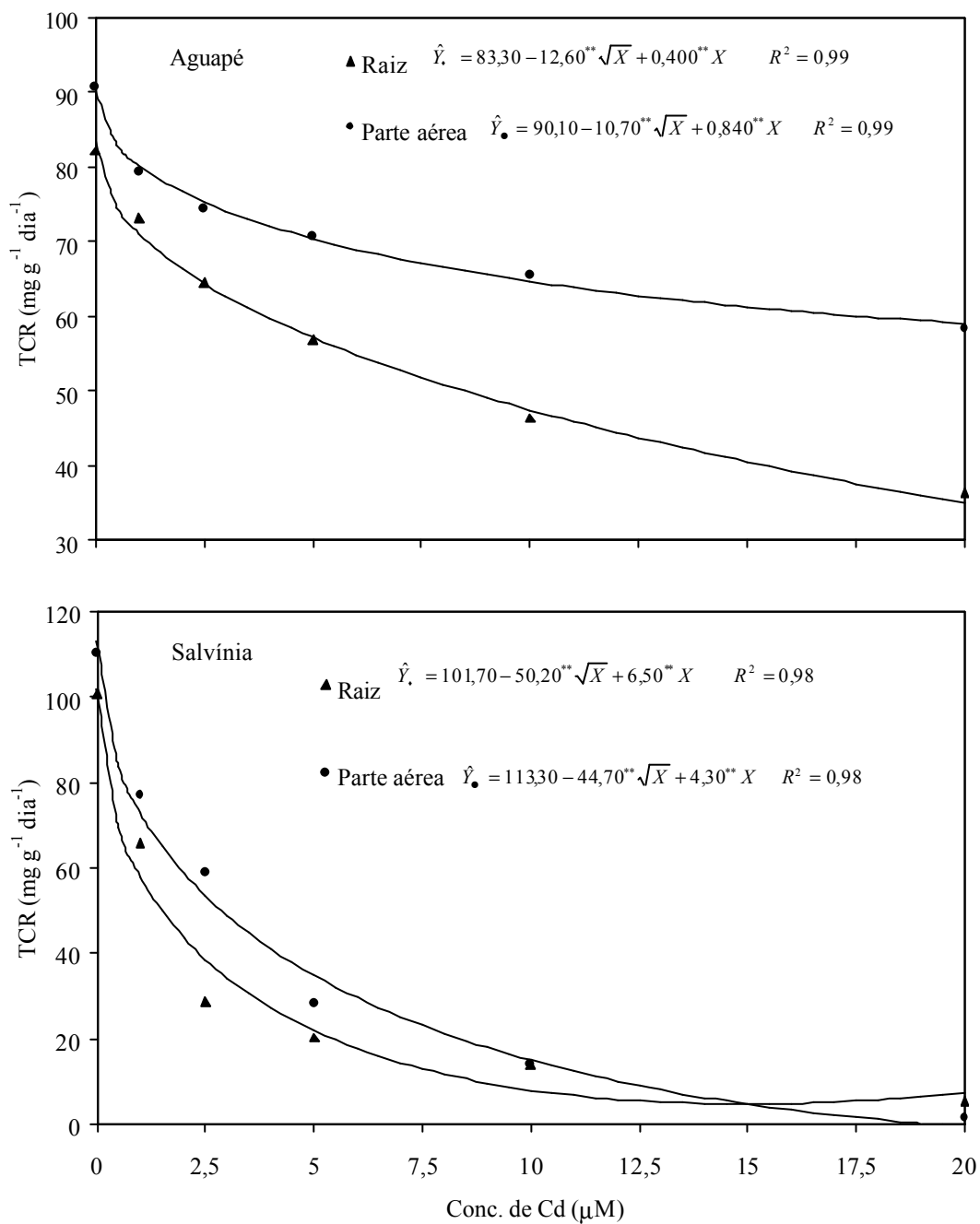


Figura 3 - Efeito do Cd sobre a taxa de crescimento relativo de raízes (▲) e parte aérea (●) de aguapé e salvinia.

morte de cerca de 60% das plantas na concentração de 10 μmoles L<sup>-1</sup> e morte de todas elas a 20 μmoles L<sup>-1</sup> de Cd.

Aspectos relacionados à diferenciação dessas espécies de plantas quanto à tolerância ao Cd devem ser analisados com cautela, uma vez que as plantas apresentam muitas diferenças anatômico-morfológicas que podem levar a conclusões que não exprimem a realidade dos aspectos da tolerância diferencial.

A concentração de Cd elevou tanto na parte aérea como no sistema radicular, à medida que se aumentou a concentração do íon na solução nutritiva, nas duas espécies de plantas (Figura 4). A concentração de Cd no sistema radicular de ambas as espécies foi sempre maior do que na parte aérea, embora essa diferença fosse decrescendo com o aumento da concentração do íon a partir de 10  $\mu\text{moles L}^{-1}$  no meio de cultivo, especialmente em aguapé. Em salvínia, essa diferença se manteve até a concentração mais elevada estudada. Em concentrações mais elevadas de Cd (10 a 20  $\mu\text{moles L}^{-1}$ ), ao que tudo indica, parece ter ocorrido saturação dos sítios de ligação desse metal nas raízes de aguapé, uma vez que a concentração de Cd nas raízes desta planta tendeu à estabilização. Na parte aérea, não se observou tendência à estabilização, mesmo na dose de 20  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd. Nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{moles L}^{-1}$  foram visíveis sintomas de toxicidade do Cd nas folhas das plantas de aguapé e pareceu ocorrer aumento na translocação do Cd absorvido pelas raízes para a parte aérea, passando a relação Cd na parte aérea/Cd na raiz de 0,12 para 0,49 quando a concentração de Cd na solução nutritiva passou de 1 para 20  $\mu\text{moles L}^{-1}$ .

Em plantas de salvínia, entretanto, a concentração de Cd elevou-se continuamente com o aumento das concentrações de Cd na solução de cultivo, tanto nas “raízes” como nas folhas, indicando incapacidade dessa planta em controlar a absorção e a distribuição do Cd.

O maior acúmulo de Cd no sistema radicular tem sido atribuído ao contato das raízes com a solução nutritiva e à ligação do Cd às cargas negativas das paredes celulares do sistema radicular. A fração absorvida, uma vez que sofre limitações para ser translocada para a parte aérea, em razão de possível complexação por fitoquelatinas nas raízes, também contribuiu para um maior acúmulo desse elemento nestas partes das plantas (FUJITA e KAWANISHI, 1986).

Exposição das plantas a níveis tóxicos de Cd durante períodos de tempo relativamente longos (mais de cinco dias), como os utilizados neste experimento,

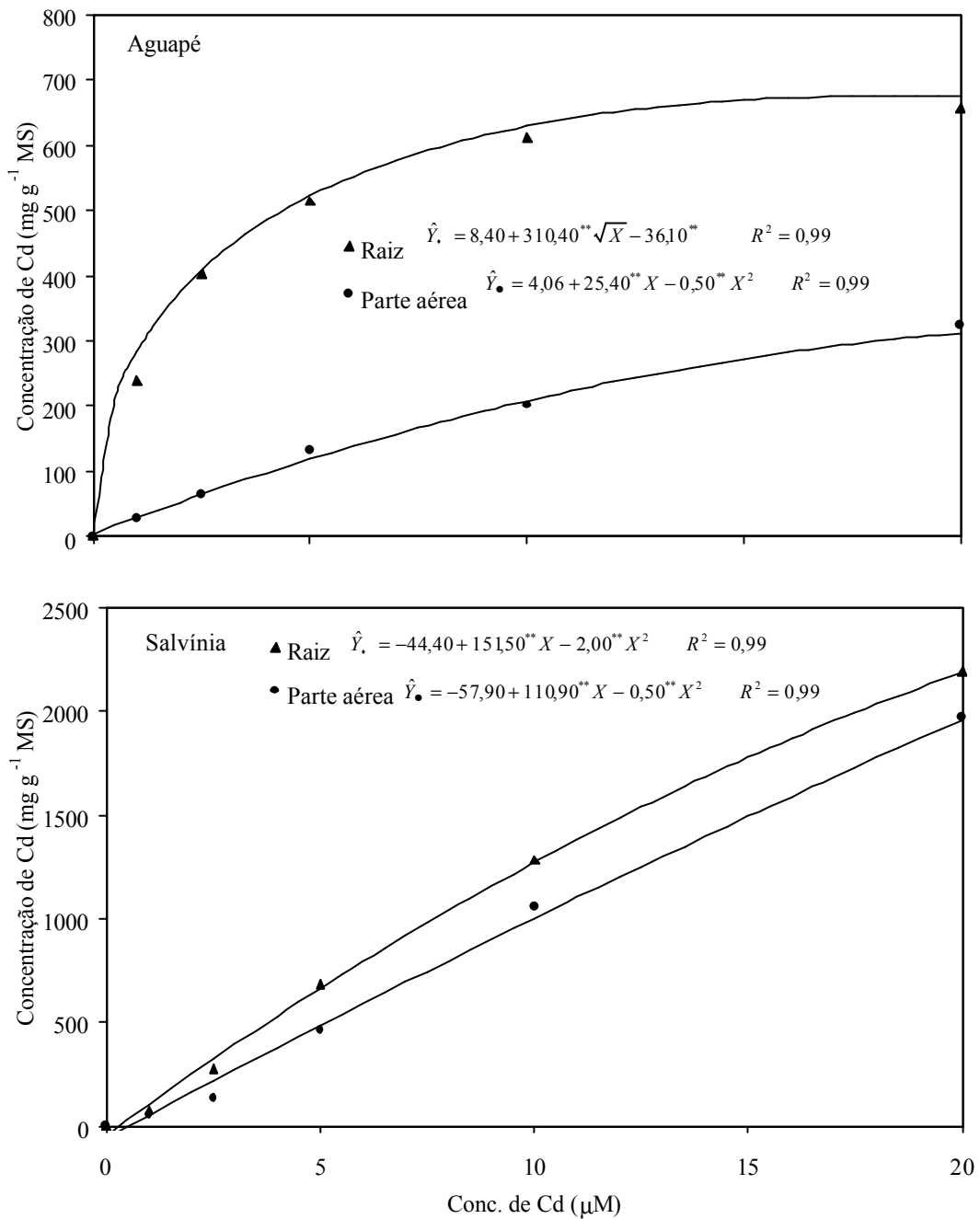


Figura 4 - Concentração de Cd nas raízes e na parte aérea de plantas de aguapé e salvinia, em função de concentrações crescentes de Cd na solução nutritiva, por um período de 10 dias.

resulta em forte interferência sobre o crescimento das plantas, uma vez que sob tal condição a síntese de compostos ricos em grupos tiol, que poderiam complexar e impedir a ação do metal, cai rapidamente (DING et al., 1994). Nessa condição, o Cd poderia provocar danos às membranas, causar distúrbios hormonais, alterar a atividade de várias enzimas e inibir a fotossíntese, resultando em eventual morte das plantas (BARCELO e POSCHENRIEDER, 1990), como se observou em salvinia.

#### **4.4. Influência do tempo e da concentração de Cd sobre as frações adsorvidas e absorvidas deste elemento**

##### **4.4.1. Dessorção de Cd em função do tempo**

A taxa de dessorção de Cd por raízes de aguapé e salvinia, tanto em plantas expostas a 5 como a 10  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd, foi inicialmente rápida, mas decresceu ao longo do tempo, atingindo um patamar em torno de 30 min (Figura 5). Após 20 minutos de exposição à solução de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , cerca de 79 e 86% do Cd adsorvido nas raízes de aguapé já haviam dessorvido das plantas tratadas com 5 e 10  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd, respectivamente. Nesse mesmo período de tempo, a dessorção pelas “raízes” de salvinia já havia atingido 91 e 92% do total, nas mesmas concentrações de Cd, respectivamente.

De modo geral, observou-se que, entre 30 e 40 min, a dessorção tinha sido praticamente total (acima de 96%) do Cd presente nas raízes das duas espécies de plantas. As raízes de salvinia adsorveram, em média, 4,2 vezes mais Cd do que as de aguapé. Como a dessorção foi avaliada com base no Cd presente na solução de dessorção e não pela análise dos tecidos vegetais, é possível que essa maior adsorção de Cd pelas plantas de salvinia tenha sido devida, pelo menos em parte, a uma efetiva participação das folhas no processo de retirada de Cd da solução de cultivo e retenção nos tecidos foliares.

Como já mencionado, a salvinia apresentava grande superfície de contato de suas folhas com a solução de cultivo, possibilitando rápida adsorção/absorção de Cd e, por conseqüência, também rápida dessorção na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ .

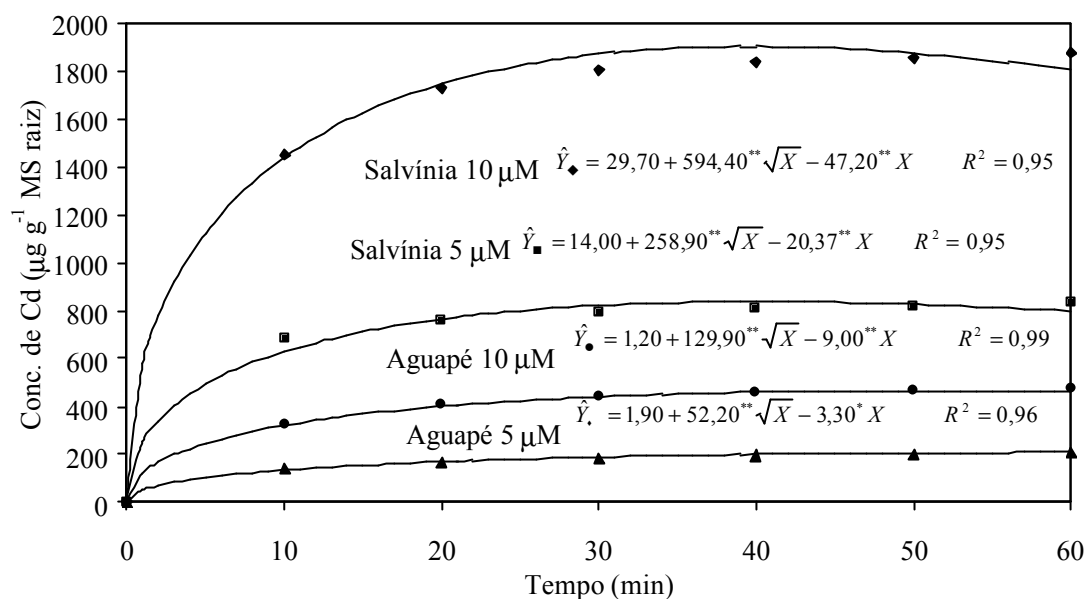


Figura 5 - Dessorção de Cd por raízes de plantas de aguapé e salvinia, expostas a duas concentrações do elemento, em função do tempo.

O tempo requerido para dessorção total (aproximadamente 96%) do Cd adsorvido foi praticamente o mesmo nas duas concentrações de Cd utilizadas, tanto em aguapé como em salvinia. CATALDO et al. (1983), no entanto, observaram menor tempo de dessorção nas concentrações mais baixas de Cd na solução externa, sendo de 30 min nas concentrações abaixo de  $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de 90 min em plantas de soja expostas a concentrações maiores que  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , indicando que, com o aumento da concentração, parece haver ocupação de sítios de adsorção de mais difícil acesso. Isso, entretanto, parece não ser verdade para aguapé e salvinia.

#### 4.4.2. Efeito da concentração de Cd sobre as frações adsorvida e absorvida deste elemento

Em plantas de aguapé, tanto a fração adsorvida como a absorvida aumentaram com a elevação da concentração de Cd na solução de cultivo (Quadro



1). Esses aumentos ocorreram aproximadamente na mesma proporção, fazendo com que a razão entre Cd adsorvido/absorvido permanecesse essencialmente inalterada. É provável que, mesmo na concentração mais elevada de Cd, não tenha ocorrido saturação dos sítios de adsorção do espaço livre de Donnan, uma vez que a fração trocável mais do que dobrou com a duplicação da concentração de Cd na solução de cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos por FETT et al. (1994), que demonstraram a enorme capacidade de acúmulo de Cd apresentada por essas plantas, que concentraram em seus tecidos mais que 2,29 mg de Cd trocável por grama de matéria seca.

Na concentração de 5  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd, as plantas de salvinia adsorveram e absorveram aproximadamente 3,8 vezes mais Cd do que as de aguapé, mantendo, entretanto, a relação Cd adsorvido/absorvido aproximadamente igual àquela apresentada por plantas de aguapé. Na maior concentração de Cd (10  $\mu\text{moles L}^{-1}$ ), no entanto, a quantidade de Cd adsorvido em salvinia aumentou na mesma proporção que em aguapé, mas observou-se drástica diminuição na quantidade absorvida, fazendo com que a razão Cd adsorvido/absorvido em salvinia atingisse valor 3,1 vezes superior em relação ao aguapé. Isso, provavelmente, se deveu aos efeitos tóxicos do Cd sobre o metabolismo daquela planta,

Quadro 1 - Adsorção e absorção de Cd por raízes de aguapé e salvinia expostas a dois níveis de Cd durante 30 minutos

Cd ( $\mu\text{mo L}^{-1}$ )	Cd adsorvido		Cd absorvido		Cd adsorvido/Cd absorvido	
	Aguapé	Salvinia	Aguapé	Salvinia	Aguapé	Salvinia
			( $\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$ )			
5,0	211,3 Aa <sup>1</sup>	832,9 Ab	86,3 Aa	328,4 Ab	2,5 Aa	2,5 Aa
10,0	471,7 Ba	1873,3 Bb	186,4 Ba	233,0 Bb	2,6 Aa	8,0 Bb

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada espécie, e minúsculas nas linhas, para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

aparentemente muito mais sensível que o aguapé. Nesse caso, o Cd provavelmente agiria sobre os sistemas de transporte da membrana plasmática, ocasionando forte diminuição na absorção desse metal, conforme relatado por GUPTA e DEVI (1992). Como a adsorção não é um fenômeno dependente de energia, a forte diminuição na absorção de Cd resultou em grande aumento na relação Cd adsorvido/absorvido.

Provavelmente, elevando o tempo de exposição das plantas de aguapé e de salvinia, mesmo na mais baixa concentração de Cd estudada, obter-se-ia aumento na razão Cd adsorvido/absorvido, uma vez que a adsorção, por certo, permaneceria praticamente inalterada, mas não a absorção, em razão dos danos fisiológicos que ocorreriam com o aumento do tempo de exposição a esse metal pesado.

#### **4.5. Absorção de Cd**

Em aguapé e salvinia, observou-se decréscimo acentuado dos níveis de Cd na solução de cultivo nas primeiras 3 h de exposição, seguido de taxa aproximadamente linear de decréscimo até 12 h (Figura 6). Em aguapé, o esgotamento da solução nutritiva foi aproximadamente igual, tendo as folhas contato ou não com a solução nutritiva.

Em salvinia, no entanto, quando as folhas não mantiveram contato com a solução de cultivo contendo o Cd, a remoção deste elemento foi comparativamente menor do que quando as folhas contactaram a solução nutritiva, reforçando, assim, a hipótese de participação das folhas no processo de absorção de Cd por plantas de salvinia e aguapé.

Como foi colocado um número suficiente de plantas para cobrir a área de lâmina d'água dos vasos experimentais, no caso do aguapé, mesmo que o número de plantas tenha sido menor, a massa radicular foi bem maior do que em salvinia. Em razão disso, a remoção de Cd pelo sistema radicular de aguapé, após 12 horas de absorção, foi 33 e 64% maior do que em salvinia quando se permitiu ou não o contato das folhas com a solução nutritiva, respectivamente. Isso evidencia a potencialidade do aguapé de remover Cd de águas poluídas com este metal.

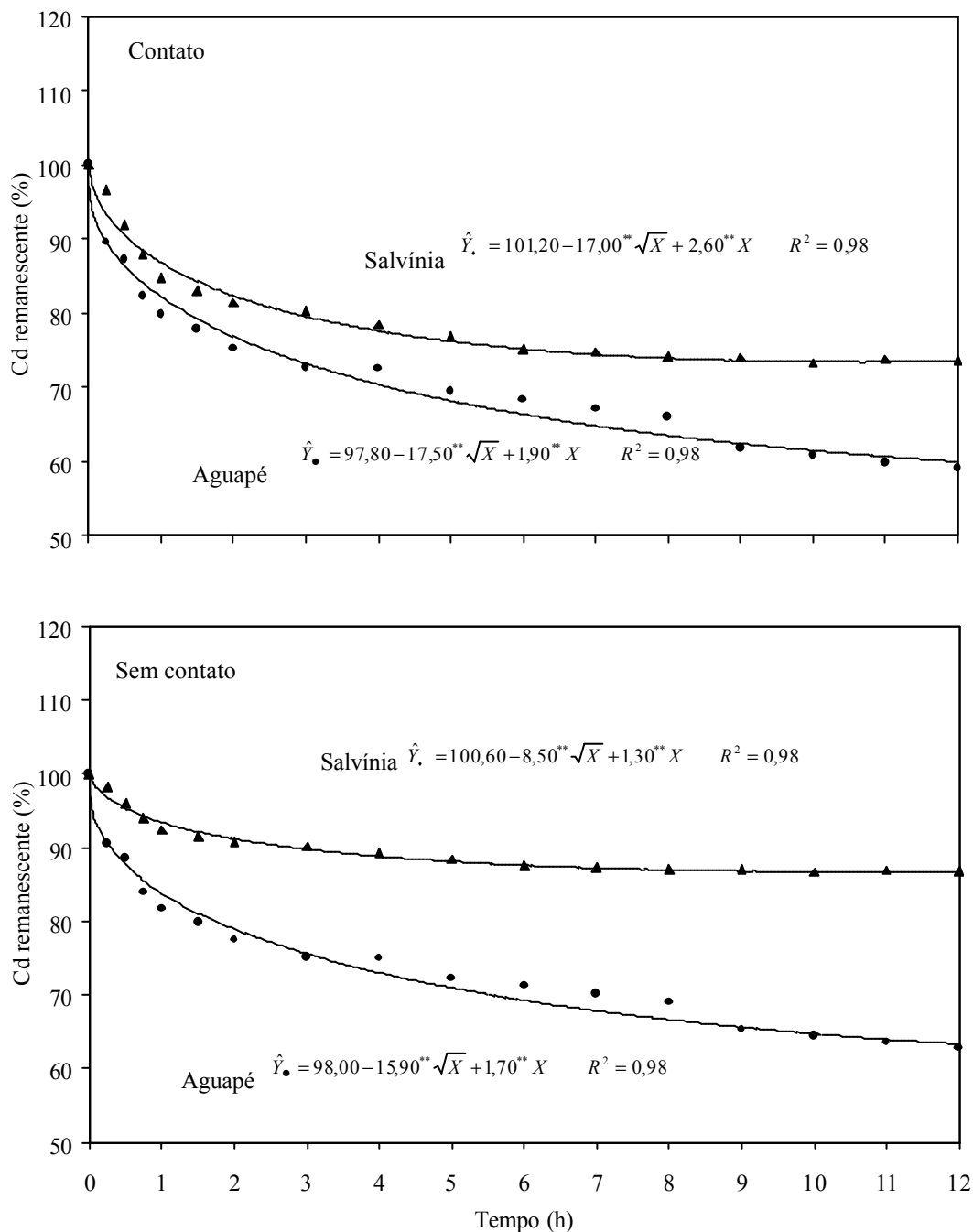


Figura 6 - Depleção de Cd na solução em função do tempo de absorção por plantas de aguapé e salvinia, sob duas formas de exposição das folhas (contato e sem contato com a solução).

A absorção de Cd por aguapé ou salvinia caracterizou-se por apresentar uma fase rápida de absorção com duração de cerca de 3 horas, após a qual se seguiu outra fase, aproximadamente linear, que se prolongou até 12 horas. Essa última fase, geralmente, continuou por pelo menos 72 horas (O'KEEFFE et al., 1984). Segundo FETT et al. (1994), essa fase de lenta absorção corresponde à absorção intracelular. Aparentemente, a capacidade de manter essa fase por tempo prolongado depende da capacidade das raízes de sintetizar fitoquelatinas, as quais têm sido identificadas em várias espécies de plantas (BARTOLF et al., 1980; RAUSER, 1986; OBATA e UMEBAYASHI, 1986), incluindo aguapé (FUJITA e KAWANISHI, 1986) e *Salvinia minima* (OUTRIDGE et al., 1991).

A absorção de Cd, segundo CUTLER e RAINS (1974), ocorre em três etapas: uma adsorção reversível a sítios de troca, seguida de uma ligação irreversível a sítios de absorção e, finalmente, uma difusão para dentro das células. Em algumas plantas, no entanto, apesar de o componente mais importante ser passivo, algumas vezes se detecta certa dependência dos processos metabólicos, especialmente em soluções com baixas concentrações de Cd (CATALDO et al., 1983).

A partir das curvas de esgotamento (Figura 6) foram estimadas as constantes cinéticas de absorção (Quadro 2). Quando se permitiu o contato das folhas com a solução nutritiva em que estavam mergulhadas as plantas, os valores de Km foram estatisticamente iguais nas duas espécies aquáticas, mas a salvinia apresentou Vmax quase 2,5 vezes maior do que o que o aguapé apresentou. Quando não se permitiu que as folhas tivessem contato com a solução nutritiva, além do Vmax, a salvinia passou a apresentar maior Km que o aguapé. A perda de afinidade do sistema de absorção de Cd, que ocorreu apenas na salvinia, talvez seja resultante do efeito tóxico do Cd sobre as “raízes” dessa espécie. É importante ressaltar que a avaliação de constantes cinéticas no caso de elementos minerais tóxicos, como o Cd, tem o complicador de o elemento interferir no metabolismo da planta e na biossíntese do sistema de transporte de íons. Assim, para se evitar tal efeito, optou-se por avaliar a constante cinética em situação fora do seu “steady state”, isto é, as curvas de esgotamento foram obtidas sem o prévio equilíbrio da planta para concentração de Cd utilizada.

No caso do aguapé, o contato ou não das folhas com a solução nutritiva contendo Cd não alterou os valores de Km e Vmax, indicando que as folhas não têm

participação direta no processo de absorção. É interessante observar que nessa espécie, em razão da presença de estruturas que favorecem sua flutuação na água e da distribuição de suas folhas, mesmo em condições naturais o contato das folhas com a solução de cultivo é mínimo.

Nas plantas de salvinia, ao impedir o contato das folhas com a solução nutritiva contendo Cd, observou-se decréscimo significativo no valor de  $V_{max}$ , decréscimo esse indicativo da forte participação das folhas no processo de absorção. Nesse caso, como a massa vegetal correspondente a essas partes da planta não foi incluída no cálculo dessa constante cinética, o valor de  $V_{max}$ , mesmo menor do que na outra condição experimental, ainda parece ter sido superestimado. Tal participação das folhas de salvinia no processo de absorção de Cd encontra forte suporte nos dados do Quadro 3.

Observou-se que as folhas de salvinia que mantiveram contato direto com a solução nutritiva contendo Cd realmente apresentaram concentração de Cd muito mais elevada do que aquelas que não mantiveram contato com essa solução. Em raízes, entretanto, tanto em aguapé como em salvinia as concentrações de Cd não sofreram modificação significativa com a forma de exposição das plantas a esse metal.

Quadro 2 - Constantes cinéticas da absorção de íons  $Cd^{2+}$  em plantas de aguapé e salvinia, permitindo-se ou não o contato das folhas com a solução nutritiva

Contato das folhas com a solução nutritiva	Km		Vmax	
	Aguapé	Salvinia	Aguapé	Salvinia
	----- ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) -----		----- ( $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MS}$ ) -----	
Sim	4,04 Aa <sup>1</sup>	4,19 Ba	4,26 Ab	10,44 Aa
Não	3,94 Ab	4,65 Aa	4,32 Ab	7,99 Ba

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada espécie, e minúsculas nas linhas, para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Quadro 3 - Concentração de Cd em plantas de aguapé e salvinia, permitindo-se ou não o contato das folhas com a solução nutritiva

Contato das folhas com a solução nutritiva	Concentração de Cd na planta			
	Aguapé		Salvinia	
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
	(µg g <sup>-1</sup> MS)			
Sim	105,6 Ab <sup>1</sup>	13,5 Ab	381,7 Aa	141,0 Aa
Não	93,1 Ab	10,8 Ba	348,6 Aa	14,1 Ba

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta, e minúsculas nas linhas entre espécies, para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

#### 4.6. Acúmulo e distribuição de Cd

A absorção de Cd, bastante elevada após 12 horas de exposição, principalmente em salvinia, decresceu rapidamente com o tempo de exposição das plantas a esse elemento, tanto na raiz como na parte aérea das duas espécies aquáticas analisadas (Figura 7). A absorção de Cd pelas raízes de aguapé, elevada nas primeiras 12 horas, cai abruptamente e, após três dias, assume uma taxa de decréscimo mais ou menos constante e baixa até 10 dias de exposição. Observação semelhante foi feita por DELGADO et al. (1993), em que plantas de aguapé apresentaram rápida absorção de Cd em soluções contendo 0,25; 0,50; e 0,75 mg L<sup>-1</sup> desse metal, tendendo, posteriormente, a uma taxa constante de absorção durante os 24 dias de exposição das plantas. Convém ressaltar que a absorção de Cd pelas folhas de aguapé se deve, basicamente, ao Cd translocado das raízes. Essa absorção manteve-se baixa até os 10 dias de exposição.

Em salvinia, após o período inicial de intensa absorção, observou-se, também, elevado decréscimo na absorção, à medida que se aumentou o tempo de exposição, evidenciando os efeitos tóxicos do metal sobre o processo de absorção. As folhas de salvinia, entretanto, no início apresentaram absorção de

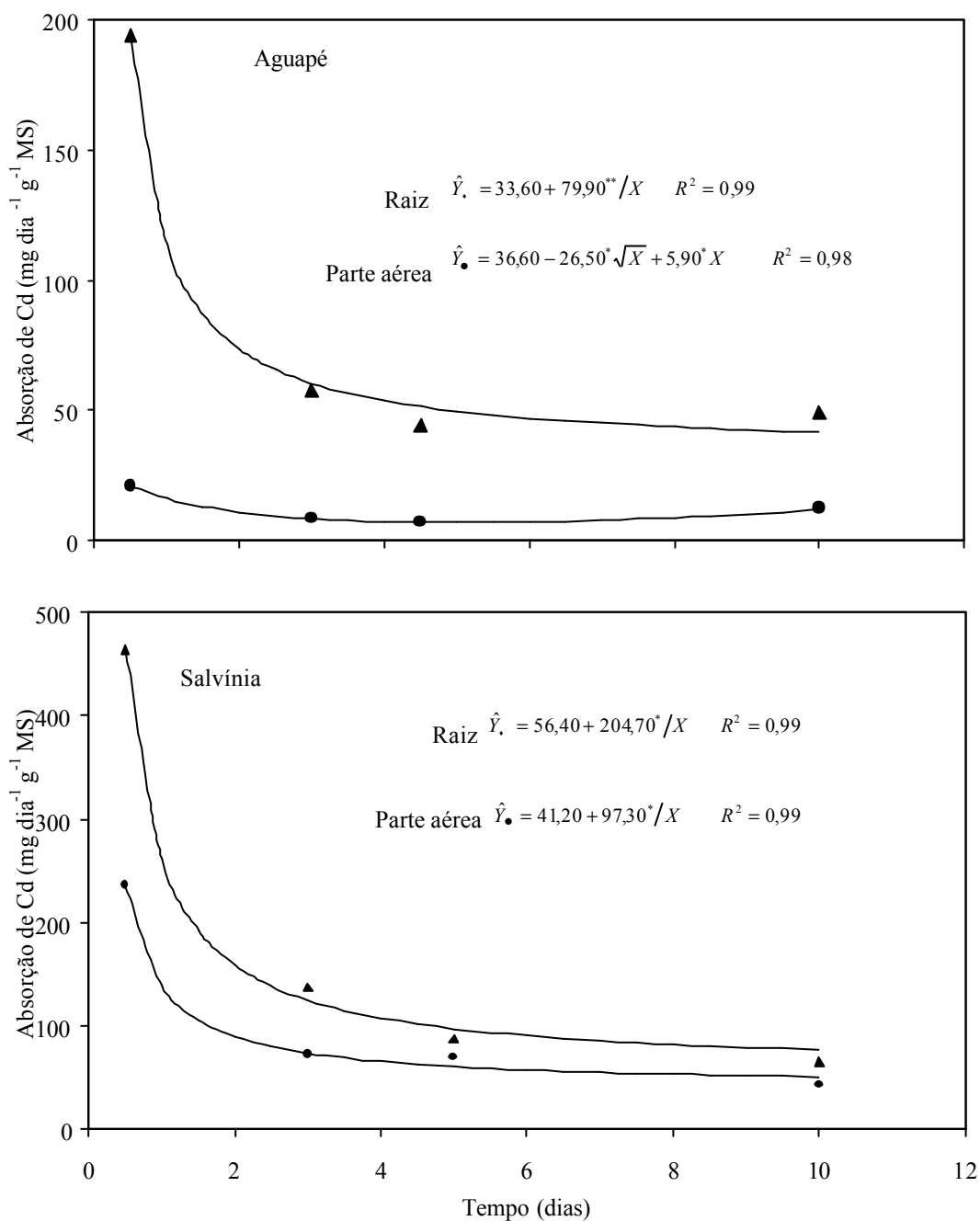


Figura 7 - Absorção de Cd por plantas de aguapé e salvinia em função do tempo de exposição a uma solução de cultivo contendo Cd na concentração de 5  $\mu\text{moles L}^{-1}$ .

Cd mais de 11 vezes superior às de aguapé. Nesse caso, provavelmente o cádmio presente nas folhas se deveu ao processo de translocação das raízes e parte significativa foi devida à absorção diretamente da solução nutritiva.

A concentração de Cd aumentou tanto nas raízes como na parte aérea das duas espécies aquáticas em função do tempo de exposição ao Cd (Figura 8). Em aguapé, a concentração de Cd aumentou continuamente com o tempo de exposição ao Cd, passando de 57 para 493  $\mu\text{g g}^{-1}$  de matéria seca nas raízes e de 6 para 122  $\mu\text{g g}^{-1}$  de matéria seca nas folhas, entre 12 horas e 10 dias de exposição.

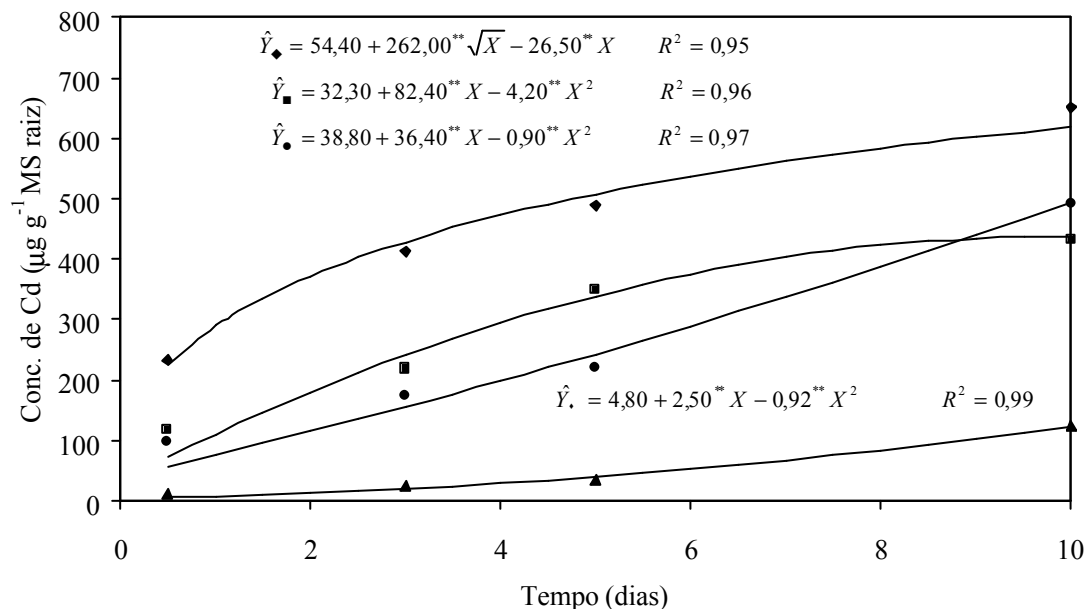


Figura 8 - Concentração de Cd em raízes e parte aérea de plantas de aguapé e salvinia, em função do tempo de exposição a uma solução nutritiva contendo Cd na concentração de  $5 \mu\text{moles L}^{-1}$  (aguapé: raízes (●) e parte aérea (♦) e salvinia: “raízes” (◆) e parte aérea (■)).



Os aumentos nos teores de Cd em raízes e folhas de aguapé, entretanto, não foram suficientes para provocar danos visíveis acentuados nas plantas, pelo menos dentro do período de tempo analisado, contrariamente ao que ocorreu com a salvinia. Elevação na concentração de Cd em plantas de aguapé em função do aumento do tempo de exposição foi também verificada por DING et al. (1994). Eles encontraram no sistema radicular de plantas de aguapé, mantidas em água contendo  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de íons  $\text{Cd}^{2+}$ , concentrações de Cd da ordem de 21,2; 31,3; e  $32,3 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de matéria fresca de raiz após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente.

Em salvinia, o aumento na concentração de Cd foi semelhante ao que aconteceu no aguapé, mas as concentrações foram significativamente maiores, tanto nas “raízes” como nas folhas. As concentrações mais elevadas de Cd observadas nas raízes e folhas de salvinia, principalmente no décimo dia de exposição, possivelmente se deveu à incapacidade destas plantas em controlar a aquisição desse elemento. As plantas de salvinia apresentaram, durante todo o período de exposição, concentrações de Cd bem maiores que as plantas de aguapé, o que certamente resultou na manifestação mais precoce dos sintomas de toxidez.

Cerca de 88% do Cd absorvido por plantas de aguapé acumulou-se nas raízes após 12 horas de exposição, mas essa porcentagem decresceu com o aumento do tempo de exposição para cerca de 70% (Figura 9). Em salvinia, a distribuição do Cd absorvido, em comparação com o aguapé, foi semelhante nas duas partes da planta, provavelmente em razão de uma participação efetiva das folhas no processo de absorção.

Em salvinia, no primeiro dia as raízes apresentavam porcentagem de Cd ligeiramente superior à parte aérea, mas, após três dias de exposição, o Cd passou a localizar-se preferencialmente na parte aérea. O aumento da participação da parte aérea na quantidade de Cd absorvido deveu-se, basicamente, ao maior crescimento apresentado por essa parte da planta, uma vez que os efeitos tóxicos do Cd foram mais intensos nas raízes. Dessa forma, a parte aérea apresentou maior incremento de peso de matéria seca do que as raízes, resultando, assim, em maior acúmulo do Cd absorvido naquela parte da planta.

O aumento no tempo de exposição de plantas aquáticas ao Cd afetou não somente a quantidade de Cd absorvido, mas também a distribuição subcelular

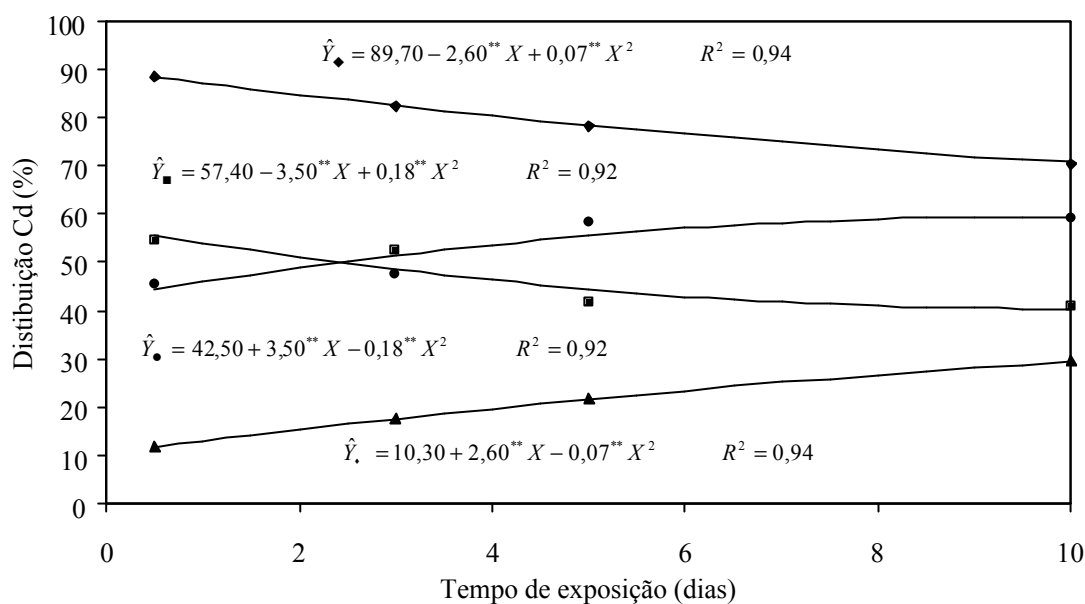


Figura 9 - Distribuição porcentual de Cd absorvido nas duas partes das plantas de aguapé e salvinia expostas a  $5 \mu\text{moles L}^{-1}$  de íons  $\text{Cd}^{2+}$ , em função do tempo (aguapé: raízes (◆) e parte aérea (◊) e salvinia: “raízes” (■) e folhas (●)).

desse metal. Em aguapé, o Cd nas raízes acumulou-se predominantemente na fração solúvel e nas paredes celulares, acúmulo esse que aumentou com a elevação do tempo de exposição das plantas ao Cd, especialmente na fração solúvel (FETT et al., 1994).

Conforme já relatado em ensaios anteriores, o aumento na concentração de Cd na solução nutritiva resultou também em aumento na concentração desse elemento nos tecidos das plantas. No entanto, como as plantas utilizadas neste experimento eram de espécies bem diferentes, observou-se que a forma como elas contactaram a solução nutritiva foi importante para absorção e acúmulo de Cd (Quadro 4).

Em aguapé, tanto nas folhas como nas raízes, independentemente da concentração de Cd a que foram expostas, a forma de contato das plantas com a solução de cultivo não afetou significativamente a sua absorção, sendo obtidos

quase que os mesmos valores, nas duas formas de contato, para cada concentração de Cd na solução.

Em salvinia, ao contrário, a forma de exposição das plantas ao Cd afetou significativamente as concentrações desse elemento na parte aérea, nas duas concentrações estudadas. Nas “raízes”, essas concentrações foram essencialmente as mesmas nos dois modos de exposição relativos a cada uma das concentrações estudadas. Quando as folhas de salvinia tiveram contato com a solução, entretanto, as concentrações de Cd nas folhas foram significativamente maiores que aquelas apresentadas pelas folhas sem contato direto com a solução. As concentrações de Cd, no primeiro caso, foram, em média, aproximadamente seis vezes maior do que no segundo.

Quadro 4 - Influência da forma de exposição das plantas sobre a concentração de Cd na raiz e na parte aérea das plantas de aguapé e salvinia submetidas a 1 e 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de íons  $\text{Cd}^{2+}$ , em solução nutritiva

Concentração de Cd					
Cd	Contato das folhas com a solução nutritiva	Aguapé		Salvinia	
		Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
- ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) -		----- ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$ ) -----			
1,0	Sim	79,4 Aa <sup>1</sup>	9,5 Ab	56,1 Ab	45,3 Aa
	Não	82,8 Aa	9,5 Aa	63,6 Aa	7,5 Bb
5,0	Sim	186,8 Ab	23,3 Ab	388,1 Aa	221,5 Aa
	Não	191,7 Ab	25,8 Ab	385,5 Aa	36,2 Ba

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta e dose de Cd, e minúsculas nas linhas entre espécies, para cada tratamento e parte da planta, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A distribuição do Cd absorvido nas duas partes das plantas de aguapé não foi influenciada significativamente pela forma de exposição ao Cd (Quadro 5). Em salvínia, entretanto, quando as folhas foram mantidas em contato com a solução de cultivo, verificou-se expressiva participação dessa parte da planta no acúmulo de Cd, o que pode ser resultado tanto da absorção direta pelas folhas como da translocação do Cd absorvido pelas “raízes”.

A primeira hipótese adquire consistência quando é comparada a concentração de Cd nas folhas que contactaram a solução nutritiva com aquela de folhas que não estavam em contato com a solução de cultivo e que, nesse caso, representava o Cd adquirido exclusivamente pelo processo de translocação (Quadro 4).

Aparentemente, as plantas de salvínia são tão eficientes em reter o Cd nas “raízes” quanto o aguapé, uma vez que as raízes desta planta apresentaram significativa retenção do Cd absorvido, como demonstrado no experimento em

Quadro 5 - Distribuição porcentual de Cd absorvido em raízes e parte aérea de plantas de aguapé e salvínia expostas a 1 e 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de íons  $\text{Cd}^{2+}$ , em solução nutritiva por três dias, permitindo-se ou não o contato das folhas com a solução de cultivo

Cd - ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) -	Contato das folhas com a solução nutritiva	Distribuição do Cd			
		Aguapé		Salvínia	
		Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
		----- (%) -----			
1,0	Sim	88,1 Aa <sup>1</sup>	11,9 Ab	56,2 Bb	43,8 Aa
	Não	84,2 Ab	15,8 Aa	92,9 Aa	7,1 Bb
5,0	Sim	82,4 Aa	17,6 Ab	52,8 Ab	47,2 Aa
	Não	85,8 Aa	14,2 Aa	85,3 Ba	14,7 Ba

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta e dose de Cd, e minúsculas nas linhas entre espécies, para cada

tratamento e parte da planta, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

que as folhas não tiveram contato com a solução nutritiva. Além disso, as plantas de aguapé apresentaram sensível redução no aparecimento de sintomas de toxidez, quando comparadas com as plantas cuja exposição ao Cd foi feita pelo contato das folhas com a solução.

Além de vários fatores que afetam a absorção, como a concentração do íon em solução, a natureza e a concentração dos íons competidores, a presença de agente complexante, a taxa de agitação, o volume da solução, o pH e a massa do sistema radicular (TURNQUIST et al., 1990), pode-se mencionar que a forma de contato das folhas com a solução de cultivo contendo Cd, particularmente para o caso de estudo com salvinia, afeta a absorção desse metal.

#### **4.7. Efeito do Cd sobre a absorção e a assimilação de enxofre**

##### **4.7.1. Cinética de absorção de enxofre**

O cultivo das duas espécies durante três dias em solução nutritiva contendo Cd não alterou significativamente o valor de Km para absorção de sulfato em aguapé, quer o Cd estivesse ou não no meio de absorção (Quadro 6). Em salvinia, entretanto, observou-se um aumento médio de 41% no valor desta constante cinética. Ao adicionar Cd ao meio de absorção, no momento da avaliação das constantes cinéticas, independentemente do cultivo das plantas na presença ou não de Cd, observou-se uma redução de aproximadamente 14% no valor de Km em aguapé. Em salvinia, no entanto, houve aumento da ordem de 20% nos valores de Km, com a adição de Cd ao meio de absorção. Esse elemento, portanto, de algum modo alterou a conformação do transportador de sulfato, supostamente em simporte  $2H^+/SO_4^{2-}$  (CRAM, 1990), aumentando a afinidade do sistema de transporte com o ânion sulfato em aguapé, mas diminuindo-a em salvinia.

A diminuição do Km para absorção do sulfato, no caso do aguapé, pode, também, ser devida à biossíntese *de novo* e a incorporação de uma permease de sulfato na membrana plasmática ou a um aumento na atividade da permease constitutiva (LAUDENBACH e GROSSMAN, 1991).

Quadro 6 - Constantes cinéticas de absorção de sulfato de duas espécies de plantas aquáticas na ausência e na presença de Cd

Cd		Constante cinética			
Meio de cultivo	Meio de absorção ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Km		Vmax	
		Aguapé	Salvinia	Aguapé ( $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ )	Salvinia
0	0	<sup>a</sup> 3,98 Aa <sup>1</sup>	<sup>a</sup> 2,35 Ab	<sup>a</sup> 0,88 Ba	<sup>b</sup> 0,78 Aa
	5	<sup>a</sup> 3,55 Ba	<sup>a</sup> 2,89 Bb	<sup>a</sup> 1,51 Aa	<sup>a</sup> 0,85 Ab
5	0	<sup>a</sup> 4,00 Aa	<sup>b</sup> 3,40 Ab	<sup>a</sup> 0,88 Bb	<sup>a</sup> 1,20 Ba
	5	<sup>a</sup> 3,32 Bb	<sup>b</sup> 4,00 Ba	<sup>b</sup> 1,07 Aa	<sup>a</sup> 0,78 Ab

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada dose de Cd no meio de cultivo, e minúsculas nas linhas, para cada dose de Cd no meio de absorção, e pela mesma letra sobrescrita e subscrita à esquerda para cada dose de Cd no meio de absorção, para os valores de Km e Vmax, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Na ausência de Cd no meio de cultivo, observou-se, em aguapé, aumento no valor de Vmax de 72% quando as plantas foram expostas ao Cd apenas no momento da avaliação da constante cinética. Quando as plantas foram cultivadas na presença de Cd, mas este elemento não estava presente no meio de absorção, observou-se, entretanto, que o valor de Vmax foi aproximadamente o mesmo das plantas-controle, que não receberam qualquer tratamento com Cd. Quando o Cd estava presente no meio de cultivo e no meio de absorção, entretanto, verificou-se um aumento de cerca de 22% no valor de Vmax em relação às plantas cultivadas em meio com Cd e transferidas para meio sem Cd no momento da avaliação cinética.

Em salvinia, quando as plantas foram expostas ao Cd durante o cultivo ou apenas no momento da avaliação da constante cinética, não se observou alteração significativa no valor de Vmax. Quando as plantas foram cultivadas na presença de Cd e este elemento também foi adicionado ao meio de absorção no momento da

avaliação da constante cinética, observou-se redução no valor de  $V_{max}$  de cerca de 35%.

Os aumentos de  $V_{max}$  podem ser resultantes de uma crescente demanda de enxofre para a síntese de compostos tiolados, determinada pelo mecanismo de tolerância ao Cd. As fitoquelatinas, peptídios ricos em cisteína, requerem quantidades relativamente grandes de enxofre reduzido, que, por sua vez, depende de um influxo crescente de íons  $SO_4^{2-}$ . Paralelamente, deve ocorrer aumento na taxa de redução assimilatória do sulfato em plantas expostas ao Cd. Assim, a diferenciação entre plantas tolerantes ou não ao Cd poderia ser pela sua capacidade de aumentar a assimilação de sulfato na intensidade requerida para a síntese de fitoquelatina (RUEGSEGGER et al., 1990).

Nas plantas de aguapé que foram cultivadas com Cd, ao transferi-las para a solução sem Cd ocorreu redução do valor de  $V_{max}$  em relação às plantas que foram mantidas na solução com Cd, ao passo que, em salvínia, ocorreu processo inverso, ou seja, aumento do valor de  $V_{max}$ .

Reduções de  $V_{max}$  indicam ter havido diminuição do número de transportadores (ALVES, 1984) pela redução na síntese *de novo* da proteína transportadora (JENSEN e KONIG, 1982) e, ou, redução da área superficial de membrana. A absorção do sulfato pode ter sido alterada pela ação tóxica do Cd sobre as proteínas ligantes desse ânion, uma vez que evidências indicam o envolvimento dessas proteínas no transporte do sulfato através da membrana, como observado em cianobactérias (KANYO e CHRISTIANSON, 1991).

Aparentemente, tanto a absorção de íons  $SO_4^{2-}$  como a sulfúrilase do ATP são, provavelmente, componentes do sistema de aquisição de enxofre que se mantêm sob baixa atividade em condições normais, mas são liberados quando o requerimento de S aumenta. Um dos sinais responsáveis pela repressão de absorção de íons  $SO_4^{2-}$  parece ser a concentração interna deste íon (DATKO e MUDD, 1984) ou um dos produtos de sua redução, como a glutatona (HERSCHBACH e RENNENBERG, 1991; LAPPARTIENT e TOURAINÉ, 1996).

Como o Cd afetou os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  diferentemente nas duas espécies, isso pode estar relacionado com alterações anatômicas e celulares que ocorrem no sistema radicular na presença desse elemento, conforme salientaram GUPTA e DEVI (1992). Deve-se ressaltar, porém, que os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  podem variar consideravelmente entre espécies, com o estágio de desenvolvimento

das plantas e com a concentração de sulfato, nas soluções de pré-tratamento e de absorção (JENSEN e KONIG, 1982).

#### **4.7.2. Efeito do Cd sobre a atividade da sulfurilase do ATP**

O aguapé apresentou atividade da sulfurilase do ATP significativamente maior do que a salvinia, especialmente na parte aérea, exceto na raiz das plantas-controle (Quadro 7). A presença de Cd na solução nutritiva aumentou significativamente a atividade da sulfurilase do ATP em plantas de aguapé, alcançando acréscimos da ordem de 120 e 64%, na raiz e na parte aérea, respectivamente. A atividade desta enzima na parte aérea de aguapé foi, em média, 3,5 vezes superior à da raiz.

Em plantas-controle de salvinia, a atividade da sulfurilase do ATP foi aproximadamente igual nas duas partes da planta. Na presença de Cd, entretanto, observou-se aumento significativo na atividade da enzima apenas nas folhas, atingindo um valor em torno de três vezes maior que aquele apresentado pela planta-controle. É interessante observar que, em plantas de milho expostas às mesmas concentrações de Cd aqui descritas, foi observado aumento de duas vezes nas atividades da referida enzima em relação ao tratamento-controle (NUSSBAUM et al., 1988).

Observou-se maior atividade da sulfurilase do ATP na parte aérea de ambas as espécies, mas sempre se obteve certa atividade nas raízes, conforme relataram ONAJOBÍ et al. (1973). Esses resultados são consistentes com o fato de que a maior parte do sulfato absorvido pelas raízes é translocada para a parte aérea, onde é reduzido e, ou, assimilado, principalmente em aguapé (RENNENBERG, 1984; MARSCHNER, 1995). Em salvinia, isso parece acontecer apenas na presença de Cd.

Esses resultados, comparados com os valores de  $V_{max}$  para a absorção de sulfato sob idênticas condições experimentais, indicam a existência de estreita relação entre a absorção de sulfato e a atividade da enzima sulfurilase do ATP, conforme proposto por CACCO et al. (1977). Parece existir um mecanismo regulatório comum para as duas atividades, isto é, aumentando a quantidade de



Quadro 7 - Efeito do cádmio sobre a atividade da enzima sulfúrilase do ATP em plantas de aguapé e salvinia expostas a 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de íons  $\text{Cd}^{2+}$

Cd	Atividade da enzima sulfúrilase do ATP					
	Aguapé			Salvinia		
	Raiz	Folha	Folha/Raiz	Raiz	Folha	Folha/Raiz
- ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) -	----- ( $\mu\text{mol Pi h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$ ) -----					
0,0	4,0 Ba <sup>1</sup>	15,3 Ba	3,8 Aa	3,9 Aa	4,2 Bb	1,1 Bb
5,0	8,8 Aa	25,1 Aa	2,8 Ab	4,0 Ab	14,2 Ab	3,5 Aa

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta, e minúsculas nas linhas entre espécies, para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

sulfato absorvido, há incremento na atividade da sulfúrilase do ATP, que dá início ao processo de assimilação do enxofre.

DE KNECHT et al. (1995) relataram que o aumento da atividade dessa enzima na presença de metais pesados produz aumento na atividade de toda a rota metabólica de redução e assimilação do enxofre, resultando em aumento na disponibilidade de substrato para a biossíntese de fitoquelatinas, envolvidas no mecanismo de tolerância a esses metais. Tal aumento na atividade da sulfúrilase do ATP induzido pelo Cd, entretanto, parece ser reversível, pois redução nos níveis de Cd na solução nutritiva é acompanhada por decréscimos na atividade da enzima até atingir valores semelhantes aos das plantas-controle (NUSSBAUM et al., 1988).

#### 4.7.3. Efeito do Cd sobre a concentração de tióis solúveis totais, cisteína, $\gamma$ -glutamilcisteína e glutathione

A presença de Cd na solução nutritiva não alterou significativamente as concentrações de tióis totais em raízes e folhas das duas espécies de plantas, embora houvesse tendência de aumento nas raízes (+7%) e folhas (+22%) de aguapé e de decréscimo nas folhas de salvinia (-15%) (Quadro 8). Plantas de aguapé apresentaram concentrações maiores de tióis solúveis totais que as plantas

de salvinia, nas duas partes das plantas analisadas, o que indica maior capacidade de retenção de Cd sem sofrer os efeitos tóxicos deste metal pesado (FLORIJN et al., 1993; DING, 1994).

A maior sensibilidade de plantas de salvinia, comparada com as de aguapé, parece ter sido devido à sua incapacidade de sintetizar concentrações suficientemente elevadas de compostos tiólicos, principalmente na parte aérea. Nesta parte da planta e na presença de Cd, o aguapé apresentou concentração de tióis solúveis totais 99% maior do que a salvinia, o que, devido à maior massa vegetal do aguapé, representa quantidades de compostos tióis solúveis totais significativamente maiores do que plantas de salvinia. Portanto, já de início, ao ser exposto ao Cd, o aguapé teria condições de ser mais tolerante do que a salvinia. Conclusões semelhantes foram obtidas por RUEGSEGGER et al. (1990), ao trabalharem com plantas de ervilha, consideradas sensíveis ao Cd, e de milho, que apresentam certa tolerância a este metal pesado.

As plantas expostas a níveis tóxicos de Cd podem produzir e acumular concentrações mais elevadas de tióis solúveis (OUTRIDGE et al., 1991; RUEGSEGGER e BRUNOLD, 1992; FLORIJN et al., 1993; DING, 1994). Neste experimento, no entanto, as concentrações de tióis solúveis totais praticamente não sofreram alteração quando as plantas foram expostas ao Cd, pelo menos no nível de Cd na solução de cultivo e tempo de exposição utilizados. Dados da literatura corroboram esse resultado, indicando que nem sempre há modificação na concentração de tióis solúveis totais (TUKENDORF e RAUSER, 1990).

As concentrações de tióis solúveis totais parecem ser influenciados por alguns fatores, como: tempo de exposição ao Cd (DING et al., 1994) e concentração do metal pesado (TUKENDORF e RAUSER, 1990; GALLI et al., 1996). Segundo a literatura, outros tipos de tióis, mais diretamente envolvidos na síntese de fitoquelatinas, como a cisteína, a  $\gamma$ -glutamilcisteína e a glutatona, é que teriam suas concentrações alteradas após exposição da planta a níveis tóxicos de Cd. Geralmente, esses outros tióis é que teriam relação com a tolerância diferencial ao Cd apresentada pelas plantas.

Quadro 8 - Concentrações de tióis solúveis totais em raízes e parte aérea de plantas de aguapé e salvinia expostas ou não a 5  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd

Cd	Concentração			
	Aguapé		Salvinia	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
--(μmol L <sup>-1</sup> )--	-----(nmol SH g <sup>-1</sup> MF)-----			
0	150,7 Aa <sup>1</sup>	210,9 Aa	132,7 Aa	152,2 Ab
5	161,4 Aa	257,5 Aa	131,4 Aa	129,7 Ab

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta, e minúsculas nas linhas entre espécies, para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Confirmando essa hipótese, verificou-se que plantas de aguapé expostas ao Cd apresentaram as concentrações de cisteína nas folhas significativamente mais elevadas do que as plantas de salvinia (Quadro 9). As folhas de aguapé em presença do Cd apresentaram acréscimos da ordem de 81% nas concentrações de cisteína, em relação às plantas-controle, mas não se observou influência significativa sobre esse valor nas raízes. A salvinia, no entanto, quando exposta ao Cd não sofreu alteração significativa na concentração de cisteína, tanto na parte aérea como no sistema radicular. Observou-se, apenas, ligeira tendência de aumento na concentração de cisteína no sistema radicular, em comparação com as plantas-controle.

Em plantas de milho expostas ao Cd na concentração de 50 μmoles L<sup>-1</sup> por quatro dias foi observado incremento na concentração de cisteína da ordem de 200% em relação às plantas-controle (RUEGSEGGER e BRUNOLD, 1992). Os acréscimos em concentrações de cisteína observados aqui, apenas em folhas de aguapé, induzidos por níveis tóxicos de Cd, parecem ser requeridos em face de uma crescente demanda deste aminoácido na biossíntese de fitoquelatinas. Aparentemente, os mecanismos de tolerância a metal pesado, além de maior demanda por cisteína, parecem requerer maior absorção de sulfato e maior atividade de enzimas envolvidas na síntese deste aminoácido, como a sulfurilase do ATP e outras enzimas, conforme relataram NUSSBAUM et al. (1988).

A maior disponibilidade de cisteína, por sua vez, parece resultar em aumento da biossíntese de  $\gamma$ -glutamilcisteína, importante precursor da biossíntese de fitoquelatinas (STEFFENS, 1990). De fato, neste experimento as concentrações de  $\gamma$ -glutamilcisteína sofreram aumentos significativos em plantas de aguapé e salvinia expostas ao Cd, tanto em raízes como em folhas (Quadro 10). O aumento na concentração de  $\gamma$ -glutamilcisteína nas plantas expostas ao Cd foi, em média, de oito e cinco vezes em aguapé e salvinia, respectivamente.

Quadro 9 - Concentrações de cisteína em raízes e folhas de aguapé e salvinia expostas ou não a 5  $\mu$ moles L<sup>-1</sup> de Cd

Cd	Concentração			
	Aguapé		Salvinia	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
-- ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> ) --	----- (nmol SH g <sup>-1</sup> MF) -----			
0	7,8 Aa <sup>1</sup>	10,7 Ba	6,2 Aa	9,5 Aa
5	9,7 Aa	19,4 Aa	7,5 Aa	8,2 Ab

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta, e minúsculas nas linhas entre espécies, para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Quadro 10 - Concentrações de  $\gamma$ -glutamilcisteína em raízes e folhas de aguapé e salvinia expostas ou não a 5  $\mu$ moles L<sup>-1</sup> de Cd

Cd	Concentração			
	Aguapé		Salvinia	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
--(μmol L <sup>-1</sup> )--	-----(nmol SH g <sup>-1</sup> MF)-----			
0	2,4 Ba <sup>1</sup>	2,5 Ba	1,3 Ba	1,4 Ba
5	14,3 Aa	22,6 Aa	6,6 Ab	7,7 Ab

1. As médias, seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta, e minúsculas nas linhas entre espécies, para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

RUEGSEGGER e BRUNOLD (1992) observaram, também, grande aumento em  $\gamma$ -glutamilcisteína, tanto em raízes como na parte aérea de plântulas de milho tratadas com Cd, o que, segundo esses autores, poderia ser resultado da maior atividade da enzima sintetase da  $\gamma$ -glutamilcisteína e do aumento na disponibilidade de cisteína. Esse aumento na disponibilidade de cisteína e de  $\gamma$ -glutamilcisteína, assim como das atividades tanto da sintetase da  $\gamma$ -glutamilcisteína quanto da sintetase da glutathione, resultaria também em aumento na síntese de glutathione, conforme relatado por STROHM et al. (1995). Isso é consistente com outras observações, em que a exposição de raízes ao Cd elevou as atividades de enzimas da redução assimilatória de sulfato e assimilação em cisteína, de modo a facilitar a síntese de fitoquelatinas a partir de seu precursor metabólico, a glutathione (RUEGSEGGER e BRUNOLD, 1992; RUEGSEGGER et al., 1990), o que está de acordo com os resultados aqui obtidos.

As concentrações de glutathione sofreram redução significativa apenas nas raízes, sem alteração significativa na parte aérea de aguapé (Quadro 11). Em salvinia, a presença do Cd no meio de cultivo não alterou as concentrações encontradas em relação às plantas-controle. OUTFRIDGE et al. (1991), entretanto, observaram queda nas concentrações de cisteína e glutathione em plantas de *Salvinia minima* expostas ao Cd sem, contudo, detectar alteração nas concentrações de

Quadro 11 - Concentrações de glutatona em raízes e folhas de aguapé e salvinia expostas ou não a 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Cd

Cd	Concentração			
	Aguapé		Salvinia	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
-- ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) --	----- (nmol SH g <sup>-1</sup> MF) -----			
0	126,4 Aa <sup>1</sup>	186,2 Aa	118,0 Aa	139,4 Ab
5	67,4 Ba	176,8 Aa	101,1 Aa	109,9 Ab

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta, e minúsculas nas linhas entre espécies, para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

outros peptídios. Nas duas espécies aqui analisadas, independentemente do tratamento aplicado, a concentração de glutatona constituiu na maior fração dos tióis solúveis totais. Acredita-se que esse tripeptídio localiza-se predominantemente nas folhas (RAUSER, 1987; DE KOK e STULEN, 1993; MARSCHNER, 1995), o que consubstancia os resultados aqui obtidos, especialmente na presença de Cd.

Decréscimos nas concentrações de glutatona causados por níveis tóxicos de Cd foram, também, observados em espinafre (DE VOS et al., 1992; TUKENDORF, 1993), em *Silene vulgaris* (DE KNECHT et al., 1992) e em milho (RUEGSEGGER e BRUNOLD, 1992).

É interessante lembrar que em plantas de *Silene vulgaris* expostas ao Cd, além da redução da concentração de glutatona, observou-se marcante aumento na concentração de fitoquelatina (DE KNECHT et al., 1992), indicando um importante papel deste tripeptídio na biossíntese de fitoquelatinas. A queda no conteúdo de glutatona induzida pelo Cd pode ter sido, entretanto, resultante da inibição de uma ou mais enzimas da biossíntese da glutatona e, ou, da redução no transporte de glutatona da parte aérea para as raízes pelo floema (GRILL et al., 1987; RAUSER, 1987). Como a indução da biossíntese de fitoquelatina parece ser parte do mecanismo de tolerância ao Cd em células vegetais, a disponibilidade de glutatona

pode ser importante elemento na adaptação de plantas ao estresse provocado pelo Cd (MENDUM et al., 1990).

As concentrações de “outros tióis solúveis” nas raízes e folhas de aguapé expostas ao Cd tiveram aumentos médios da ordem de quatro e três vezes, respectivamente (Quadro 12). Em salvinia, aumento significativo na concentração de “outros tióis solúveis” na presença do Cd ocorreu apenas na “raiz”. Uma vez que essa fração denominada “outros tióis solúveis” representa indiretamente a concentração de fitoquelatina, conforme relatado por DE KNECHT et al. (1992), essa diferença entre as duas espécies provavelmente representa a tolerância diferencial delas ao Cd.

Como a biossíntese e o acúmulo de fitoquelatinas têm sido relatados como um dos principais mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados (KNEER e ZENK, 1992; MEUWLY e RAUSER, 1992), espera-se que altas concentrações desse peptídeo ocorram em plantas mais tolerantes quando expostas ao metal pesado.

Quadro 12 - Concentrações de “outros tióis solúveis” em raízes e folhas de aguapé e salvinia expostas ou não a 5  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de Cd

Cd	Concentração			
	Aguapé		Salvinia	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
-- ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) --	----- (nmol SH $\text{g}^{-1}$ MF) -----			
0	19,7 Ba <sup>1</sup>	12,5 Ba	6,5 Bb	2,0 Ab
5	70,0 Aa	38,7 Aa	16,1 Ab	3,8 Ab

1. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta, e minúsculas nas linhas entre espécies, para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Além da concentração de Cd, o tempo de exposição das plantas ao metal também afetou sensivelmente a indução da biossíntese de peptídios capazes de ligar Cd, conforme relatado por FETT et al. (1994), em plantas de aguapé. KROTZ et al. (1989) observaram aumentos de 10 e 30% na quantidade de Cd ligado ao complexo Cd-peptídio quando células de fumo foram expostas ao Cd por 4 e 36 horas, respectivamente.

#### **4.7.4. Efeito do Cd sobre a produção e o acúmulo de compostos complexantes de Cd**

A detecção da presença desses complexos Cd-peptídio nas diversas frações eluídas baseou-se na presença de Cd e na razão de absorvâncias a 265 e 280 nm. Os complexos organo-Cd apresentaram caracteristicamente baixa absorção a 280 nm, devido à falta de aminoácidos aromáticos e à alta absorção a 265 nm, atribuída aos cromóforos metal-mercaptídeo (FUJITA e KAWANISHI, 1986). Portanto, aumento significativo na relação  $A_{265}/A_{280}$ , associado à presença do metal pesado, indica fortemente a existência desses complexos.

Extratos foliares de aguapé apresentaram, após fracionamento em coluna de DEAE-celulose, os perfis de distribuição de compostos que absorvem no  $A_{265}$  e  $A_{280}$  e de  $Cd^{2+}$ , apresentados na Figura 10. Nesse perfil de distribuição, o pico considerado mais importante no que concerne a compostos complexantes de Cd foi aquele que ocorreu nos tubos 69 e 70. Nesse ponto, observou-se aumento significativo na relação  $A_{265}/A_{280}$  nas plantas tratadas com Cd, atingindo os maiores valores na fração 70, ou seja, 1,1 e 1,6, nas plantas-controle e tratadas com Cd, respectivamente.

A análise da distribuição de Cd nesse mesmo extrato indicou apenas um pico entre as frações 60 e 80, com um máximo na fração 70. O incremento na razão  $A_{265}/A_{280}$ , portanto, coincidiu perfeitamente com o aumento da concentração de Cd nas frações correspondentes, indicando que, possivelmente, isso se deve à presença de compostos complexantes de Cd. Em raízes, obteve-se essencialmente o mesmo, apenas com picos mais elevados na razão  $A_{265}/A_{280}$  e nas concentrações de Cd (Figura 11). O aumento na razão  $A_{265}/A_{280}$  foi, também, significativo, sendo obtidos os valores de 1,1 e 1,7, nas plantas-controle e tratadas com Cd,



respectivamente. Isso indica maior participação dos compostos complexantes de Cd na retenção de Cd nas raízes.

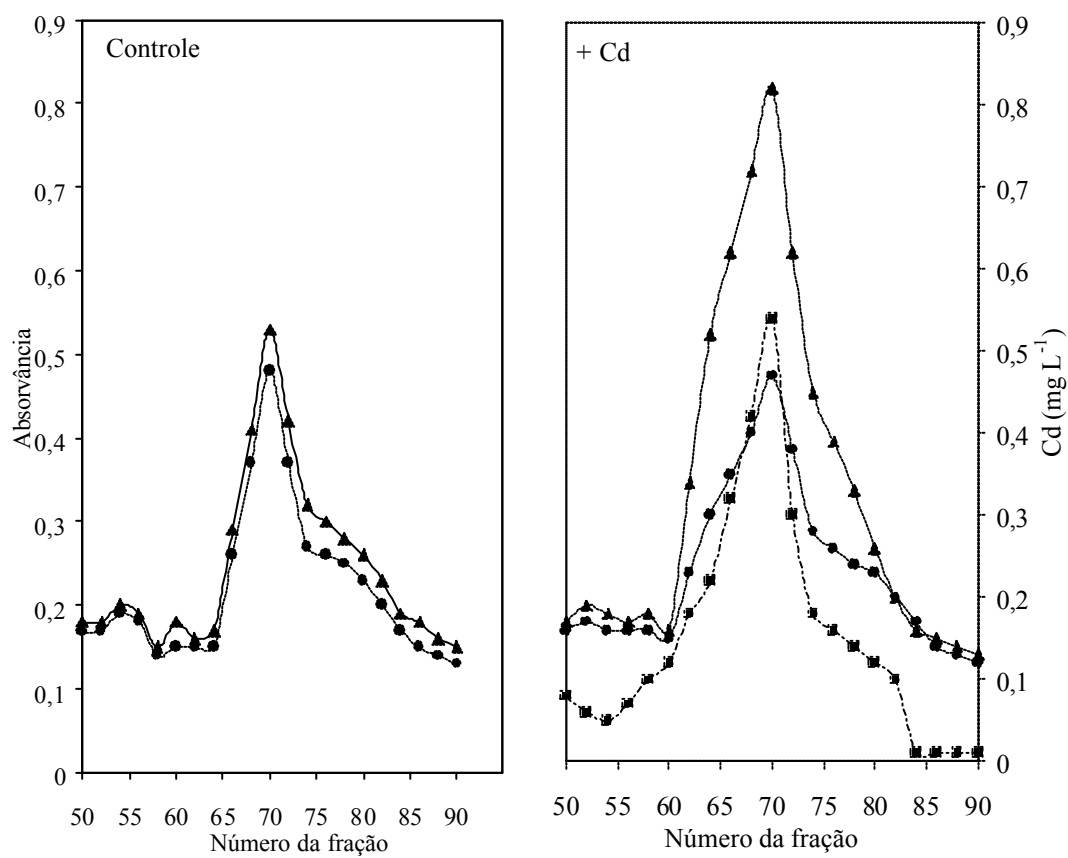


Figura 10 - Perfis de distribuição dos complexos Cd-peptídio e de Cd em coluna de DEAE-celulose de extratos de folha de aguapé cultivada em solução nutritiva contendo 0 e 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de íons  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\blacktriangle$ ,  $A_{265}$ ;  $\bullet$ ,  $A_{280}$ ;  $\blacksquare$ , Cd).

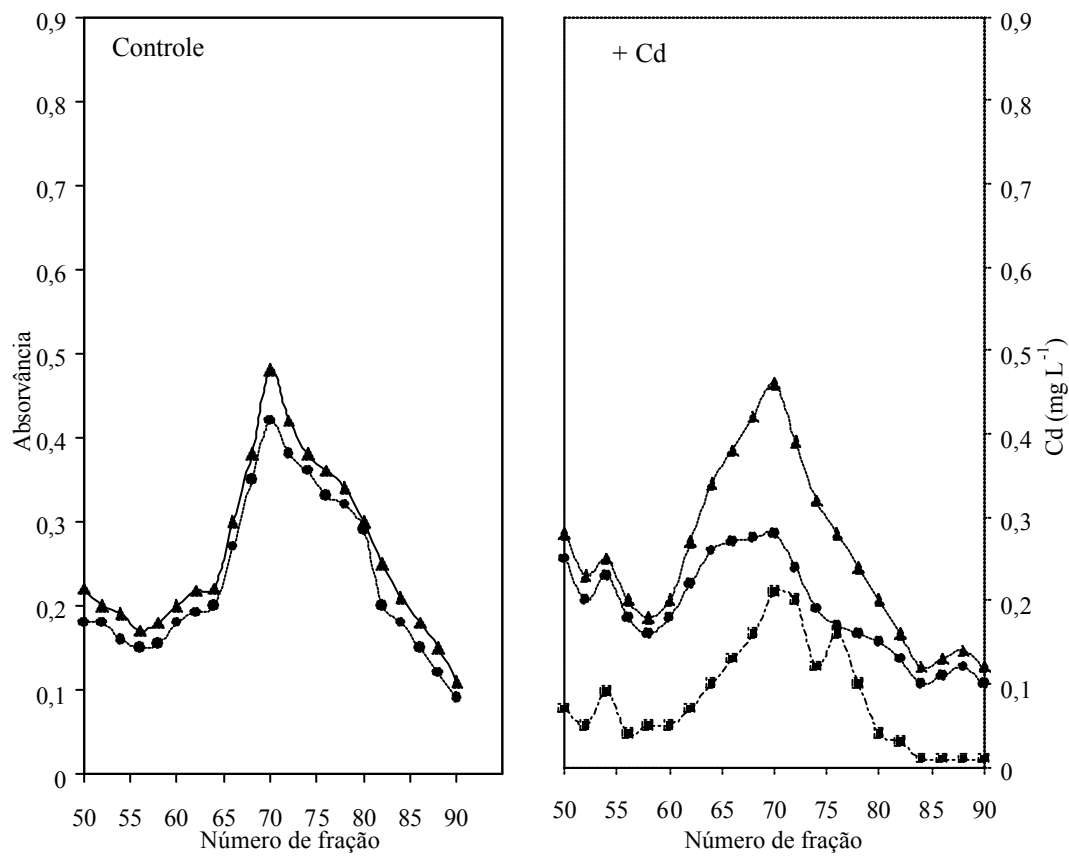


Figura 11 - Perfis de distribuição dos complexos Cd-peptídio e de Cd em coluna de DEAE-celulose de extratos de raiz de aguapé cultivada em solução nutritiva contendo 0 e 5  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de íons  $\text{Cd}^{2+}$  (•,  $A_{265}$ ; ●,  $A_{280}$ ; ■, Cd).

Os incrementos na razão de  $A_{265}/A_{280}$  observados neste trabalho são semelhantes àqueles obtidos por FUJITA e KAWANISHI (1986) com aguapé, que foi de 1,77 nos extratos de raízes.

Extratos foliares de salvínia apresentaram, após fracionamento em coluna de DEAE-celulose, os perfis de distribuição de compostos que absorvem no  $A_{265}$  e  $A_{280}$  e de íons  $\text{Cd}^{2+}$ , apresentados na Figura 12. Nesse perfil de distribuição, o pico considerado mais importante, no que concerne a compostos complexantes de Cd, foi aquele que ocorreu nos tubos 69 e 70. Nesse ponto, observou-se aumento significativo na relação  $A_{265}/A_{280}$ , que atingiu os maiores valores na fração 70, em que foram 1,2 e 1,7, nas plantas-controle e tratadas com Cd, respectivamente.

A análise da distribuição de Cd nesse mesmo extrato mostrou que parte significativa do Cd foi eluída antes da adição do tampão de eluição contendo KCl 0,4 mol  $\text{L}^{-1}$ . Entretanto, as maiores concentrações de Cd também coincidiram com o maior incremento na razão de absorvância a 265 e 280 nm. O incremento na razão  $A_{265}/A_{280}$ , portanto, coincidiu perfeitamente com o aumento da concentração de Cd nas frações correspondentes, indicando que, possivelmente, isso se deve à presença de compostos complexantes de Cd.

Em raízes, obteve-se comportamento essencialmente semelhante, apenas com picos mais elevados na razão  $A_{265}/A_{280}$  e nas concentrações de Cd. A razão  $A_{265}/A_{280}$  foi de 1,2 e 1,7, nas plantas-controle e tratadas com Cd, respectivamente (Figura 13). Isso indica maior participação dos compostos complexantes de Cd na retenção deste elemento nas raízes.

A maior parte do Cd presente nos extratos de raízes e folhas de aguapé expostas ao Cd eluiu no tampão com KCl 0,4 mol  $\text{L}^{-1}$ , mas pouco ou nenhum no tampão puro ou com KCl apenas 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ . Resultados similares foram, também, obtidos por FUJITA (1985) em plantas de aguapé expostas ao Cd, em concentrações bem mais elevadas (26,7  $\mu\text{moles L}^{-1}$ ) do que as utilizadas neste experimento.

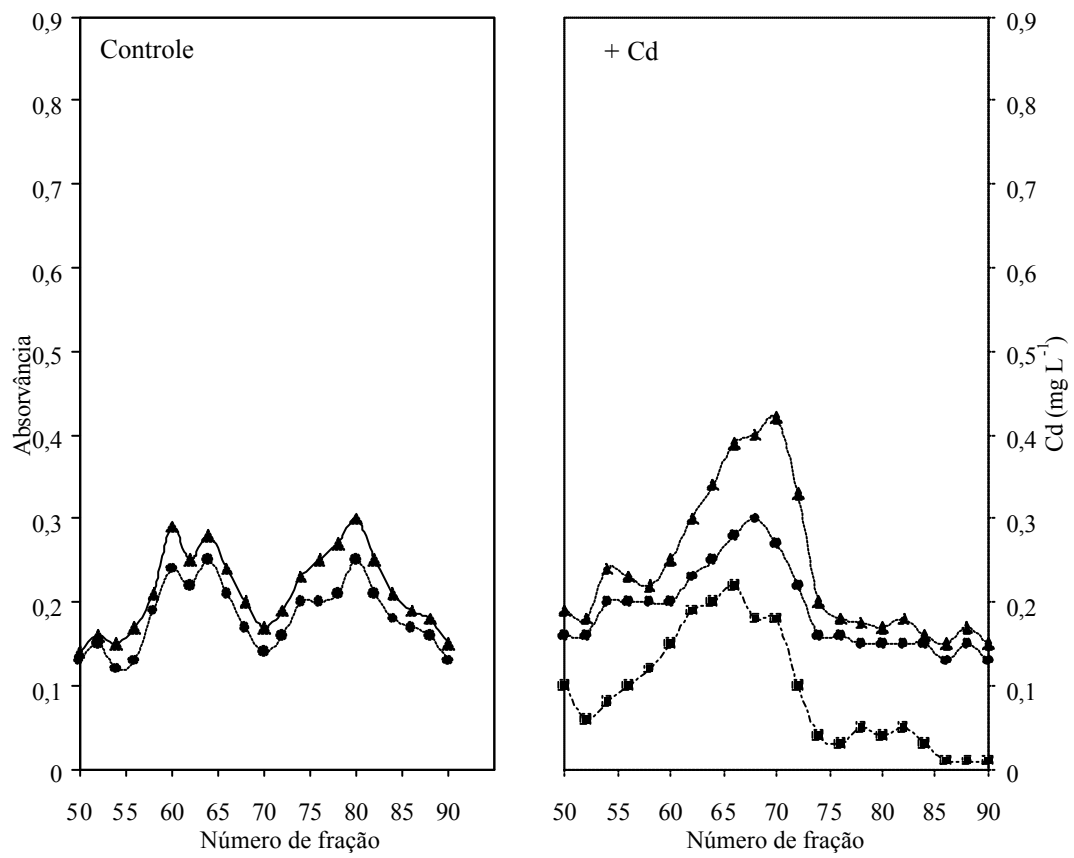


Figura 12 - Perfis de distribuição dos complexos Cd-peptídio e de Cd em coluna de DEAE-celulose de extratos de folha de salvinia cultivada em solução nutritiva contendo 0 e 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de íons  $\text{Cd}^{2+}$  (▲,  $A_{265}$ ; ●,  $A_{280}$ ; ■, Cd).

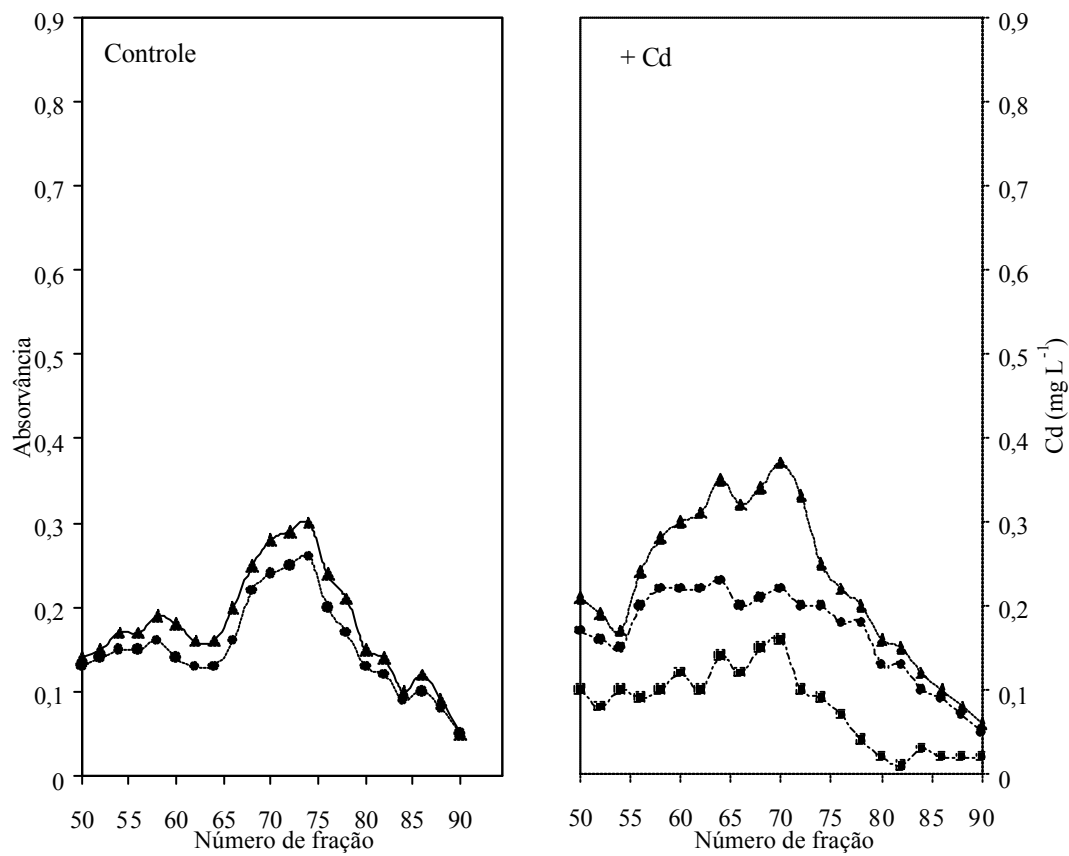


Figura 13 - Perfis de distribuição dos complexos Cd-peptídio e de Cd em coluna de DEAE-celulose de extratos de “raiz” de salvinia cultivada em solução nutritiva contendo 0 e 5  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de íons  $\text{Cd}^{2+}$  (•,  $A_{265}$ ; ●,  $A_{280}$ ; ■, Cd).

O Cd de uma solução 10  $\mu\text{moles L}^{-1}$  aplicada à coluna de DEAE celulose eluiu apenas com o tampão, sem necessidade de adicionar KCl. Isso foi tomado como confirmação extra de que a maior parte do Cd presente nos extratos de raízes e de folhas estava presente na forma de complexo e não na sua forma de íon livre.

Nos extratos de folhas e raízes de salvinia expostas ao Cd, entretanto, embora a maior parte deste metal tenha sido eluída com a adição do tampão com KCl 0,4 mol  $\text{L}^{-1}$ , parte significativa do Cd foi eluída com a adição do tampão puro e com KCl 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ . Isso indica que parte do Cd absorvido não estava na forma de complexo Cd-peptídio, possivelmente por uma incapacidade da planta em sintetizar esses compostos na proporção requerida, o que pode ser resultante da ação tóxica do Cd sobre a síntese desses peptídios ou devido a uma saturação do sistema complexante de Cd.

Vários trabalhos têm relatado a participação da ligação do Cd a complexos ligantes como garantia de tolerância às células e plantas. Segundo RAUSER (1990), mais de 80% do Cd celular estava complexado com fitoquelatinas em células tolerantes, enquanto em células não-tolerantes ocorria pouca ligação do Cd, as quais cresciam pouco e morriam prematuramente. A formação desses complexos ligantes de Cd possibilitam a sobrevivência das células tolerantes, consistente com o papel das fitoquelatinas na desintoxicação do metal.

O incremento na razão de absorvância  $A_{265}/A_{280}$  foi observada apenas nos extratos das plantas que foram expostas ao Cd e coincidiu com o aparecimento dos mais elevados teores de Cd detectados. Isso indica fortemente que o Cd está presente na forma de complexo Cd-peptídio e que a síntese deste peptídio foi induzida pelo Cd, uma vez que ele foi detectado somente nas plantas expostas a esse elemento, uma situação também encontrada em várias outras espécies de plantas (DE KNECHT et al., 1994; MEUWLY e RAUSER, 1992).

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

A absorção e a distribuição de cádmio (Cd) em níveis tóxicos, assim como os seus efeitos sobre a absorção, a redução e a assimilação do enxofre e algumas variáveis de crescimento, foram estudadas em duas espécies aquáticas: *Eichhornia crassipes* (aguapé) e *Salvinia auriculata* (salvília). Na presença de níveis crescentes de Cd, a salvília sofreu maior redução na taxa de crescimento relativo do que o aguapé, estando essa redução correlacionada diretamente com as concentrações de Cd nos tecidos dessas plantas. A redução mais acentuada na taxa de crescimento relativo ocorreu no sistema radicular das duas espécies.

A adsorção e a absorção de Cd pelo aguapé, embora menor do que em salvília, aumentou proporcionalmente com a elevação da concentração de Cd na solução nutritiva, o que indica não ter ocorrido saturação dos sítios de adsorção e nem dano significativo no sistema de transporte de Cd nas membranas. A adsorção de Cd pela salvília também aumentou com o incremento da concentração de Cd na solução nutritiva, mas a absorção reduziu na maior concentração de Cd, refletindo os seus efeitos tóxicos sobre o sistema de transporte na membrana plasmática.

O contato das folhas de aguapé com a solução nutritiva contendo Cd não alterou os valores de  $K_m$  e de  $V_{max}$  de absorção de Cd, mas em salvília observaram-se redução significativa no valor de  $K_m$  e aumento no valor de  $V_{max}$ . Essa alteração observada em salvília se deveu, provavelmente, à efetiva participação de suas folhas no processo de absorção de Cd.

A absorção de Cd por salvinia e aguapé, elevada nas primeiras horas de exposição ao esse metal, principalmente em salvinia, decresceu rapidamente a seguir, permanecendo baixa e aproximadamente constante por até 10 dias. As concentrações de Cd nos tecidos de aguapé e de salvinia aumentaram com a elevação do tempo de exposição ao Cd, principalmente em salvinia. O percentual de Cd retido nas raízes de aguapé decresceu com o aumento do tempo de exposição, enquanto em salvinia a distribuição entre “raiz” e parte aérea permaneceu aproximadamente constante.

O contato das folhas com a solução nutritiva não alterou a concentração de Cd em aguapé, mas, em salvinia, este elemento foi encontrado mais na parte aérea. A distribuição percentual do Cd entre raiz e parte aérea não foi alterada pela forma de exposição das plantas de aguapé, mas o foi em salvinia, na qual se verificou expressiva participação das folhas no acúmulo de Cd.

Em presença de Cd no meio de cultivo, o Km para absorção do sulfato não sofreu alteração em aguapé, mas aumentou em salvinia. Quando o Cd estava presente apenas no meio de absorção ocorreu redução do valor de Km em aguapé, mas aumento em salvinia. Nessa condição, o valor de Vmax aumentou em aguapé, mas, em salvinia, não ocorreu alteração significativa. O aumento do valor de Vmax pode ser resultante de uma crescente demanda de enxofre para a síntese de compostos tiolados, determinada pelo mecanismo de tolerância ao Cd, que foi mais expressiva nas plantas de aguapé.

O aguapé apresentou maior atividade da sulfúrilase do ATP do que a salvinia, especialmente na parte aérea. Em presença de Cd ocorreram acréscimos significativos desta enzima nas raízes e na parte aérea de aguapé, mas em salvinia, apenas na parte aérea.

A presença de Cd na solução nutritiva não alterou significativamente as concentrações de tióis solúveis totais em raízes e parte aérea de aguapé e salvinia, embora houvesse tendência de aumento em aguapé e decréscimo em salvinia. As concentrações de cisteína aumentaram apenas na parte aérea de aguapé, enquanto as de  $\gamma$ -glutamilcisteína o fizeram nas raízes e na parte aérea de aguapé e de salvinia. Ao mesmo tempo, observaram-se redução nas concentrações de glutatona nas raízes e aumento nas de “outros tióis solúveis”, em aguapé e em raízes de salvinia, respectivamente.



Em presença de Cd, a maior razão de  $A_{265}/A_{280}$  foi de 1,64 e 1,74 para folhas e raízes de aguapé, respectivamente, e de 1,68 para folhas e “raízes” de salvinia, o que sempre coincidiu com os maiores teores de Cd. Em aguapé, o Cd presente nos extratos de folha e de raiz estava, quase que exclusivamente, nas frações em que foram obtidas as maiores razões de  $A_{265}/A_{280}$ . Em salvinia, entretanto, parcela significativa do Cd distribuiu-se em diversas outras frações, indicando que essa parte do Cd não estava na forma de complexo Cd-fitoquelatina.

Todos os resultados obtidos neste trabalho indicaram que as plantas de aguapé apresentam maior tolerância ao Cd do que a salvinia. Essa maior tolerância foi demonstrada pelo menor efeito do Cd sobre a taxa de crescimento relativo daquelas plantas. Associado a isso, o aguapé apresentou menores concentrações Cd nos tecidos e, dessa forma, reduziu os efeitos tóxicos desse metal. O aguapé apresentou, também, maior concentração de compostos tiolados, principalmente os complexantes de Cd, a expensas da maior absorção e da assimilação de sulfato.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.A., JOHNSON, R.E. ATP sulfurylase activity in the soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Plant Physiol.**, v. 43, p. 2041-2044, 1968.
- ALLAN, J.E. The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectrometry. **Varian Techtron**, bulletin 12/69, 1969, 15p.
- ALSCHER, R.G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. **Physiol. Plant.**, v. 77, p. 457-464, 1989.
- ALVES, V.M.C. **Efeito do alumínio sobre a cinética de absorção e translocação de fosfato e sobre o crescimento e composição mineral de dois cultivares de trigo.** Viçosa, MG: UFV, 1984. 45p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- BAKER, A.J.M., WALKER, P.L. Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. **Chem. Spec. Bioavail.**, v. 1, n. 1, p. 7-17, 1989.
- BARCELÓ, J., POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **J. Plant Nut.**, v. 13, n. 1, p. 1-37, 1990.
- BARTOLF, M., BRENNAN, E., PRICE, C. A. Partial characterization of a cadmium-binding protein from the roots of cadmium-treated tomato. **Plant Physiol.**, v. 66, p. 438-441, 1980.
- BASZYNSKI, T. Interference of Cd<sup>2+</sup> in functioning of the photosynthetic apparatus of higher plants. **Acta Soc. Bot. Pol.**, v. 55, n. 2, p. 291-304, 1986.

## APÊNDICE

## APÊNDICE

Quadro 1A - Análise de variância sumariada da alteração do pH no experimento de escolha da solução nutritiva (ensaio 1)

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Espécie	1	0,50 <sup>ns</sup>
Solução nutritiva	1	0,85*
Espécie × Solução nutritiva	1	0,09 <sup>ns</sup>
Erro A	8	0,14
Tempo	3	15,77**
Espécie × Tempo	3	0,45**
Solução nutritiva × Tempo	3	0,27**
Espécie × Solução nutritiva × Tempo	3	0,01 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,03
CV (%) Parcela		6,85
Subparcela		3,10

Quadro 2A - Análise de variância sumariada da alteração do pH no experimento de escolha da solução nutritiva modificada (ensaio 2)

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Espécie	1	2,56**
Solução nutritiva	1	4,25**
Espécie × solução nutritiva	1	0,01 <sup>ns</sup>
Erro A	8	0,21
Tempo	3	4,95**
Espécie × tempo	3	0,42**
Solução nutritiva × tempo	3	0,49**
Espécie × solução nutritiva × tempo	3	0,03 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,04
Parcela		7,65
CV (%)		
Subparcela		3,23

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 3A - Análise de variância sumariada das taxas de crescimento relativo do sistema radicular no experimento de concentrações crescentes de Cd

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Cd	5	5.595,13**
Espécie/Cd 0 µM	1	693,78*
Espécie/Cd 1 µM	1	107,53 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 2,5 µM	1	2.543,99**
Espécie/Cd 5 µM	1	2.680,58**
Espécie/Cd 10 µM	1	2.124,54**
Espécie/Cd 20 µM	1	1.924,79**
Bloco	3	390,25 <sup>ns</sup>
Resíduo	33	99,41
CV (%)		20,13

Quadro 4A - Análise de variância sumariada das taxas de crescimento relativo da parte aérea no experimento de concentrações crescentes de Cd

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Cd	5	5.501,90 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 0 µM	1	770,67 <sup>*</sup>
Espécie/Cd 1 µM	1	12,03 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 2,5 µM	1	477,41 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 5 µM	1	3.596,37 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 10 µM	1	5.326,67 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 20 µM	1	6.440,56 <sup>**</sup>
Bloco	3	562,77 <sup>ns</sup>
Resíduo	33	161,10
CV (%)		20,90

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 5A - Análise de variância sumariada das concentrações de Cd no sistema radicular no experimento de concentrações crescentes de Cd

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Cd	5	2.267.944,00 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 0 µM	1	2,78 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 1 µM	1	52.754,01 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 2,5 µM	1	31.255,01 <sup>*</sup>
Espécie/Cd 5 µM	1	56.032,13 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 10 µM	1	901.019,10 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 20 µM	1	4.705.391,00 <sup>**</sup>
Bloco	3	14.822,44 <sup>ns</sup>
Resíduo	33	4.312,84
CV (%)		11,357

Quadro 6A - Análise de variância sumariada das concentrações de Cd na parte aérea, no experimento de concentrações crescentes de Cd

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Cd	5	1.588.230,04**
Espécie/Cd 0 µM	1	0,95 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 1 µM	1	1.468,82 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 2,5 µM	1	10.173,08 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 5 µM	1	221.085,90**
Espécie/Cd 10 µM	1	1.464.787,02**
Espécie/Cd 20 µM	1	5.425.614,01**
Bloco	3	7.690,60 <sup>ns</sup>
Resíduo	33	2.521,29
CV (%)		13,60

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.  
<sup>ns</sup> Não-significativo.

Quadro 7A - Análise de correlação entre as concentrações de Cd nas raízes e na parte aérea, com as respectivas taxas de crescimento relativo, no experimento de concentrações crescentes de Cd

Variável 1 (Taxa de crescimento relativo)	Variável 2 (concentração de Cd)	
	Espécie	
	Aguapé	Salvília
Raiz	-0,9088**	-0,7211**
Parte Aérea	-0,8146**	-0,7794**

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 8A - Análise de variância sumariada da dessorção do Cd em função do tempo

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Espécie	1	14.606.950,01**
Cd	1	5.890.396,05**
Espécie × Cd	1	2.170.842,02**
Erro A	6	33.771,00
Tempo	6	1.115.944,03**
Tempo × Espécie	6	411.362,08**
Tempo × Cd	6	169.469,06**
Tempo × Espécie × Cd	6	61.111,00**
Bloco	2	73.874,80**
Resíduo	48	1.311,50
Parcela		27,07
CV (%)		5,34
Subparcela		

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.  
ns Não-significativo.

Quadro 9A - Análises de variâncias sumariada do Cd adsorvido e absorvido e da razão do Cd adsorvido e absorvido no experimento do efeito da concentração de Cd sobre as frações adsorvida e absorvida deste elemento

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Adsorvido	Absorvido	Adsorvido/Absorvido
Espécie	1	3.069.993,01**	62.497,80**	23,22**
Cd	1	1.269.132,05**	15,94 <sup>ns</sup>	23,77**
Espécie × Cd	1	456.3740,03**	28.650,50**	21,88**
Bloco	2	10.058,40 <sup>ns</sup>	1.152,88*	0,13 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	8.244,40	156,08	0,05
CV (%)		10,72	5,991	5,81

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.  
\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.  
ns Não-significativo.



Quadro 10A - Análise de variância sumariada dos parâmetros cinéticos Km e Vmax no experimento de absorção de Cd, em função da forma de exposição das plantas a este elemento

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Km	Vmax
Espécie	1	0,74 <sup>**</sup>	97,02 <sup>**</sup>
Forma de exposição/Aguapé	1	0,02 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
Forma de exposição/Salvília	1	0,42 <sup>*</sup>	12,01 <sup>**</sup>
Bloco	3	0,01 <sup>ns</sup>	0,37 <sup>ns</sup>
Resíduo	9	0,04	0,32
CV (%)		4,77	8,43

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 11A - Análise de variância sumariada da concentração de Cd nas raízes e na parte aérea no experimento de absorção de Cd, em função do tempo de exposição a este elemento

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de Cd	
		Raiz	Parte aérea
Espécie	1	111.546,30 <sup>**</sup>	41.570,80 <sup>**</sup>
Tempo	4	175.207,60 <sup>**</sup>	13.915,30 <sup>**</sup>
Tempo × Espécie	4	58.251,70 <sup>**</sup>	10.242,40 <sup>**</sup>
Resíduo	20	64,03	25,00
CV (%)		6,20	10,60

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 12A - Análise de variância sumariada da concentração e da distribuição porcentual do Cd nas raízes e na parte aérea no experimento de absorção de Cd, em função da forma de exposição das plantas a este elemento

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		Concentração de Cd		Quantidade de Cd (%)	
		Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Espécie	1	44.776,80**	22.057,20**	1069,87**	1.069,87**
Cd	1	288.552,70**	20.696,50**	83,78**	83,78**
Cd x espécie	1	69.523,60**	11.448,50**	17,89 <sup>ns</sup>	17,89 <sup>ns</sup>
Aguapé/Cd 1 µM	1	17,40 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	22,20 <sup>ns</sup>	22,20 <sup>ns</sup>
Aguapé/Cd 5 µM	1	114,70 <sup>ns</sup>	9,30 <sup>ns</sup>	17,50 <sup>ns</sup>	17,50 <sup>ns</sup>
Salvília/Cd 1 µM	1	86,20 <sup>ns</sup>	2142,10**	2017,00**	2.017,00**
Salvília/Cd 5 µM	1	10,00 <sup>ns</sup>	5124,50**	1576,30**	1.576,30**
Resíduo	16	36,2	7,53	9,40	9,40
CV (%)		3,34	5,80	3,90	14,23

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.  
<sup>ns</sup> Não-significativo.

Quadro 13A - Análise de variância sumariada dos parâmetros cinéticos Km e Vmax no experimento de cinética de absorção de sulfato

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Km	Vmax
Espécie	1	1,83**	0,20**
MC/Aguapé	1	0,03 <sup>ns</sup>	0,15**
MA/MC (0 Cd)/Aguapé	1	0,28**	0,60**
MA/MC (5 Cd)/Aguapé	1	0,69**	0,05*
MC/Salvília	1	3,50**	0,09**
MA/MC (0 Cd)/Salvília	1	0,44**	0,01 <sup>ns</sup>
MA/MC (5 Cd)/Salvília	1	0,54**	0,27**
Resíduo	16	0,03	0,01
CV (%)		4,96	9,90

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.  
 \* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.  
<sup>ns</sup> Não-significativo.  
 MC = Meio de cultivo; MA = Meio de absorção.

Quadro 14A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre a atividade da enzima sulfúrilase do ATP

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Raiz	Parte aérea
Espécie	1	17,98 <sup>**</sup>	364,54 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	33,42 <sup>**</sup>	143,67 <sup>*</sup>
Níveis de Cd/Salvínia	1	0,04 <sup>ns</sup>	149,80 <sup>**</sup>
Resíduo	8	0,64	5,65
CV (%)		15,43	16,19

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 15A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de tíois totais em plantas de aguapé e salvínia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de tíois totais	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	1.728,72 <sup>ns</sup>	26.068,03 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/ Aguapé	1	170,03 <sup>ns</sup>	3.262,00 <sup>ns</sup>
Níveis de Cd/ Salvínia	1	2,29 <sup>ns</sup>	761,63 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	479,08	789,98
CV (%)		15,19	14,98

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 16A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de cisteína em plantas de aguapé e salvinia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de cisteína	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	10,32 <sup>ns</sup>	116,44 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	5,41 <sup>ns</sup>	114,06 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Salvinia	1	2,50 <sup>ns</sup>	2,38 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	2,58	6,53
CV (%)		20,59	21,40

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 17A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ EC) em plantas de aguapé e salvinia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de $\gamma$ EC	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	57,12 <sup>**</sup>	191,44 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	210,51 <sup>**</sup>	603,00 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Salvinia	1	42,45 <sup>**</sup>	59,66 <sup>**</sup>
Resíduo	8	0,99	3,05
CV (%)		16,17	20,36

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 18A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de glutatona em plantas de aguapé e salvínia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de glutatona	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	311,10 <sup>ns</sup>	9.692,93 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	6.150,40 <sup>**</sup>	134,43 <sup>ns</sup>
Níveis de Cd/Salvília	1	430,11 <sup>ns</sup>	1.298,01 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	366,47	271,83
CV (%)		18,32	10,77

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 19A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de outros tióis solúveis (OTS) em plantas de aguapé e salvínia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de OTS	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	3.654,03 <sup>**</sup>	1.553,83 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	3.398,64 <sup>**</sup>	1.030,97 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Salvília	1	140,17 <sup>*</sup>	5,04 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	52,59	16,53
CV (%)		25,19	28,51

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

- BASZYNSKI, T., WAJDA, L., KROL, M., WOLINSKA, D., KRUPA, Z., TUKENDORF, A. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. **Physiol. Plant.**, v. 48, p. 365-370, 1980.
- BERGER, J.M., JACKSON, P.J., ROBINSON, N.J., LUJAN, L.D., DELHAIZE, E. Precursor-product relationships of poly( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)glycine biosynthesis in *Datura innoxia*. **Plant Cell Rep.**, v. 7, p. 632-635, 1989.
- BRASIL. Resolução nº 20, de 30 de julho de 1986. Classificação das águas doces, salobras e salgadas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 jul. 1986.
- BRECKLE, S.W. Growth under stress. Heavy metals. In: WAISEL, Y., ESHEL, A., KAFKAFI, U. (Eds.). **Plant roots: the hidden half**. New York: M. Dekker, 1991. p. 351-373.
- BRISKIN, D.P. Plasma membrane H<sup>+</sup> translocating ATPase: role in potassium ion transport. **Physiol. Plant.**, v. 68, p. 159-163, 1986.
- CACCO, G., SACCOMANI, M., FERRARI, G. Development of sulfate uptake capacity and ATP-sulfurylase activity during root elongation in maize. **Plant Physiol.**, v. 60, p. 582-584, 1977.
- CAMPBELL, P.G.C., STOKES, P.M. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, v. 42, p. 2034-2049, 1985.
- CATALDO, D.A., GARLAND, T.R., WILDUNG, R.E. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. **Plant Physiol.**, v. 73, p. 844-848, 1983.
- CLAASSEN, N., BARBER, S.A. A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. **Plant Physiol.**, v. 54, p. 564-568, 1974.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric. Food Chem.**, v. 23, p. 458-460, 1975.
- CLIJSTERS, H., VAN ASSCHE, F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. **Photos. Res.**, v. 7, p. 31-40, 1985.
- COELHO, T. Aguapé: bom, bonito e barato. **Ecologia e Desenvolvimento**, v. 38, p. 2-4, 1994.
- COOLEY, T.N., MARTIN, D.F. Cadmium in naturally occurring water hyacinth. **Chemosphere**, v. 8, p. 75-99, 1979.

- COSTA, G., MOREL, J.L. Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L.): cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. **J. Plant Nut.**, v. 16, n. 10, p. 1921-1929, 1993.
- CRAM, W.J. Regulatory aspects of uptake and reduction of sulfate and incorporation into amino acids. In: RENNENBERG, H., BRUNOLD, C., DE KOK, L.J., STULEN, I. (Eds.). **Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants**. The Hague: Academic, 1990. p. 3-11.
- CUTLER, J.M., RAINS, D.W. Characterization of cadmium uptake by plant tissue. **Plant Physiol.**, v. 54, p. 67-71, 1974.
- DATKO, A.H., MUDD, S.H. Sulfate uptake and its regulation in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6746. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 466-473, 1984.
- DE FILIPPIS, L.F., HAMPP, R., ZIEGLER, H. The effects of sublethal concentration of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*: respiration, photosynthesis and photochemical activities. **Arch. Microbiol.**, v. 128, p. 407-411, 1981.
- DE KNECHT, J.A., BAREN, V., BOOKUM, W.M.T. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. **Plant Sci.**, v. 106, p. 8-18, 1995.
- DE KNECHT, J.A., KOEVOETS, P.L.M., VERKLEIJ, J.A.C., ERNST, W.H.O. Evidence against a role for phytochelatins in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. **New Phytol.**, v. 122, p. 681-688, 1992.
- DE KNECHT, J.A., VAN DILLEN, M., KOEVOETS, P.L.M., SCHAT, H., VERKLEIJ, J.A.C., ERNST, W.H.O. Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. **Plant Physiol.**, v. 104, p. 255-261, 1994.
- DE KOK, L.J., STULEN, I. Role of glutathione in plants under oxidative stress. In: DE KOK, J.J., STULEN, I., RENNENBERG, H., BRUNOLD, C. RAUSER, W.E. (Eds.). **Sulfur nutrition and assimilation in higher plants: regulatory agricultural and environmental aspects**. The Hague, The Netherlands: SBP Academic, 1993. p. 125-138.
- DELGADO, M., BIGERIEGO, M., GUARDIOLA, E. Uptake of Zn, Cr and Cd by water hyacinths. **Water Res.**, v. 27, p. 269-272, 1973.
- DELHAIZE, E., JACKSON, P.J., LUJAN, L.D., ROBINSON, N.J. Poly ( $\gamma$ -glutamylcysteinyl) glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium. **Plant Physiol.**, v. 89, p. 700-706, 1989.

- DE VOS, C.H.R., VONK, M.J., VOOIJS, R., SCHAT, H. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 853-858, 1992.
- DING, X., JIANG, J., WANG, Y., WANG, W., RU, B. Bioconcentration of cadmium in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in relation to thiol group content. **Environ. Pollut.**, v. 84, p. 93-96, 1994.
- DUSHENKOV, V., KUMAR, P.B.A.N., MOTTO, H., RASKIN, I. Rhizofiltration, the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. **Environ. Sci. Tech.**, v. 29, p. 1239-1245, 1995.
- ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, p. 70-77, 1959.
- ENVIRONMENTAL HEALTH PROTECTION AGENCY - EPA. Federal Register Part V. **Water Qual. Crit. Doc.**, v. 45, p. 79318-79380, 1980.
- ERNEST, W.H.O., VERKLEIJ, J.A.C., SCHAT, H. Metal tolerance in plants. **Acta Bot. Neerl.**, v. 41, p. 229-248, 1992.
- FAO/WHO, Sixteenth Report of the joint FAO/WHO. **Expert Committee on Food Additives**. WHO: Geneva, 1972, WHO Tech. Rep. Ser., 505.
- FETT, J.P., CAMBRAIA, J., OLIVA, M.A., JORDÃO, C.P. Absorption and distribution of cadmium in water hyacinth plants. **J. Plant Nutr.**, v. 17, n. 7, p.1219-1230, 1994.
- FLORIJN, P.J., DE KNECHT, J.A., VAN BEUSICHEM, M.L. Phytochelatin concentrations and binding state of Cd in roots of maize genotypes differing in shoot/root Cd partitioning. **J. Plant Physiol.**, v. 142, p. 537-542, 1993.
- FOSTER, P.L. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in green alga. **Nature**, v. 269, p. 322-323, 1977.
- FOX, M.R.S. Nutritional factors that may influence bioavailability of cadmium. **J. Environ. Qual.**, v. 17, p. 175-180, 1988.
- FRIBERG, L., PISCATOR, M., NORDBERG, G.F., KJELLSTROM, T. **Cadmium in the Environment**. Cleveland: CRC Press, 1974. p. 101-203.
- FUJITA, M. The presence of two Cd-binding components in the roots of water hyacinth cultivated in a Cd<sup>2+</sup>-containing medium. **Plant Cell Physiol.**, v. 26, n. 2, p. 295-300, 1985.



- FUJITA, M., KAWANISHI, T. Purification and characterization of a Cd-binding complex from the root tissue of water hyacinth cultivated in a Cd<sup>2+</sup>-containing medium. **Plant Cell Physiol.**, v. 27, n. 7, p. 1317-1325, 1986.
- GALLI, U., SCHUEPP, H., BRUNOLD, C. Thiols in cadmium- and copper-treated maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v. 198, p. 139-143, 1996.
- GEKELER, W., GRILL, E., WINNACKER, E.L., ZENK, M.H. Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. **Z. Naturforsch.**, v. 44, p. 361-369, 1989.
- GRILL, E., LÖFFLER, S., WINNACKER, E.L., ZENK, M.H. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). **Biochem.**, v. 86, p. 6838-6842, 1989.
- GRILL, E., THUMANN, J., WINNACKER, E.L., ZENK, M.H. Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. **Plant Cell Rep.**, v. 7, p. 375-378, 1988.
- GRILL, E., WINNACKER, E.L., ZENK, M.H. Phytochelatins, a class heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 84, p. 439-443, 1987.
- GRILL, E., WINNACKER, E.L., ZENK, M.H. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. **Science**, v. 230, p. 674-676, 1985.
- GUILIZZONI, P. The role of heavy metals and toxic materials in physiological ecology of submersed macrophytes. **Aquatic Bot.**, v. 41, p. 109-119, 1991.
- GUPTA, M., DEVI, S. Cadmium sensitivity inducing structural responses in *Salvinia molesta* Mitchell. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 49, p. 436-443, 1992.
- GUPTA, S.C., GOLDSBROUGH, P.B. Phytochelatin accumulation and cadmium tolerance in selected tomato cell lines. **Plant Physiol.**, v. 97, p. 306-312, 1991.
- HAMPP, R., ZIEGLER, H., ZIEGLER, I. Der einfluss von bleiionen auf enzyme des reduktiven pentosephosphatcyclus. **Bioch. Physiol. Pflanzen**, v. 164, p. 588-595, 1973.
- HATCH, D.J., JONES, L.H.P., BURAU, R.G. The effect of pH on the uptake of cadmium by four plant species grown in flowing solution culture. **Plant Soil**, v. 105, p. 121-126, 1988.

- HAYASHI, Y., NAKAGAWA, The change of cadystin components in Cd-binding peptides from the fission yeast during their induction by cadmium. **Biochem. Cell Biol.**, v. 66, p. 288-295, 1988.
- HERSCHBACH, C., RENNENBERG, H. Influence of glutathione (GSH) on sulfate influx, xylem loading and exudation in excised tobacco roots. **J. Exp. Bot.**, v. 42, p. 1021-1029, 1991.
- HERSCHBACH, C., RENNENBERG, H. Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulfate and sulfate transport tobacco plants. **J. Exp. Bot.**, v. 45, p. 1069-1076, 1994
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Exp. Stn. Cir.**, n. 347, p. 1-39, 1950.
- HUANG, B., HATCH, E., GOLDSBROUGH, P.B. Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato. **Plant Science**, v. 52, p. 211-221, 1987.
- HUNT, R. **Plant growth analysis**. London: Edward Arnold Limited, 1978. 67 p.
- JACKSON, P.J., UNKEFER, C.J., DOOLEN, J.A., WATT, K., ROBINSON, N.J. Poly ( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)glycine: its role in cadmium resistance in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 6619-6623, 1987.
- JACKSON, P.J., ROBINSON, N.J., DELHAIZE, E. Cd tolerance in plant cells: a comparison of biochemical and molecular properties of tolerant and sensitive cells. In: HAMER, D.H., WINGE, D.R. (Eds.). **Metal ion homeostasis: molecular biology and chemistry**. New York: Alan R. Liss, 1989. p. 337-346.
- JENSEN, P., KONIG, T. Development of regulation mechanisms of  $SO_4^{2-}$  influx in spring wheat roots. **Plant Physiol.**, v. 55, p. 459-464, 1982.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1976. 777 p.
- JORDÃO, C.P., PEREIRA, J.L., GOUVEA, L.C., PEREIRA, J.C., BRUNE, W. Contaminação de sedimentos fluviais por metais pesados nas proximidades de uma indústria metalúrgica em Minas Gerais. **Geochim. Brasil.**, v. 4, n. 1, p. 9-15, 1990.
- KANYO, Z.F., CHRISTIANSON, D.W. Biological recognition of phosphate and sulfate. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 4264-4268, 1991.

- KAWASAKI, T., MORITSUGU, M. Effect of calcium on the absorption and translocation of heavy metals in excised barley roots: multi-compartment transport box experiment. **Plant Soil**, v. 100, p. 21-34, 1987.
- KNEER, R., ZENK, M.H. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. **Phytochem.**, v. 31, n. 8, p. 2663-2667, 1992.
- KOBAYASHI, J. Relations between the "itai itai disease" and the pollution of river water by Cd from a mine. **Proc. Inter. Water Poll. Res. Conf.**, p. 1-25, 1970.
- KOVACS, M., PODANI, J. Bioindication: a short review on the use of plants as indicators of heavy metals. **Acta Biol. Hungarica**, v. 37, n. 1, p. 19-29, 1986.
- KREMER, B., MARKHAM, J.W. Primary metabolic effects of cadmium in the brown alga, *Laminaria saccharina*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 108, p. 125-130, 1982.
- KROTZ, R.M., EVANGELOU, B. P., WAGNER, G. J. Relationships between cadmium, zinc, Cd-peptide, and organic acid in tobacco suspension cells. **Plant Physiol.**, v. 91, p. 780-787, 1989.
- LAPPARTIENT, A.G., TOURAINÉ, B. Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and  $SO_4^{2-}$  uptake in intact canola: the role of phloem-translocated glutathione. **Plant Physiol.**, v. 111, p. 147-157, 1996.
- LAUDENBACH, D.E., GROSSMAN, A.R. Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a cyanobacterium: evidence for function in sulfate transport. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 2739-2750, 1991.
- LEE, K.G., CUNNINGHAM, B.A., PAULSEN, G.N.M., LIANG, G.H., MOORE, R.B. Effect of cadmium on respiration rate and activity of several enzymes in soybean seedlings. **Physiol. Plant.**, v. 36, p. 4-6, 1976.
- LEPP, N.W. **Effects of heavy metal pollution on plants**. London: Applied Science, 1981. v. 1. 352 p.
- MACFIE, S.M., TARMOHAMED, Y., WELBOURN, P.M. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 27, p. 454-458, 1994.
- MACNAIR, M.R. Tolerance of higher plants to toxic materials. In: BISHOP, J.A., COOKE, L.M. (Eds.). **Genetic consequences on man made changes**. London: Academic Press, 1981. p. 177-207.
- MAJIDI, V., LAUBE, D.A., HOCOMBE, J.A. Investigation of metal-algae binding site with  $^{113}\text{Cd}$  nuclear magnetic resonance. **Environ. Sci. Technol.**, v.24, p. 1309-1312, 1990.

- MALM, O., PFEIFFER, W.C., FISZMAN, M., AZCUE, J.M. Transport and availability by heavy-metal in the Paraíba do Sul - Guandu River System, Rio de Janeiro State, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 75, p. 201-209, 1988.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 674p.
- MARSCHNER, H., HAUSSLING, M., GEORGE, E. Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere-pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). **Trees**, v. 5, p. 14-21, 1991.
- MENDUM, M. L. , GUPTA, S. C. , GOLDSBROUGH, P.B. Effect of glutathione on phytochelatin synthesis in tomato cells. **Plant Physiol.**, v. 93, p. 484-488, 1990.
- MEUWLY, P., RAUSER, W.E. Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium. **Plant Physiol.**, v. 99, p. 8-15, 1992.
- MURAMOTO, S., OKI, Y. Removal of some heavy metals from polluted water by water hyacinth. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 30, p. 170-177, 1983.
- MUTOH, N., HAYASHI, Y. Isolation of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small cadmium-binding peptides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 151, p. 32-39, 1988.
- NEWMAN, S., HALLER, W.T. Mineral deficiency symptoms of water hyacinths. **J. Aquat. Plant Manage.**, v. 26, p. 55-58, 1988.
- NUSSBAUM, S., SCHMUTZ, D., BRUNOLD, C. Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium in *Zea mays* L. **Plant Physiol.**, v. 88, p. 1407-1410, 1988.
- OBATA, H., UMEBAYASHI, M. Characterization of cadmium-binding complexes from the roots of cadmium-treated rice plant. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v. 32, n. 3, p. 461-467, 1986.
- O'KEEFFE, D.H., HARDY, J.K., RAO, R.A. Cadmium uptake by the water hyacinth: effects of solution factors. **Environ. Pollut. Ser. A**, v. 34, p. 133-147, 1984.
- OLIVEIRA, J.A., OLIVA, M.A., CAMBRAIA, J. Effects of cadmium on chlorophyll contents and on peroxidase activity in soybean. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 6, n. 2, p. 97-101, 1994.

- ONAJOBI, F.D., COLE, C.V., ROSS, C. Adenosine 5'-triphosphate-sulfurylase in corn roots and its partial purification. **Plant Physiol.**, v. 52, p. 580-584, 1973.
- OSSLUND, T., CHANDLER, C., SEGEL, I.H. ATP sulfurylase from higher plants: purification and preliminary kinetics studies on the cabbage leaf enzyme. **Plant Physiol.**, v. 70, p. 39-45, 1982.
- OUTRIDGE, P.M., HUTCHINSON, T.C. Effects of cadmium on integration and resource allocation in the clonal fern *Salvinia molesta*. **Oecologia**, v. 84, p. 215-223, 1990.
- OUTRIDGE, P. M. , RAUSER, W. E., HUTCHINSON, T. C. Changes in metal-binding peptides due to acclimation to cadmium transferred between ramets of *Salvinia minima*. **Oecologia**, v. 88, p. 109-115, 1991.
- PAGE, A.L., BINGHAM, F. Cadmium residue in the environment. **Residue Rev.**, v. 48, p. 1-94, 1973.
- PATE, J.S. Roots as organs of assimilation of sulfate. **Science**, v. 149, p. 547-548, 1965.
- PEYTON, T., MACINTOSH, A., ANDERSON, V., YOST, K. Aerial input of heavy metals into aquatic ecosystem. **Water, Air and Soil Pollut.**, v. 5, p. 443-451, 1976.
- PULIDO, P., FUWA, K., VALLEE, B. Determination of cadmium in biological materials by atomic absorption spectrometry. **Anal. Biochem.**, v. 14, p. 303-304, 1966.
- RAUSER, W.E. Changes in glutathione content of maize seedlings exposed to cadmium. **Plant Sci.**, v. 51, p. 171-175, 1987.
- RAUSER, W.E. Early effects of phytotoxic burdens of cadmium, cobalt, nickel, and zinc in white beans. **Can. J. Bot.**, v. 56, p. 1744-1749, 1978.
- RAUSER, W.E. Phytochelatins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 59, p. 61-86, 1990.
- RAUSER, W.E. The amount of cadmium associated with Cd-binding protein in roots of *Agrotis gigantea*, maize and tomato. **Plant Science**, v.43, p.85-91, 1986.
- RAUSER, W.E., ACKERLEY, C.A. Localization of cadmium in granules within differentiating and mature root cells. **Can. J. Bot.**, v. 65, p. 643-646, 1987.

- RAVEN, J.A. Biochemical disposal of excess H<sup>+</sup> in growing plants? **New Phytol.**, v. 104, p. 175-206, 1986.
- REDDY, G.N., PRASAD, M.N.V. Heavy metal-binding proteins peptides: occurrence, structure, synthesis and functions. A review. **Environ. Exp. Bot.**, v. 30, n. 3, p. 251-264, 1990.
- REESE, R.N., WINGE, D.R. Sulfate stabilization of the cadmium-glutamyl peptide complex of *Schizasaccharomyces pombe*. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 12832-12835, 1988.
- RENNENBERG, H. The fate of excess sulfur in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 35, p. 121-153, 1984.
- RENNENBERG, H. Aspects of glutathione function and metabolism in plants. In: VON WETTSTEIN, D., CHUA, N.H. (Eds.). **Plant molecular biology**. New York: Plenum, 1987. p. 279-292.
- REUVENY, Z., FILNER, P. Regulation of adenosine triphosphate sulfurylase in cultured tobacco cells. Effects of sulfur and nitrogen sources on the formation and decay of the enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 1858-1864, 1977.
- RÜEGSEGGER, A., BRUNOLD, C. Effect of cadmium on  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. **Plant Physiol.**, v. 99, p. 428-433, 1992.
- RÜEGSEGGER, A., SCHMUTZ, D., BRUNOLD, C. Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. **Plant Physiol.**, v. 93, p. 1579-1584, 1990.
- RUIZ, H.A. Estimativa dos parâmetros cinéticos Km e Vmax por uma aproximação gráfico-matemática. **Revista Ceres**, v. 32, n. 179, p. 79-84, 1985.
- SALIM, R., HAGEMEYER, J., AL-SUBU, M.M., ATALLAH, A., CHENAVIER, L. Effects on growth, uptake and distribution of root and foliar treatments of marrow plants with cadmium and lead solutions. **J. Environ. Sci. Health**, v. A27, n. 8, p. 2173-2190, 1992.
- SALISBURY, F.B., ROSS, C.W. **Plant physiology**. Wadsworth, Belmont, CA: Wadsworth, 1992. 682 p.
- SALOMONS, W., FÖRSTNER, U. Trace metal analysis on polluted sediments. Part II: Evaluation of environmental impact. **Environ. Technol. Lett.**, v. 10, p. 506-517, 1980.

- SCHELLER, H.V., HUANG, B., HATCH, E., GOLDSBROUGH, P.B. Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. **Plant Physiol.**, v. 85, p. 1031-1035, 1987.
- SCHMIDT, A., JAGER, K. Open questions about sulfur metabolism in plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol.**, v. 43, p. 325-349, 1992.
- SCHMUTZ, D., BRUNOLD, C. Rapid and simple measurement of ATP-sulfurylase activity in crude plant extracts using an ATP meter for bioluminescence determination. **Anal. Biochem.**, v. 121, p. 151-155, 1982.
- SCHROEDER, H.A. Cadmium as a factor in hypertension. **J. Chronic. Dis.**, v. 18, p. 647-656, 1965.
- SELA, M., FRITZ, E., HUTTERMANN, A., TEL-OR, E. Studies on cadmium localization in the water fern *Azolla*. **Physiol. Plant.**, v. 79, p. 547-553, 1990.
- SMITH, I.K., POLLE, A., RENNENBERG, H. Glutathione. In: ALSCHER, R.G., CUMMING, J.R. (Eds.). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 201-215.
- STEFFENS, J.C. The heavy metal-binding peptides of plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 41, p. 553-575, 1990.
- STEFFENS, J.C., HUNT, D.F., WILLIAMS, B.G. Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides ( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)<sub>n</sub>-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 13879-13882, 1986.
- STIBOROVÁ, M. Cd<sup>2+</sup> ions affect the quaternary structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from barley leaves. **Physiol. Pflanzen.**, v. 183, p. 371-378, 1988.
- STROHM, M., JOUANIN, L., KUNERT, K.J., PRUVOST, C., POLLE, A., FOYER, C.H., RENNENBERG, H. Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. **Plant J.**, v. 7, n. 1, p. 141-145, 1995.
- TOMSETT, A.B., THURMAN, D.A. Molecular biology of metal tolerances of plants. **Plant, Cell Environ.**, v. 11, p. 383-394, 1988.
- TUKENDORF, A. The response of spinach plants to excess of copper and cadmium. **Photosynthetica**, v. 28, n. 4, p. 573-575, 1993.

- TUKENDORF, A. The role of glutathione in detoxification of cadmium and excess copper in spinach plants. **Acta Physiol. Plant.**, v. 15, n. 3, p. 175-183, 1993.
- TUKENDORF, A., RAUSER, W.E. Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. **Plant Sci.**, v. 70, p. 155-166, 1990.
- TURNQUIST, T.D., MILLING, D., HARDY, J.K. Nickel uptake by water hyacinth. **J. Environ. Sci. Health**, v. A25, n. 8, p.897-912, 1990.
- VALLEE, B.L., ULMER, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Annu. Rev. Biochem.**, v.41, p.91-128, 1972.
- VAN ASSCHE, F., CARDINALES, C., CLIJSTERS, H. Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L. treated with zinc and cadmium. **Environ. Pollut.**, v. 52, p.103-115, 1988.
- VAN ASSCHE, F., CLIJSTERS, H. Effect of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell Environ.**, v. 13, p. 195-206, 1990.
- VAN BEUSICHEM, M.L., KIRKBY, E.A., BAAS, R. Influence of nitrate and ammonium nutrition and the uptake, assimilation, and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. **Plant Physiol.**, v. 86, p. 914-921, 1988.
- VAN STEVENINCK, R.F.M., VAN STEVENINCK, M.E., FERNANDO, D.R. Heavy-metal (Zn, Cd) tolerance in selected clones of duck weed (*Lemna minor*). **Plant Soil**, v. 146, p. 271-280, 1992.
- VERKLEIJ, J.A.C., KOEVOETS, P., VAN'T REIT, J., BANK, R., NIJDAM, Y., ERNST, W.H.O. Poly-gamma-glutamylcysteinylglycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*. **Plant Cell Environ.**, v. 13, p. 913-922, 1990.
- VÖGELI-LANGE, R., WAGNER, G.J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. **Plant Physiol.**, v. 92, p. 1086-1093, 1990.
- WAGNER, G.J. Characterization of a cadmium - binding complex of cabbage leaves. **Plant Physiol.**, v.76, p.797-805, 1984.
- WAGNER, C.J., YEARGAN, R.Y. Variation in Cd accumulation potential and tissue distribution of Cd in tobacco. **Plant Physiol.**, v. 82, p. 274-279, 1986.
- WALDBOTT, G.L. **Health effects of environmental pollutants**. Saint Louis: C. V. Mosby, 1973. 258 p.



WANG, J., EVANGELOU, B.P., NIELSEN, M.T., WAGNER, G.J. Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for quenching heavy metal ion activity in plant vacuoles. **Plant Physiol.**, v. 97, p. 1154-1160, 1991.

WOLVERTON, B.C. Water hyacinths for removal of cadmium and nickel from polluted waters. [S. l.]: NASA, 1975. NASA Technical Memorandum TM - x - 2721.

WOLVERTON, B. C., McDONALD, R. C. Bioaccumulation and detection of trace levels of cadmium in aquatic systems by *Eichhornia crassipes*. **Environ. Health Perspect.**, v. 27, p. 161-164, 1978.

WOLVERTON, B.C., McDONALD, R.C. Water hyacinths and alligator weeds for removal of lead and mercury from polluted waters. [S. l.]: NASA, 1975. NASA Technical Memorandum TM - x - 2723.

WOLVERTON, B. C., McDONALD, R. C., REBECA, C. Wastewater treatment utilizing water hyacinths. In: Proceedings Natn. Conf. On Treatment and Disposal of Industrial Wastewaters and Residue, 1977. p. 205-208.

ZINK, M.W. Regulation of ATP sulfurylase by various nitrogen and sulfur in cultured *Ipomea* sp. **Can. J. Bot.**, v. 62, p. 2107-2013, 1984.

## APÊNDICE

## APÊNDICE

Quadro 1A - Análise de variância sumariada da alteração do pH no experimento de escolha da solução nutritiva (ensaio 1)

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Espécie	1	0,50 <sup>ns</sup>
Solução nutritiva	1	0,85*
Espécie × Solução nutritiva	1	0,09 <sup>ns</sup>
Erro A	8	0,14
Tempo	3	15,77**
Espécie × Tempo	3	0,45**
Solução nutritiva × Tempo	3	0,27**
Espécie × Solução nutritiva × Tempo	3	0,01 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,03
Parcela		6,85
CV (%)		
Subparcela		3,10

Quadro 2A - Análise de variância sumariada da alteração do pH no experimento de escolha da solução nutritiva modificada (ensaio 2)

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Espécie	1	2,56**
Solução nutritiva	1	4,25**
Espécie × solução nutritiva	1	0,01 <sup>ns</sup>
Erro A	8	0,21
Tempo	3	4,95**
Espécie × tempo	3	0,42**
Solução nutritiva × tempo	3	0,49**
Espécie × solução nutritiva × tempo	3	0,03 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,04
Parcela		7,65
CV (%)		
Subparcela		3,23

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não-significativo.

Quadro 3A - Análise de variância sumariada das taxas de crescimento relativo do sistema radicular no experimento de concentrações crescentes de Cd

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Cd	5	5.595,13**
Espécie/Cd 0 µM	1	693,78*
Espécie/Cd 1 µM	1	107,53 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 2,5 µM	1	2.543,99**
Espécie/Cd 5 µM	1	2.680,58**
Espécie/Cd 10 µM	1	2.124,54**
Espécie/Cd 20 µM	1	1.924,79**
Bloco	3	390,25 <sup>ns</sup>
Resíduo	33	99,41
CV (%)		20,13

Quadro 4A - Análise de variância sumariada das taxas de crescimento relativo da parte aérea no experimento de concentrações crescentes de Cd

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Cd	5	5.501,90 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 0 µM	1	770,67 <sup>*</sup>
Espécie/Cd 1 µM	1	12,03 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 2,5 µM	1	477,41 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 5 µM	1	3.596,37 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 10 µM	1	5.326,67 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 20 µM	1	6.440,56 <sup>**</sup>
Bloco	3	562,77 <sup>ns</sup>
Resíduo	33	161,10
CV (%)		20,90

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 5A - Análise de variância sumariada das concentrações de Cd no sistema radicular no experimento de concentrações crescentes de Cd

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Cd	5	2.267.944,00 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 0 µM	1	2,78 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 1 µM	1	52.754,01 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 2,5 µM	1	31.255,01 <sup>*</sup>
Espécie/Cd 5 µM	1	56.032,13 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 10 µM	1	901.019,10 <sup>**</sup>
Espécie/Cd 20 µM	1	4.705.391,00 <sup>**</sup>
Bloco	3	14.822,44 <sup>ns</sup>
Resíduo	33	4.312,84
CV (%)		11,357

Quadro 6A - Análise de variância sumariada das concentrações de Cd na parte aérea, no experimento de concentrações crescentes de Cd

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Cd	5	1.588.230,04**
Espécie/Cd 0 µM	1	0,95 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 1 µM	1	1.468,82 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 2,5 µM	1	10.173,08 <sup>ns</sup>
Espécie/Cd 5 µM	1	221.085,90**
Espécie/Cd 10 µM	1	1.464.787,02**
Espécie/Cd 20 µM	1	5.425.614,01**
Bloco	3	7.690,60 <sup>ns</sup>
Resíduo	33	2.521,29
CV (%)		13,60

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 7A - Análise de correlação entre as concentrações de Cd nas raízes e na parte aérea, com as respectivas taxas de crescimento relativo, no experimento de concentrações crescentes de Cd

Variável 1 (Taxa de crescimento relativo)	Variável 2 (concentração de Cd)	
	Espécie	
	Aguapé	Salvília
Raiz	-0,9088**	-0,7211**
Parte Aérea	-0,8146**	-0,7794**

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 8A - Análise de variância sumariada da dessorção do Cd em função do tempo

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Espécie	1	14.606.950,01**
Cd	1	5.890.396,05**
Espécie × Cd	1	2.170.842,02**
Erro A	6	33.771,00
Tempo	6	1.115.944,03**
Tempo × Espécie	6	411.362,08**
Tempo × Cd	6	169.469,06**
Tempo × Espécie × Cd	6	61.111,00**
Bloco	2	73.874,80**
Resíduo	48	1.311,50
Parcela		27,07
CV (%)		
Subparcela		5,34

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.  
ns Não-significativo.

Quadro 9A - Análises de variâncias sumariada do Cd adsorvido e absorvido e da razão do Cd adsorvido e absorvido no experimento do efeito da concentração de Cd sobre as frações adsorvida e absorvida deste elemento

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Adsorvido	Absorvido	Adsorvido/Absorvido
Espécie	1	3.069.993,01**	62.497,80**	23,22**
Cd	1	1.269.132,05**	15,94 <sup>ns</sup>	23,77**
Espécie × Cd	1	456.3740,03**	28.650,50**	21,88**
Bloco	2	10.058,40 <sup>ns</sup>	1.152,88*	0,13 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	8.244,40	156,08	0,05
CV (%)		10,72	5,991	5,81

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.  
\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.  
ns Não-significativo.

Quadro 10A - Análise de variância sumariada dos parâmetros cinéticos Km e Vmax no experimento de absorção de Cd, em função da forma de exposição das plantas a este elemento

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Km	Vmax
Espécie	1	0,74 <sup>**</sup>	97,02 <sup>**</sup>
Forma de exposição/Aguapé	1	0,02 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
Forma de exposição/Salvínia	1	0,42 <sup>*</sup>	12,01 <sup>**</sup>
Bloco	3	0,01 <sup>ns</sup>	0,37 <sup>ns</sup>
Resíduo	9	0,04	0,32
CV (%)		4,77	8,43

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 11A - Análise de variância sumariada da concentração de Cd nas raízes e na parte aérea no experimento de absorção de Cd, em função do tempo de exposição a este elemento

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de Cd	
		Raiz	Parte aérea
Espécie	1	111.546,30 <sup>**</sup>	41.570,80 <sup>**</sup>
Tempo	4	175.207,60 <sup>**</sup>	13.915,30 <sup>**</sup>
Tempo × Espécie	4	58.251,70 <sup>**</sup>	10.242,40 <sup>**</sup>
Resíduo	20	64,03	25,00
CV (%)		6,20	10,60

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.



Quadro 12A - Análise de variância sumariada da concentração e da distribuição porcentual do Cd nas raízes e na parte aérea no experimento de absorção de Cd, em função da forma de exposição das plantas a este elemento

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		Concentração de Cd		Quantidade de Cd (%)	
		Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Espécie	1	44.776,80**	22.057,20**	1069,87**	1.069,87**
Cd	1	288.552,70**	20.696,50**	83,78**	83,78**
Cd x espécie	1	69.523,60**	11.448,50**	17,89 <sup>ns</sup>	17,89 <sup>ns</sup>
Aguapé/Cd 1 µM	1	17,40 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	22,20 <sup>ns</sup>	22,20 <sup>ns</sup>
Aguapé/Cd 5 µM	1	114,70 <sup>ns</sup>	9,30 <sup>ns</sup>	17,50 <sup>ns</sup>	17,50 <sup>ns</sup>
Salvinia/Cd 1 µM	1	86,20 <sup>ns</sup>	2142,10**	2017,00**	2.017,00**
Salvinia/Cd 5 µM	1	10,00 <sup>ns</sup>	5124,50**	1576,30**	1.576,30**
Resíduo	16	36,2	7,53	9,40	9,40
CV (%)		3,34	5,80	3,90	14,23

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.  
<sup>ns</sup> Não-significativo.

Quadro 13A - Análise de variância sumariada dos parâmetros cinéticos Km e Vmax no experimento de cinética de absorção de sulfato

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Km	Vmax
Espécie	1	1,83**	0,20**
MC/Aguapé	1	0,03 <sup>ns</sup>	0,15**
MA/MC (0 Cd)/Aguapé	1	0,28**	0,60**
MA/MC (5 Cd)/Aguapé	1	0,69**	0,05*
MC/Salvinia	1	3,50**	0,09**
MA/MC (0 Cd)/Salvinia	1	0,44**	0,01 <sup>ns</sup>
MA/MC (5 Cd)/Salvinia	1	0,54**	0,27**
Resíduo	16	0,03	0,01
CV (%)		4,96	9,90

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.  
 \* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.  
<sup>ns</sup> Não-significativo.  
 MC = Meio de cultivo; MA = Meio de absorção.

Quadro 14A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre a atividade da enzima sulfúrilase do ATP

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Raiz	Parte aérea
Espécie	1	17,98 <sup>**</sup>	364,54 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	33,42 <sup>**</sup>	143,67 <sup>*</sup>
Níveis de Cd/Salvínia	1	0,04 <sup>ns</sup>	149,80 <sup>**</sup>
Resíduo	8	0,64	5,65
CV (%)		15,43	16,19

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 15A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de tióis totais em plantas de aguapé e salvínia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de tióis totais	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	1.728,72 <sup>ns</sup>	26.068,03 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/ Aguapé	1	170,03 <sup>ns</sup>	3.262,00 <sup>ns</sup>
Níveis de Cd/ Salvínia	1	2,29 <sup>ns</sup>	761,63 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	479,08	789,98
CV (%)		15,19	14,98

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 16A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de cisteína em plantas de aguapé e salvínia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de cisteína	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	10,32 <sup>ns</sup>	116,44 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	5,41 <sup>ns</sup>	114,06 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Salvília	1	2,50 <sup>ns</sup>	2,38 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	2,58	6,53
CV (%)		20,59	21,40

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 17A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ EC) em plantas de aguapé e salvínia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de $\gamma$ EC	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	57,12 <sup>**</sup>	191,44 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	210,51 <sup>**</sup>	603,00 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Salvília	1	42,45 <sup>**</sup>	59,66 <sup>**</sup>
Resíduo	8	0,99	3,05
CV (%)		16,17	20,36

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 18A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de glutatona em plantas de aguapé e salvinia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de glutatona	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	311,10 <sup>ns</sup>	9.692,93 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	6.150,40 <sup>**</sup>	134,43 <sup>ns</sup>
Níveis de Cd/Salvinia	1	430,11 <sup>ns</sup>	1.298,01 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	366,47	271,83
CV (%)		18,32	10,77

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

Quadro 19A - Análise de variância sumariada do efeito do Cd sobre as concentrações de outros tióis solúveis (OTS) em plantas de aguapé e salvinia

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Concentração de OTS	
		Raiz	Folhas
Espécie	1	3.654,03 <sup>**</sup>	1.553,83 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Aguapé	1	3.398,64 <sup>**</sup>	1.030,97 <sup>**</sup>
Níveis de Cd/Salvinia	1	140,17 <sup>*</sup>	5,04 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	52,59	16,53
CV (%)		25,19	28,51

\*\* (P < 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* (P < 0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.