

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

ANDRESA LANA THOMÉ BIZZO CABRAL

Crescimento e respostas fisiológicas de *Ricciocarpus natans* expostas ao cádmio, cobre e níquel em duas temperaturas (25 e 27 °C)

SÃO CARLOS -SP

2020

ANDRESA LANA THOMÉ BIZZO CABRAL

Crescimento e respostas fisiológicas de *Ricciocarpus natans* expostas ao cádmio, cobre e níquel em duas temperaturas (25 e 27 °C)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de doutora em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos

Orientador: Prof^o Dr Irineu Bianchini Jr.

São Carlos-SP
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Andresa Lana Thomé Bizzo Cabral, realizada em 11/09/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Irineu Bianchini Junior (UFSCar)

Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino (UFSCar)

Profa. Dra. Adrislaine da Silva Mansano Dornfeld (UFSCar)

Prof. Dr. Antonio Fernando Monteiro Camargo (UNESP)

Profa. Dra. Marina Satika Suzuki (UENF)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

Resumo

Atividades industriais, como, a produção de açúcar e álcool por usinas, têm gerado subprodutos que apresentam altas concentrações de metais em sua composição, por exemplo, a vinhaça. Assim, a integridade dos processos ecossistêmicos se torna ameaçada, pois são os principais destinatários de poluentes/contaminantes, com consequências à biota associada. Os elementos metálicos podem ser tóxicos em elevadas concentrações, causando alterações na atividade fotossintética e danos proteicos aos vegetais. Outra condição ambiental que contribui para alteração da integridade do ecossistema aquático é o aumento da temperatura decorrente do aquecimento global. Desta forma, investigações sobre crescimento e respostas fisiológicas de plantas aquáticas submetidas à contaminação por metais em diferentes concentrações e temperaturas são necessárias para o entendimento da capacidade de algumas espécies tolerarem variadas concentrações de metais e variação de temperatura. Esse estudo avaliou crescimento e respostas fisiológicas de indivíduos de *Ricciocarpus natans* expostos a concentrações de Cd (0,001; 0,01 e 0,375 mg/L), Cu (0,002; 0,009 e 0,385 mg/L) e Ni (0,002; 0,025 e 0,221 mg/L) individualmente e em combinações, sob duas temperaturas. Além disso, foi avaliado o crescimento e respostas fisiológicas em *R. natans* expostas as diluições de vinhaça de cana de açúcar (5%, 10% e 50%) sob duas temperaturas. Ao longo de 21 dias (a cada sete dias) foram avaliados os seguintes parâmetros: crescimento (biomassa e tamanho em largura), pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* clorofila *b* e carotenoides), antioxidantes não enzimáticos (antocianinas e flavonoides) enzimáticos (superóxido dismutase e catalase), extravasamento de eletrólito e peroxidação lipídica (MDA). O coeficiente de crescimento e respostas fisiológicas de *R. natans* foi afetado pela exposição a Cd, Cu e Ni, tanto a 25°C quanto a 27°C. Com apenas 7 dias de exposição as combinações de metais e as diluições da vinhaça afetou negativamente a cinética de crescimento da *R. natans* e também a fisiologia, sendo finalizado o experimento. *R. natans* expostas a metais nas menores concentrações (0,001; 0,01 mg/L Cd, 0,002; 0,009 mg/L Cu e 0,002; 0,025 mg/L Ni) apresentou redução de MDA seguido de aumento dos antioxidantes, sugerindo ativação da defesa ao estresse a qual a planta foi submetido. Entretanto, a 27°C com a exposição aos metais houve maior conteúdo de extravasamento de eletrólitos em *R. natans* indicando alteração da membrana celular. A redução dos pigmentos fotossintéticos sob elevadas concentrações de metais (0,375 mg/L Cd, 0,385 mg/L Cu e 0,221 mg/L Ni), colabora com a redução do crescimento da planta exposta aos metais tanto individualmente quanto em combinações, representando relação entre os danos causados por estresse oxidativo. Neste estudo, *Ricciocarpus natans* apresentou mecanismo de detoxificação para Cd, Cu e Ni em baixas concentrações (0,001; 0,01 mg/L Cd), (0,002; 0,009 mg/L Cu) e (0,002; 0,025 mg/L Ni) através do aumento da produção de antioxidantes e tolerância a variação de 2°C. Assim, os resultados deste estudo contribuem para o entendimento das alterações que os metais, ou individualmente ou em combinações, e o aumento de temperatura, podem induzir no crescimento e nos parâmetros fisiológicos das macrófitas aquáticas.

Palavras-chaves: macrófita aquática, metais, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, vinhaça

Abstract

Industrial activities, such as the production of sugar and alcohol by plants, have generated by-products that have high concentrations of metals in their composition, for example, vinasse. Thus, the integrity of ecosystem processes becomes threatened, as they are the main recipients of pollutants / contaminants, with consequences for the associated biota. Metallic elements can be toxic in high concentrations, causing changes in photosynthetic activity and protein damage to plants. Another environmental condition that contributes to altering the integrity of the aquatic ecosystem is the increase in temperature due to global warming. Thus, investigations on growth and physiological responses of aquatic plants subjected to contamination by metals at different concentrations and temperatures are necessary to understand the ability of some species to tolerate varying concentrations of metals and temperature variation. This study evaluated growth and physiological responses of individuals of *Ricciocarpus natans* exposed to concentrations of Cd (0.001; 0.01 and 0.375 mg / L), Cu (0.002; 0.009 and 0.385 mg / L) and Ni (0.002; 0.025 and 0.221 mg / L) individually and in combinations, under two temperatures. In addition, growth and physiological responses in *R. natans* exposed to dilutions of sugar cane vinasse (5%, 10% and 50%) were evaluated under two temperatures. Over 21 days (every seven days) the following parameters were evaluated: growth (biomass and size in width), photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids), non-enzymatic antioxidants (anthocyanins and flavonoids) enzymatic (superoxide dismutase and catalase), electrolyte leakage and lipid peroxidation (MDA). The growth coefficient and physiological responses of *R. natans* were affected by exposure to Cd, Cu and Ni, both at 25°C and 27°C. With only 7 days of exposure, the combinations of metals and dilution of vinasse negatively affected the growth kinetics of *R. natans* and also the physiology, and the experiment was concluded. *R. natans* exposed to metals in the lowest concentrations (0.001; 0.01 mg / L Cd, 0.002; 0.009 mg / L Cu and 0.002; 0.025 mg / L Ni) showed a reduction in MDA followed by an increase in antioxidants, suggesting activation of the defense the stress to which the plant has been subjected. However, at 27°C with exposure to metals, there was a greater content of electrolyte leakage in *R. natans* indicating alteration of the cell membrane. The reduction of photosynthetic pigments under high concentrations of metals (0.375 mg / L Cd, 0.385 mg / L Cu and 0.221 mg / L Ni), collaborates with the reduction of plant growth exposed to metals both individually and in combinations, representing a relationship between the damage caused by oxidative stress. In this study, *Ricciocarpus natans* showed a detoxification mechanism for Cd, Cu and Ni in low concentrations (0.001; 0.01 mg / L Cd), (0.002; 0.009 mg / L Cu) and (0.002; 0.025 mg / L Ni) through increased antioxidant production and tolerance to variation of 2°C. Thus, the results of this study contribute to the understanding of the changes that metals, either individually or in combinations, and the increase in temperature, can induce in the growth and physiological parameters of aquatic macrophytes.

Keywords: aquatic macrophyte, metals, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, vinasse

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao Supremo Criador Jeová Deus por me conceder a vida e permitir ter o verdadeiro conhecimento, além de me proporcionar sabedoria prática e força em todos os momentos. “Digno és, Jeová, nosso Deus, de receber a glória, a honra e o poder, porque criaste todas as coisas, e por tua vontade elas vieram à existência e foram criadas.” - Apocalipse 4:11

Agradeço amorosamente aos meus pais Mônica e Vitório Bizzo e meu irmão Andrew Victor Bizzo que mesmo sabendo que íamos ficar 900 km de distância, acreditando em mim, me apoiaram em todos os momentos dando todo suporte na realização desse sonho. A vocês muito obrigada pelo amor e estarem sempre ao meu lado.

Agradeço em especial ao meu amado marido Roberto Cabral pelo grande incentivo, força, motivação, e carinho para enfrentar e finalizar essa jornada. Obrigada pela compreensão e por fazer meus dias mais alegres me fazendo sorrir diante das dificuldades.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amados avós (Arlete e Paulo Thomé; Célia e Ivo Bizzo) que sempre me ensinaram muito. Obrigada pelo apoio e por sempre se preocuparem comigo. Agradeço a todas as minhas tias e tio em especial Ivana e Bianca Bizzo e primo Ivo Bizzo Netto por também apoiarem e me fazerem visitas e companhia em São Carlos/SP sempre que possível. Muito obrigada!

Agradeço ao meu orientador Dr. Irineu Bianchini Júnior pela oportunidade e por acreditar em mim e também por toda ajuda e suporte tornando possível a realização desse trabalho. Agradeço também a Dr^a. Marcela Bianchessi da Cunha Santino por todos auxílios, ensinamentos, conversas e conselhos ao longo desses 4 anos. Obrigada pela compreensão, paciência e incentivo de ambos!

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais - UFSCar, incluindo os professores e técnicos administrativos por toda contribuição. Ao Departamento de Hidrobiologia em especial ao Laboratório de Bioensaios e Modelagem Matemática pelo apoio e infraestrutura necessários para a realização da pesquisa.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; processo 1618451/2016) pela concessão da bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 2018/00348-0) pelo financiamento da pesquisa, equipamentos e reagentes necessários.

Agradeço aos meus companheiros de Laboratório, Luana Gimenes, Emmanuelle Wanderley, Mariana Grando, Raphael Machado, Roberta Freitas, Érica Zanardo, Beatriz Buhler, Braylan de Souza, Daniele Schiavone, Yeda Paccagnella e Ricardo da Silva pela

convivência, conhecimentos e cafés compartilhados, proporcionando bons momentos. E também a companheira de disciplina Marta Stefani pela confiança e amizade.

Agradeço também aos novos e verdadeiros amigos que ganhei em São Carlos/SP, em especial, Nathalia e Irineu Palhares, Sandra e Antonio Prado, Laura Del Cole, Melissa Espirito Santo e Patrícia e Felipe Corradini (in memoriam). Estes em muitos momentos me adotaram e foram uma família para mim. Obrigada de coração.

Agradeço também a todas minhas amigas campistas (Campos dos Goytacazes/RJ) que me apoiaram no início do percurso, em especial Thaíssa Fernandes, Lara Poses, Thaís Pacheco, Pollyana Gomes, Fabiana Ribeiro, Rebeka Souza, Roberta Dieguez, Emilane Lima, Raissa Almeida e Laura Barroso por estarem de alguma forma sempre por perto.

Agradeço à banca examinadora por aceitar contribuir neste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram para minha formação profissional e pessoal.

Lista de Abreviaturas e Siglas

APX - Peroxidase de Ascorbato

CAT – Catalase

Cd – Cádmio

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cr – Cromo

Cu – Cobre

CWQG – Diretriz Canadense de Qualidade da Água

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

Fe – Ferro

g – Grama

GPOX - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione Redutase

Hg – Mercúrio

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

L – Litro

Li – Lítio

MDA – Malondialdeído

mg – Miligrama

Mn – Manganês

ml – Mililitro

N – Número de amostras

NBT – Nitro tetrazolio azul

Ni – Níquel

Pb – Chumbo

pH – potencial hidrogeniônico

POD - peroxidase

Q₁₀ – Coeficiente de temperatura

RuBisCo – Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

SH – Sulfidril

SOD – Superóxido Dismutase

TCA – ácido tricloroacético

TBA – ácido 2-tiobarbitúrico

Td – Tempo de duplicação

Zn – Zinco

μ – Coeficiente de crescimento

Lista de Figuras

- Figura 1. *Ricciocarpus natans* (Arquivo pessoal)..... 30
- Figura 2. Bioensaios com *Ricciocarpus natans* expostas a metais: (A) Incubadoras utilizadas para controle de temperatura e iluminação, (B) bioensaios de crescimento com as diferentes concentrações de metais e indivíduos de *R. natans*, 5 repetições, (C) bioensaios de fisiologia com diferentes as diferentes concentrações de metais e indivíduos de *R. natans*, (D) balança utilizada para análise de biomassa da *R. natans*, (E) determinação da largura de *R. natans* através do paquímetro. 34
- Figura 3. Largura acumulada (cm) em *Ricciocarpus natans* expostos: (A) Cádmio e 25°C, (B) Cádmio e 27°C, (C) Cobre e 25°C, (D) Cobre e 27°C, (E) Níquel e 25°C e (F) Níquel e 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 39
- Figura 4. Biomassa acumulada (g) em *Ricciocarpus natans* expostos: (A) Cádmio a 25°C, (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 41
- Figura 5. Antocianinas (mmol. g⁻¹) na biomassa de *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 45
- Figura 6. Flavonoides (%) em *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 47
- Figura 7. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em *Ricciocarpus natans* submetidas a diferentes concentrações e temperaturas: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C)

Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição..... 49

Figura 8. Atividade da catalase em *Ricciocarpus natans* submetidas a diferentes concentrações e temperaturas: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 50

Figura 9. Malondialdeído (MDA) em *Ricciocarpus natans* expostas: a (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 52

Figura 10. Extravasamento de eletrólitos em *Ricciocarpus natans* expostas a: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 54

Figura 11. Produção de clorofila a em *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 56

Figura 12. Produção de clorofila b em *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmio 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 57

Figura 13. Produção de carotenoides em *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmiu a 25°C (B) Cádmiu a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição..... 58

Figura 14. Largura acumulada (cm) em *Ricciocarpus natans* expostas a combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 60

Figura 15. Biomassa acumulada (g) em *Ricciocarpus natans* exposta a combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 61

Figura 16. Antocianinas (mmol.g^{-1}) em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo Conama Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 63

Figura 17. Flavonoides (%) em *Ricciocarpus natans* exposta as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo Conama Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os

tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 64

Figura 18. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 66

Figura 19. Atividade da Catalase em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 68

Figura 20. Malondialdeído (MDA) em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 70

Figura 21. Extravasamento de eletrólitos em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 71

Figura 22. Clorofila a em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 72

Figura 23. Clorofila b em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 74

Figura 24. Carotenoides em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 75

Figura 25. Largura acumulada (cm) em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 76

Figura 26. Biomassa acumulada (g) em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de Vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) Representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 77

Figura 27. Antocianinas (mmol.g⁻¹) em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa

diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 78

Figura 28. Flavonoides em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 78

Figura 29. Malondialdeído (MDA) em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 79

Figura 30. Extravasamento de eletrólitos em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de Vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 80

Figura 31. Clorofila a em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 81

Figura 32. Clorofila b em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 81

Figura 33. Carotenoides em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição. 82

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentrações dos metais Cd, Cu e Ni permitidas pela Resolução CONAMA No 357/05, Classe 1 para água doce, pelo padrão da qualidade da água do Canadá - Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente) e concentrações encontradas na Vinhaça coletada.....	32
Tabela 2. Combinações de metais Cd, Cu e Ni nas concentrações permitidas pela Resolução CONAMA No 357/05, Classe 1, águas doces, pelo padrão da qualidade da água do Canadá - Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente) e concentrações encontradas na vinhaça coletada.....	32
Tabela 3. Constante de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), coeficiente de determinação (r^2) e Q_{10} calculados para largura acumulada de <i>Ricciocarpus natans</i> em função a exposição de diferentes concentrações de metais (Cd, Cu e Ni) nas temperaturas de 25 e 27 °C	42
Tabela 4. Constante de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), coeficiente de determinação (r^2) e Q_{10} em <i>Ricciocarpus natans</i> calculados pela biomassa em função a exposição de diferentes concentrações de metais (Cd, Cu e Ni) nas temperaturas de 25 e 27 °C.....	43

Sumário

1. Introdução Geral.....	16
2. Hipóteses.....	18
3. Objetivos.....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. Revisão Bibliográfica.....	20
4.1. Metais e ecossistemas aquáticos.....	20
4.1.1. Cobre.....	22
4.1.2. Níquel.....	23
4.1.3. Cádmio.....	24
4.2. Variação de temperatura.....	24
4.3. As macrófitas e os metais.....	25
4.4. Alterações fisiológicas.....	26
4.4.1. Crescimento.....	26
4.4.2. Estresse oxidativo.....	26
4.4.3. Antioxidantes.....	27
5. Material e Métodos.....	29
5.1. Seleção das macrófitas.....	29
5.2. Bioensaios.....	30
5.2.1. Bioensaios para avaliação de crescimento.....	32
5.2.2. Bioensaios para avaliações fisiológicas.....	33
5.2.3. Antioxidantes não enzimáticos: flavonoides e antocianinas.....	34
5.2.4. Antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutase e catalase.....	34
5.2.5. Danos oxidativos: peroxidação lipídica e extravasamento de eletrólitos.....	35
5.2.6. Pigmentos fotossintéticos.....	36
5.3. Modelagem matemática.....	36
5.4. Análises estatísticas.....	37
6. Resultados.....	38
6.1. Cinética de Crescimento da <i>Ricciocarpus natans</i> submetida a diferentes metais (Cd, Cu e Ni) individuais.....	38
6.2. Respostas fisiológicas de <i>Ricciocarpus natans</i> a submetidas a diferentes metais (Cd, Cu e Ni) individuais.....	44
6.2.2. Antioxidantes enzimáticos em <i>Ricciocarpus natans</i> submetida a diferentes metais (Cd, Cu e Ni) e temperaturas.....	48
6.2.3. Danos oxidativos em <i>Ricciocarpus natans</i> submetidas diferentes metais (Cd, Cu e Ni) e temperaturas.....	51

6.2.4. Pigmentos fotossintéticos em <i>Ricciocarpus natans</i> submetida a diferentes metais (Cd, Cu e Ni) e temperatura	55
6.3. Cinética de crescimento em <i>Ricciocarpus natans</i> submetida a combinações de metais e diferentes temperaturas	59
6.4. Respostas fisiológicas em <i>Ricciocarpus natans</i> submetida a combinações de metais e diferentes temperaturas	62
6.4.1. Antioxidantes não enzimáticos em <i>Ricciocarpus natans</i> submetida a combinações de metais e temperaturas	62
6.4.2. Antioxidantes enzimáticos em <i>Ricciocarpus natans</i> submetida a combinações de metais e diferentes temperaturas	65
6.4.3. Danos oxidativos em <i>Ricciocarpus natans</i> submetida a combinações de metais e diferentes temperaturas	69
7. Discussão	83
7.1. Crescimento e pigmentos fotossintéticos em <i>R. natans</i> expostas a concentrações de metais individuais (Cd, Cu e Ni)	83
7.2. Respostas de antioxidantes em <i>Ricciocarpus natans</i> expostas a concentrações de metais (Cd, Cu e Ni) individuais	89
7.3. Estresse oxidativo em <i>Ricciocarpus natans</i> expostas a concentrações de metais (Cd, Cu e Ni) individuais	91
7.4. Crescimento e pigmentos fotossintéticos em <i>R. natans</i> sob combinações de metais (Cd, Cu e Ni) e diluições da vinhaça	95
7.5. Respostas de antioxidantes em <i>R. natans</i> sob combinações de metais (Cd, Cu e Ni) e diluições da vinhaça	97
7.6. Estresse oxidativo em <i>R. natans</i> sob combinações de metais (Cd, Cu e Ni) e diluições da vinhaça	97
7.7. Efeitos da variação de temperatura no crescimento e respostas fisiológicas em <i>R. natans</i>	99
8. Conclusões	104
9. Referências Bibliográficas	106
10. Apêndice 1	129

1. Introdução Geral

Os recursos hídricos têm sido alvo de investigações e investimentos, pois o desenvolvimento econômico regional, nacional e mundial depende da disponibilidade e qualidade da água para os múltiplos usos: geração de energia, abastecimento público, irrigação e produção de alimentos (TUNDISI, 2008). Entretanto, a integridade ambiental dos ecossistemas aquáticos está sendo constantemente ameaçada, visto que estes são os principais destinatários de contaminantes, como efluentes industriais, domésticos, agropecuários e águas residuais (DHOTE & DIXIT, 2009). Em geral, estes efluentes podem conter elevada concentração de substâncias orgânicas e inorgânicas, tais como nitrogênio, fósforo, carboidratos, proteínas e metais (LIMONS, 2008). Os serviços industriais desenvolvidos próximos aos corpos hídricos podem impactar negativamente esses sistemas, por exemplo, a atividade econômica predominante da região do interior do estado de São Paulo é a usina de cana-de-açúcar. A produção do álcool e açúcar derivados da usina tem a vinhaça como principal subproduto, a qual pode impactar a qualidade ambiental por conter concentrações elevadas de metais (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Sendo assim, há a necessidade da caracterização dos elementos deste composto para detectar os compostos metálicos e suas concentrações, a fim de avaliar os danos que estes elementos podem causar aos organismos expostos.

A maioria dos metais são persistentes, não biodegradáveis e bioacumulativos, possibilitando se difundir por diferentes níveis tróficos (ALI et al., 2020), com consequências negativas para a biota associada, inclusive, a população humana. Alguns metais, como Fe, Cu, Zn, Ni e Mn, são considerados micronutrientes essenciais às plantas, ou seja, são necessários nas atividades metabólicas desses organismos (TAIZ & ZAIGER, 2009). Estes metais em baixas concentrações adequadas podem atuar como componentes estruturais e catalíticos de proteínas e co-fatores de enzimas essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas (SINHA et al., 2009). Entretanto, a presença desses elementos em excesso pode ser tóxica (TÜZEN, 2003; CLEMENS, 2006). O Cd, Hg, Cr, Li, e Pb são metais não essenciais às plantas, podendo, mesmo em baixas concentrações, podendo apresentar extrema toxicidade aos organismos (CLEMENS, 2006).

O processo de descarte de efluentes incrementa a disponibilidade de metais em ambientes aquáticos e neste encontramos normalmente uma grande quantidade de macrófitas aquáticas, estas em contato com os metais disponíveis podem ter seu metabolismo alterado.

As macrófitas aquáticas são um grupo de organismos fotossintéticos que habitam diversos ecossistemas aquáticos e possuem papel fundamental na ciclagem de nutrientes e na formação de detritos (PETRUCIO & ESTEVES, 2000). Algumas macrófitas aquáticas têm grande capacidade de remover e acumular diversos elementos e compostos metálicos presentes tanto na água quanto no sedimento (NÚÑEZ et al., 2011; MISHRA & TRIPATHI, 2008). A absorção de metais pelos organismos depende da forma química disponível no ambiente e do tipo ecológico da macrófita (submersa, flutuante livre, enraizada, entre outras) (TANNER, 2001). Entretanto, as macrófitas quando expostas aos metais biodisponíveis podem apresentar mudanças genéticas, bioquímicas e fisiológicas causadas pela fitotoxicidade.

Outro parâmetro nos ambientes aquáticos que pode alterar o metabolismo vegetal é o aumento da temperatura, decorrente de mudanças climáticas devido ao aquecimento global (IPCC, 2018). A variação da temperatura influencia diretamente no crescimento, produtividade e processos fisiológicos de macrófitas, como, a fotossíntese, além disso pode alterar a solubilidade de elementos disponíveis na água, podendo afetar todo o ecossistema aquático com consequências ecológicas (PARMESAN, 2006; CANADELL et al., 2007; BELLARD, 2012). Desse modo, considerando alterações climáticas e presença de contaminantes no sistema aquático, é necessária a avaliação do crescimento da macrófita e investigações sobre respostas fisiológicas para o entendimento da capacidade de algumas espécies tolerarem variadas temperaturas e concentrações de metais, mitigando efeitos adversos dos poluentes no metabolismo.

2. Hipóteses

Admitindo-se que macrófitas aquáticas, quando expostas a elevadas concentrações de metais, sofrem efeitos adversos tanto em seu crescimento quanto em sua fisiologia, considerou-se nesse estudo que a macrófita aquática flutuante *Ricciocarpus natans*:

- (a) quando exposta aos metais Cd, Cu e Ni, separadamente, apresentará maior toxicidade no crescimento, pigmentos fotossintéticos e danos oxidativos, em resposta ao Cd por não ser um metal essencial.
- (b) Quando expostas aos metais Cd, Cu e Ni em combinações, apresentará estresse oxidativo e dano fotossintético mais acentuado do que o dano relativo à exposição a apenas um metal. Esse estresse induzirá aumento da produção de metabólitos antioxidantes e aumentará a atividade enzimática antioxidante a fim de proteger o metabolismo e tolerar o meio.
- (c) A presença de metais em concentrações permitidas pelo CONAMA e Diretriz Canadense de Qualidade da Água (CWQG) não afetará o crescimento de *R. natans*, entretanto, espera-se que o crescimento seja reduzido durante a exposição dos metais em elevada concentração e sob combinações de metais.
- (d) O aumento da temperatura irá aumentar a toxicidade dos metais, e alterar metabolismo da planta prejudicando o crescimento e respostas fisiológicas da *R. natans*.
- (e) A exposição a vinhaça induzirá danos negativos na fisiologia e crescimento da planta.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar crescimento e alterações fisiológicas de *Ricciocarpus natans* submetidas a diferentes concentrações de metais, individualmente e em combinações, sob duas temperaturas e também avaliar a toxicidade da vinhaça em *Ricciocarpus natans* através do crescimento e respostas fisiológicas.

3.2. Objetivos específicos

- Selecionar três elementos metálicos a partir da caracterização de elementos metálicos na vinhaça proveniente de usina de cana-de-açúcar;
- Determinar o crescimento e utilizar equações matemática para definir cinética de crescimento da macrófita aquática *Ricciocarpus natans*, exposta aos três metais separadamente e em combinações, em diferentes concentrações, nas temperaturas de 25 e 27 °C.
- Avaliar pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides) na macrófita *R. natans* exposta aos metais, separadamente e em combinações, nas temperaturas de 25 e 27 °C.
- Avaliar respostas de estresse oxidativo na macrófita *R. natans* exposta aos metais, separadamente e em combinações, através de peroxidação lipídica (MDA, aldeídos e extravasamentos de eletrólitos), nas temperaturas de 25 e 27 °C.
- Avaliar as respostas antioxidativas na macrófita *R. natans* exposta aos metais, separadamente e em combinações, através da atividade de enzimas antioxidantes (CAT e SOD) e metabólitos não enzimáticos (flavonoides, antocianinas e carotenoides) nas temperaturas de 25 e 27 °C.
- Avaliar o crescimento e respostas fisiológicas (pigmentos fotossintéticos, estresse oxidativo e antioxidantes) em *R. natans* exposta as diluições da vinhaça, nas temperaturas de 25 e 27°C.

4. Revisão Bibliográfica

4.1. Contaminação de ecossistemas aquáticos

Nas últimas décadas, o rápido crescimento populacional e o acelerado desenvolvimento industrial e agropecuário contribuíram para a alteração da qualidade dos ecossistemas aquáticos, através dos despejos de efluentes domésticos e industriais. Em geral, estes efluentes podem conter elevada concentração de substâncias, tais como nitrogênio, fósforo, compostos orgânicos e metais (LIMONS, 2008).

Um exemplo de efluente é a vinhaça, gerado a partir da destilação do álcool. Estima-se que para cada litro de álcool obtido seja produzido de 8 a 18 litros de vinhaça (PARNAUDEAU et al., 2008), com sua composição variando de acordo com os materiais e equipamentos utilizados no processo de destilação (KUMAR et al., 1998; NAIK; JAGADEESH; ALAGAWADI, 2008). A vinhaça é produzida em muitos países do mundo (GEMTOS et al., 1999), sendo o Brasil considerado o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (DEMATTE, 2004), com capacidade de produzir 16 bilhões de litros de etanol por ano (UNICA, 2007; JUNIOR et al., 2008), dessa forma é grande produtor de vinhaça. O estado de São Paulo possui a maior produção, principalmente na região noroeste do estado, onde se concentra a maior parte das agroindústrias sucroalcooleiras (Silva et al., 2010). A indústria sucroalcooleira é uma importante fonte de economia para o desenvolvimento do Brasil (AGUIAR et al., 2010), entretanto, produz resíduos nocivos, aos ambientes terrestres e aquáticos, se não tratado e descartado adequadamente (FERREIRA et al., 2011).

A vinhaça é caracterizada com um poder poluente cem vezes maior que o do esgoto doméstico, decorre das suas diferentes propriedades, como, riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade e além de elevada temperatura na saída dos destiladores (Freire & Cortez, 2000). As características da vinhaça a torna problemática aos recursos hídricos quando este resíduo alcança estes ambientes, sendo considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces.

A vinhaça era lançada diretamente em rios, ocasionando contaminação e danos nos organismos aquáticos, devido a esses prejuízos ambientais, hoje existe uma maior preocupação ambiental através de uma legislação mais rigorosa (SANTOS et al., 1981; DEMATTE et al., 2004). Atualmente, a vinhaça é utilizada na fertirrigação da própria cultura de cana-de-açúcar, uma vez que esse resíduo apresenta grande quantidade de matéria

orgânica, íons e micronutrientes essenciais para as plantas, possibilitando a fertilização de solos agricultáveis (MELO; SILVA, 2001; CAMARGO et al., 2009). No entanto, em alguns casos, a aplicação da vinhaça tem sido questionada devido seus efeitos no solo e nas águas subterrâneas (SILVA et al., 2007; GIANCHINI; FERRAZ, 2009). A vinhaça quando depositada no solo pode sofrer percolação/lixiviação, podendo chegar a cursos d'água, mas não na sua forma bruta (CALÇAS, 2001; HAMADA et al., 2002). Este despejo da vinhaça no solo pode causar salinização, redução da alcalinidade e perda das culturas (KUMAR; VISWANATHAN, 1991), aumento da fitotoxicidade, odor incômodo (NAVARRO et al., 2000) e lixiviação dos metais presentes para as águas subterrâneas, alterações na qualidade do solo devido ao desbalanceamento dos nutrientes (AGRAWAL; PANDEY, 1994).

Os metais são elementos que podem estar presentes no rejeito de vinhaça. Estes elementos também podem ser introduzidos naturalmente no ambiente aquático pelas atividades vulcânicas, intemperismo e são encontrados naturalmente em formações rochosas, sendo liberados lentamente no solo e, através da lixiviação, alcançam os ecossistemas aquáticos. Entretanto, existem fatores antrópicos que contribuem para o seu aumento e disponibilidade nos ambientes aquáticos, como: processamento de metais, mineração, usinas de energia geotérmica, usina de cana-de-açúcar, fábricas automotivas e de papel, fabricação de pesticidas, curtimento, tinturaria e galvanização são também responsáveis pela contaminação global de metais (VECCHIA et al. 2005; CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Desse modo, os metais são uma classe importante de contaminantes que reduzem a qualidade da água. Os elementos metálicos em sua maioria não são biodegradáveis, podendo atingir diferentes níveis tróficos por acumular persistentemente na biota (GALL et al., 2015) pelo processo de biomagnificação (BIELMYER-FRASER et al., 2017).

Alguns metais são classificados como essenciais, considerados micronutrientes, como o ferro, zinco, cobre, cromo, selênio e manganês. Estes metais mesmo em baixas concentrações desempenham importantes funções biológicas nos processos metabólicos, porém quando em elevadas concentrações podem causar danos aos ecossistemas sendo tóxicos (GUILHERME et al., 2005). Todavia, outros metais são considerados não essenciais, como o mercúrio, níquel, cádmio, chumbo, arsênio e alumínio. Esses são tóxicos mesmo em pequenas concentrações, uma vez que não desempenham funções em processos biológicos, mas podem bioacumular e biomagnificar na cadeia trófica (ESTEVES, 1998; VAZ & LIMA, 2003; GAUTAM et al., 2014). Os metais podem causar efeitos deletérios à saúde humana, à

sobrevivência dos organismos e à diminuição da biodiversidade (AZEVEDO & CHASIN, 2003; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

No ecossistema aquático, os metais podem ser encontrados na coluna d'água, nos sedimentos, em materiais particulados suspensos e na água intersticial (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). A fim de monitorar a qualidade de ecossistemas aquáticos, através dos despejos de efluentes, foram estabelecidos limites de concentração de elementos metálicos permitidos, considerados tóxicos baseados no tipo de ambiente e destino da utilização do recurso hídrico. No Brasil, estes limites estabelecidos são de acordo com a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA 357/2005.

4.1.1. Cobre

O cobre (Cu) é um elemento metálico presente naturalmente na crosta terrestre, nos minerais como a malaquita ($\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$), calcopirita (CuFeS_2) e a calcocita (Cu_2S) (ATSDR, 2004). Assim como os demais metais, o Cu pode ser transportado através da erosão por processos de intemperismo, acelerado pela precipitação pluviométrica e escoado pela água superficial ou percolada no solo (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

O cobre tem ampla utilização devido a sua elevada condutividade térmica e elétrica, ductilidade, durabilidade, maleabilidade e baixa corrosividade. Devido a essas propriedades, o cobre é base para muitos produtos como na fabricação de fiações elétricas, tubos, válvulas, acessórios, moedas, utensílios de cozinha e materiais de construção e de ligas metálicas, como latão e bronze. O cobre também é utilizado na fabricação de fertilizantes, fungicidas, algicidas, bactericidas (como sulfato de cobre) e em tintas e suplementos nutricionais (AZEVEDO & CHASIN, 2003; WHO, 2004). Dessa forma, o cobre é o terceiro metal mais utilizado no mundo.

O cobre em baixas concentrações é considerado um micronutriente essencial para seres vivos como, ser humano, plantas e animais. Esse, atua como cofator de diversas enzimas, como, a citocromo c oxidase, a superóxido dismutase e as ATPases (GAETKE & CHOW, 2003). Contudo, quando em excesso, este metal pode conduzir ao desequilíbrio iônico alterando o potencial de oxirredução, afetando a transcrição, a tradução e a divisão celular e induzindo à formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (GAETKE & CHOW, 2003; MACKIE et al., 2012).

A toxicidade do Cu é proporcional a sua biodisponibilidade, ou seja, quanto maior a concentração de íons livres, maior a biodisponibilidade do cobre, conseqüentemente, maior os efeitos toxicológicos sobre os organismos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Sendo assim, por conta do uso intenso e potencial de toxicidade, o Cu é classificado como um contaminante prioritário, sendo necessário o controle de seu despejo nos corpos hídricos (ABRAHAM e SUSAN, 2017). No Brasil, o CONAMA determina que a concentração máxima desse elemento na água doce seja de $0,009 \text{ mg L}^{-1}$, segundo a Resolução 357/05 (CONAMA, 2005).

4.1.2. Níquel

O níquel (Ni) é encontrado naturalmente na maioria dos meteoritos, compondo apenas 0,01% da crosta terrestre, presente também em minerais como, nicolita e garnierita (AZEVEDO, CHASIN, 2003; VAITSMAN et al, 2001).

O estado de oxidação generalizado em situações ambientais é o Ni (II). O níquel é um metal traço liberado no ar, solo e amostras de água na biosfera por fontes antrópicas e naturais. As fontes naturais incluem o resfriamento de rochas, enquanto a mineração de metais, fundição, emissões veiculares, queima de combustível fóssil, resíduos municipais e industriais, baterias elétricas, indústrias metalúrgicas e de galvanoplastia são fontes antropogênicas. Vários compostos de níquel são usados em diferentes unidades industriais, como carbonato de níquel, acetato de níquel, óxido de níquel e hidróxido de níquel (HALL et al. 2015).

O Ni é um dos 23 metais que são de preocupação para a saúde ambiental e humana, visto que eles podem entrar na cadeia alimentar por meio das plantas e gerar efeitos tóxicos na saúde animal e humana (CEMPEL e NIKEL 2006).

O níquel é um micronutriente metabolicamente fundamental para o crescimento normal das plantas e um importante componente da enzima urease que desempenha um papel vital no metabolismo do nitrogênio (HALL et al. 2015). Considerando a deposição elevada de Ni na atmosfera, esforços devem ser feitos para estimar / prever sistematicamente a concentração sustentável de Ni no sistema aquático. No reservatório de água, o Ni entra por solubilização, ciclos biológicos e sedimentação por processos naturais. Tendo em vista os efeitos do excesso do Ni no ambiente, no Brasil, o CONAMA determina que a concentração máxima desse elemento na água doce seja de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$, segundo a Resolução 357/05 (CONAMA, 2005).

4.1.3. Cádmio

Cádmio (Cd) é um elemento relativamente raro, não encontrado em estado puro na natureza. O aumento da presença de Cd no ambiente está intrinsecamente relacionado à atividade humana. O Cd se apresenta nas águas naturais devido às descargas de efluentes industriais, principalmente as galvanoplastias, produção de pigmentos, soldas, equipamentos eletrônicos, lubrificantes e acessórios fotográficos. Além disso, é utilizado na formulação de produtos inseticidas e fungicidas e a queima de combustíveis fósseis consiste também numa fonte de cádmio para o ambiente (CETESB, 2007).

O Cd é considerado um metal não essencial, sendo extremamente tóxico, mesmo em baixas concentrações. Esse metal pode ser acumulado e atingir diferentes níveis da cadeia trófica, podendo desencadear efeitos negativos em diversos organismos (GAAD, 1990). Os efeitos prejudiciais do cádmio na saúde humana, por exemplo, incluem uma série de desordens crônicas, danos renais, enfisemas, hipertensão e atrofia testicular (LEYVA-RAMOS *et al.*, 1997).

No ambiente aquático, o cádmio tende a se concentrar nos sedimentos, tornando-se disponível ao sistema radicular de plantas enraizadas. Entretanto, quando disponíveis na coluna d'água, organismos vegetais de vida livre ou flutuante podem absorver o cádmio e, dessa maneira, acumular nos tecidos e aumentar o risco de transferência, por meio da cadeia alimentar, para seres humanos e animais (VECCHIA *et al.* 2005).

O cádmio pode interferir em diversas funções celulares, como a formação de complexos com grupos externos de compostos orgânicos, tais como as proteínas, resultando na inibição de atividades essenciais (METWALLY *et al.* 2003). Além disso, pode provocar alterações nos sistemas antioxidantes, estimulando o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e, eventualmente, morte celular (SCHÜTZENDÜBEL *et al.* 2001).

Considerando os efeitos negativos e cumulativos do cádmio em organismos e em sistemas aquáticos, a legislação brasileira, através da Resolução 357/05, do CONAMA (CONAMA, 2005) estabelece para o cádmio o limite de 0,01 mg/l em águas doces.

4.2. Variação de temperatura

A disponibilidade e toxicidade por metais não depende somente da concentração disponível no ambiente, mas também, de fatores biológicos e das condições físicas e químicas da água (por exemplo, pH, temperatura, dureza, alcalinidade, matéria orgânica e partículas sólidas suspensas), que podem influenciar na especiação química dos metais (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013; JO *et al.*, 2010; WOOD, 2011; BJERRGAARD *et*

al., 2015). Em especial, a variação da temperatura (i.e., seu aumento) podem contribuir para a solubilização de alguns compostos metálicos, resultando no aumento da toxicidade no organismo exposto (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). As variações climáticas podem, também, influenciar diretamente o metabolismo de organismos fotossintéticos aquáticos (FINKEL et al., 2010). Alterações na temperatura da água, pH, UV-B na coluna superior da água e a introdução de poluentes induzem estresse nas comunidades dos produtores primários (FINKEL et al., 2010), afetando seus processos fisiológicos. Dessa forma são necessários estudos avaliando efeitos da variação da temperatura no sistema aquático, tendo em vista um aumento previsto de temperatura global, causadas pelas atividades antrópicas, pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC, 2018).

4.3. As macrófitas e os metais

As macrófitas aquáticas são um grupo de organismos fotossintéticos definidas como plantas macroscópicas que habitam ambientes aquáticos ou terras úmidas. Possuem elevadas taxas de produção primária e habitam diversos ecossistemas aquáticos, dulcícolas e salobros, temporários ou permanentes, ambientes de água pouco movimentada ou com corrente (WETZEL, 1981). O grupo abrange macroalgas, briófitas, pteridófitas e angiospermas. Entre suas características, podemos citar seu hábito aquático, capacidade de acumular biomassa, acelerar a ciclagem de nutrientes, ação como filtro ecológico e adubo (PETRUCIO & ESTEVES, 2000; BINI *et al.*, 2001; POMPÊO, 2008).

As macrófitas quando expostas aos metais podem os acumular intracelularmente. Dessa forma, podem ocorrer efeitos deletérios no metabolismo. Cada espécie tem capacidade de tolerar níveis diferenciados de diversos contaminantes (KAMAL *et al.*, 2004). As espécies de plantas que toleram e absorvem elevados níveis de determinados metais, considerados tóxicos a diversos organismos, são consideradas hiperacumuladoras (ZAVODA *et al.*, 2001). Estas apresentam como característica a hipertolerância a estes metais (CHANEY *et al.*, 1997; CLEMENS *et al.*, 2002). As macrófitas aquáticas podem remover metais por absorção ou adsorção de superfície e os integrar ao seu sistema, podendo acumular em concentrações limitadas conforme cada espécie (RAI et al., 1995)

A ampla disponibilidade, taxa de crescimento rápido, alta biomassa, relação custo-benefício, tolerância e capacidade de acumular poluentes orgânicos e tóxicos, tornam as macrófitas aquáticas possíveis potenciais fitorremediadoras (DAUD et al., 2018; GALAL et al., 2018). A fitorremediação consiste no uso de plantas para a retirada de contaminantes da

água ou torná-los menos tóxicos no ambiente, sendo uma alternativa para tratamento de ambientes contaminados (REZANIA et al., 2016). Entretanto, contaminantes como metais podem acarretar danos fisiológicos nos vegetais. Dessa forma, são necessários estudos fisiológicos de cada espécie com o intuito de determinar a capacidade e resposta do seu metabolismo frente à exposição de contaminantes, para que seja possível o uso eficiente de cada espécie.

4.4. Alterações fisiológicas

As macrófitas aquáticas na presença de metais podem sofrer alterações em sua fisiologia, como alterações na membrana do cloroplastos, degradação de pigmentos (clorofilas e carotenoides), desencadear estresse oxidativo pela formação de EROs e, conseqüentemente, alterar a produção de antioxidantes (VAJPAYEE *et al.*, 2000; VERNAY *et al.*, 2007). Dessa forma, os metais podem afetar o crescimento, reprodução e metabolismo das macrófitas aquáticas.

4.4.1. Crescimento

O crescimento das plantas pode ser afetado pela presença e disponibilidade de metais no meio de cultivo. Isto resulta, principalmente, em alterações nos processos fisiológicos básicos, como fotossíntese e respiração. Alterações na capacidade fotossintética incluem danos na produção de pigmentos fotossintéticos e no aparelho fotossintético, inibição do transporte de elétrons, capacidade de fixação de carbono e potencial de fotofosforilação (PATSIKKA et al., 2002; SHANKER et al., 2005; KUPPER et al., 2007). Quando ocorre uma alteração na capacidade fotossintética do organismo, esta interfere diretamente na capacidade de desenvolvimento e crescimento da planta. Os pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides), localizados nas membranas dos tilacoides dos cloroplastos, absorvem a energia luminosa que é utilizada no processo fotossintético (TAIZ & ZEIGER, 2009). O acúmulo de metais pode reduzir a quantidade de pigmentos fotossintéticos, afetando negativamente o crescimento de plantas (PANDA & CHOUDHURY, 2005).

4.4.2. Estresse oxidativo

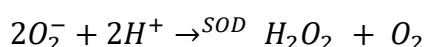
O estresse oxidativo é decorrente de perturbação do equilíbrio redox celular favorecendo os oxidantes e podendo causar à ruptura de macromoléculas celulares (por exemplo, degradação de proteínas, ligações cruzadas no DNA, peroxidação de ácidos graxos da membrana). Os metais em elevadas concentrações podem causar danos ao metabolismo celular e induzir o aumento da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como a hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido (O_2^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), desencadeando o estresse oxidativo (HSU e GUO, 2002). Sendo assim, os metais podem ser extremamente prejudiciais às plantas em altas concentrações (HOSEINI e ZARGARI, 2013).

As EROs são encontradas naturalmente em plantas em níveis reduzidos sob condições normais (SCANDALIOS, 1993). Esses radicais ocorrem transitoriamente em organismos aeróbicos porque também são gerados em células vegetais durante processos metabólicos, como respiração e fotossíntese (HALLIWELL, 2006). O estresse oxidativo tem como consequência a oxidação de moléculas biológicas pela produção de EROs (HALLIWELL, 2006). Deste modo, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e membranas lipídicas são os principais alvos das EROs, podendo acarretar o rompimento das membranas celulares. A membrana plasmática é a primeira estrutura a estabelecer uma relação com os metais, podendo causar danos na sua função, induzindo aumento dos extravasamentos das células (QUARTACCI *et al.*, 2001). Esses danos podem ser consequência de diferentes processos, como as ligações com grupos SH das proteínas, peroxidação dos lipídeos, inativação de proteínas chave e mudanças na composição e fluidez da membrana lipídica (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Dessa forma, a peroxidação lipídica (que pode ser avaliada pelo teor de malondialdeído) e o extravasamento de eletrólitos decorrente da degradação da membrana biológica são considerados parâmetros avaliativos de danos oxidativos. As EROs são produzidas em diferentes compartimentos celulares e extracelulares (PERL-TREVES E PERL, 2002). A fim de mitigar os danos causados pelo estresse oxidativo, os organismos desenvolveram diversas formas de defesa que incluem sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (SYTAR *et al.*, 2013).

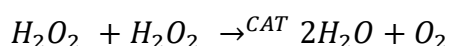
4.4.3. Antioxidantes

Os antioxidantes atuam em defesa do organismo vegetal (ROUT & SHAW 2000) prevenindo danos mais severos nas suas células, compartimentos subcelulares e processos bioquímicos celulares (GRATÃO et al., 2005; HAFSI et al., 2010; MALEC et al., 2011). Visto que o sistema antioxidante é o sistema regulador mais importante e ubíquo nas plantas, as capacita a combater o estresse externo mantendo com eficácia a integridade da estrutura da membrana e protegendo as células dos danos causados pelas EROs (BAXTER et al. 2014; LIN et al.2018). Para evitar o estresse oxidativo, as plantas desenvolveram muitas estratégias, como, mecanismos bioquímicos de defesa como a atuação de enzimas antioxidantes inibidoras de substâncias tóxicas (NAKAZAWA et al., 2004), quelação dos íons metálicos pela ação de fitoquelatinas (RAUSER, 1995), aminoácidos (KRÄMER *et al.*, 1996) e antioxidantes não enzimáticos (SYTAR et l., 2013)

As plantas contam com um sistema antioxidante enzimático e não enzimático que refletem a resistência de uma planta às adversidades (TEISSEIRE e GUY, 2000). Entre os enzimáticos, os dois mais importantes são a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a produção de H₂O₂, e a catalase (CAT), que elimina H₂O₂ nos peroxissomos. Os mecanismos enzimáticos são vias primárias que atuam de forma direta na remoção de EROs, sequestrando-as e utilizando-as como substrato (Equações 1 e 2) . Em plantas expostas a metais, as atividades de CAT e de SOD são alteradas, visando à oxidação e remoção das EROs e à manutenção do metabolismo adequado da planta (GILL & TUTEJA, 2010).



Equação 1: Dismutação do superóxido catalisada pela SOD



Equação 2: Degradação do peróxido de hidrogênio catalisado pela CAT

Os antioxidantes não enzimáticos são tocoferóis, ascorbato, glutathiona (GSH), carotenoides, flavonoides e antocianinas que têm um papel significativo na eliminação de EROs e no reparo de danos celulares mantendo, assim, a homeostase redox na célula (GRATÃO et al., 2005; PANDA & CHOUDHURY, 2005; GILL e TUTEJA 2010; SHARMA et al., 2012; KACIENĖ et al. 2015). Os mecanismos antioxidantes não enzimáticos são capazes, preferencialmente, de oxidar as biomoléculas para proteger o organismo dos efeitos nocivos das EROs, reduzindo seu impacto degradando-as sem que haja formação de novas espécies reativas.

5. Material e Métodos

5.1. Seleção das macrófitas

A macrófita aquática *Ricciocarpus natans* (L.) Corda pertence à ordem Marchantiales e à família Ricciaceae. A *R. natans* pertence ao grupo de briófitas sendo considerada uma hepática aquática, não possuem tecidos vasculares, caules, flores e raízes (CHIODI, et al., 2011), e está associada a correntes lentas, lagoas, poças, lagos e lagoas de água doce, ricas em nutrientes (RUIZ, 2008). *R. natans* possui hábito flutuante, o seu tamanho pode alcançar até 2,5 cm de comprimento (Figura 1) e no seu lado inferior apresentam rizoides que desempenham a função de absorção (SAMECKA-CYMERMAN et al., 2002; RUIZ, 2008). A reprodução de *R. natans* pode ser vegetativa, com bifurcação do ápice e sexuada, por união dos gametas dando origem a esporos (RIAL & LASSO, 1998; POTT & POTT, 2000). A *R. natans*, é nativa da Nova Zelândia (CLAYTON, 1998), sendo sua distribuição considerada cosmopolita, visto que pode ser encontrada em diversas regiões, tanto temperadas quanto tropicais, e em diferentes altitudes, como, um pântano em Ruanda (África) a 2.399 m de altitude (VANA et al., 1979), em um lago de várzea na planície de inundação do Amazonas (JUNK & PIEDADE, 1993), na região dos buracos das pradarias dos EUA (GALATOWISH & VAN DER VALK, 1996), na Península Ibérica (CIRUJANO et al., 1998) e em todas regiões brasileiras (YANO, 2012).

Para este estudo a *R. natans* foi selecionada com base no tamanho relativamente pequeno, possibilitando fácil cultivo e manuseio no laboratório para experimentos com condições controladas e por desenvolverem capacidade de acumular ou responder sensivelmente a contaminantes ambientais (ZECHMEISTER et al., 2003). Além disso, por apresentar uma distribuição mundial em diferentes condições ambientais, climáticas e diferentes tipos de habitats (GLIME, 2017), indicando capacidade para lidar com diferentes alterações ambientais. Assim, ela poder utilizada como modelo para trabalhos futuros.



Figura 1. *Ricciocarpus natans* (Arquivo pessoal)

5.1.1. Coleta e cultivo da *Ricciocarpus natans*

Indivíduos da macrófita aquática *Ricciocarpus natans* foram coletados no Jardim Experimental do Departamento de Botânica (UFSCar, *campus* de São Carlos, SP; 21°59'00,37" S e 47°52'47,42" W). Em seguida foram levadas ao laboratório de Bioensaios e Modelagem Matemática (LBMM – Departamento de Hidrobiologia/UFSCar), lavados para remoção de detritos e colocados em recipientes de cultivo para seu desenvolvimento.

5.2. Bioensaios

Para a realização dos bioensaios foram realizadas aclimações dos indivíduos para os ensaios de crescimento e análises fisiológicas, as macrófitas foram lavadas em água corrente para a remoção de detritos e previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5% durante cinco minutos (i.e. redução de microrganismos e algas) (OECD, 2002), seguida de lavagem com água destilada. Os indivíduos foram aclimatados por sete dias, com água da Represa do Fazzari, São Carlos - SP (21° 58' 18,12" S; 47° 53' 15,07" O), sendo a água deste ambiente considerada tratamento controle para o estudo. A Represa do Fazzari foi formada por um rio de primeira ordem. Esse ambiente possui baixa interferência antrópica, apresentando como características águas ácidas (pH 6,5) com baixa condutividade (0,03 mS cm⁻¹) e bem oxigenadas (6,15 mg L⁻¹) (SCHIAVONE, 2019).

Durante a aclimações e bioensaios de *R. natans*, os indivíduos foram mantidos em incubadoras (modelo CL; marca Coldlab) com condições controladas de iluminação de 12h claro 12h escuro (intensidade luminosa: 250,91 μE cm⁻²s⁻¹) e duas diferentes temperaturas. Foi realizada à randomização dos frascos para homogeneizar a intensidade

luminosa nas amostras. As temperaturas selecionadas para o crescimento de *R. natans* foram 25°C, por representar a temperatura média em diversos corpos hídricos da região de Cerrado de São Carlos/SP (FUZZARI, 2006; SANTOS, 2009) e 27° C (temperatura média acrescida de 2 °C), de acordo com possível incremento previsto da temperatura global (IPCC, 2018).

Os metais utilizados neste estudo foram selecionados com base na caracterização da vinhaça. A caracterização dos metais na vinhaça foi realizada por análise por espectrometria de absorção atômica pelo Laboratório de Saneamento da USP/ São Carlos – SP. Assim, foram selecionados os 3 metais presentes com concentrações mais elevadas. As concentrações dos metais avaliadas foram definidas com base na legislação Conama Resolução 357/05 classe 1 para águas doces, na Diretriz Canadense de Qualidade da Água (CWQG), e nas concentrações encontrada na vinhaça obtida como efluente de uma usina de cana-de-açúcar (Tabela 1). Os indivíduos *R. natans* também foram expostos a combinações dos metais em diferentes concentrações (Tabela 2) e diluições da vinhaça, 5% (5 % vinhaça em 95% água da Represa do Fazzari), 10% (10 % vinhaça em 90% água da Represa do Fazzari) 50% (50% vinhaça em 50 % água da Represa do Fazzari). A avaliação de efeitos tóxicos da vinhaça e seus componentes são importantes, por levar em conta a possibilidade de risco de um acidente ou descarte inadequado deste efluente (SMAKA-KINCL et al., 1996; MATSUMOTO et al., 2006).

Para os bioensaios foram utilizados os sais cloreto de cádmio (CdCl_2) e cloreto de cobre (CuCl_2) e cloreto de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Para os tratamentos com metais, foram preparadas soluções estoque 1000 mg (concentrações nominais) e então adicionados alíquotas dissolvidas em água natural filtrada do reservatório Fazzari.

Tabela 1. Concentrações dos metais Cd, Cu e Ni permitidas pela Resolução CONAMA No 357/05, Classe 1 para água doce, pelo padrão da qualidade da água do Canadá - Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente) e concentrações encontradas na Vinhaça coletada.

	Cádmio	Cobre	Níquel
Diretriz Canadense de Qualidade da Água (CWQG)	0,001 mg/L	0,002 mg/L	0,002 mg/L
CONAMA Resolução 357/05	0,01 mg/L	0,009 mg/L	0,025 mg/L
Concentração encontrada na vinhaça	0,375 mg/L	0,385 mg/L	0,221 mg/L

Tabela 2. Combinações de metais Cd, Cu e Ni nas concentrações permitidas pela Resolução CONAMA No 357/05, Classe 1, águas doces, pelo padrão da qualidade da água do Canadá - Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente) e concentrações encontradas na vinhaça coletada.

	Cu+Ni	Cd+Cu+Ni	Cd+Ni	Cd+Cu
Diretriz Canadense de Qualidade da Água (CWQG)	0,002+0,002 mg/L	0,001 0,002+0,002 mg/L	0,001+0,002 mg/L	0,001+0,002 mg/L
Conama Resolução 357/05	0,009+0,025 mg/L	0,01+0,009+0,025 mg/L	0,01+0,025 mg/L	0,01+0,009 mg/L
Concentração encontrada na vinhaça	0,385+0,221 mg/L	0,375+0,385+0,221 mg/L	0,375+0,221 mg/L	0,375+0,375 mg/L

5.2.1. Bioensaios para avaliação de crescimento

Para avaliação de crescimento, as plantas foram mantidas em frascos de borosilicato de 250 ml contendo 200 ml de solução - teste (10 indivíduos por frasco) de diferentes concentrações nominais dos metais Cd, Cu e Ni (Tabela 3), diferentes concentrações de vinhaça (5%, 10% e 50%) e controle (água da Represa do Fazzari) por até 21 dias ou até degradação dos tecidos ou clorose de 50% dos indivíduos. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento e 10 indivíduos (n=10) em cada réplica. Para realizar as mensurações do crescimento, foi realizado, previamente, uma secagem das plantas para

minimizar a interferência da água. Assim, estas foram colocadas sobre papel filtro qualitativo (Marca Unifil – 80g; 0,16 mm) por cerca de 2 minutos.

O crescimento de indivíduos de *R. natans* foi avaliado com a mensuração da largura da planta através de um paquímetro universal (Royal Swiss) e gravimetricamente por pesagem de cada indivíduo na balança de precisão analítica (modelo M214Ai, marca Bel Engineering). As mensurações nos indivíduos *R. natans* foram realizadas a cada 7 dias (Figura 2).

Os parâmetros físico-químicos das soluções, como, pH (modelo DMPH-2, marca Digimed), a concentração de oxigênio dissolvido (modelo 58, marca YSI) e a condutividade elétrica (modelo DM3, marca Digimed) foram determinados no início e no final dos bioensaios (Apêndice 1).

5.2.2. Bioensaios para avaliações fisiológicas

Para determinação das análises das respostas fisiológicas nos indivíduos de *R. Natans* foi realizado outros bioensaios, visto que os métodos são destrutivos. Os bioensaios seguiram as mesmas condições e protocolos estabelecidos para o experimento de crescimento (item 5.1.). Para avaliar possíveis alterações, como danos oxidativos, respostas antioxidantes e alterações nos pigmentos fotossintéticos foram determinados: peroxidação lipídica, extravasamento de eletrólitos, clorofilas *a* e *b*, carotenoides, antocianina, flavonoides, catalase e superóxido dismutase. Essas análises foram realizadas a cada sete dias, considerando um tempo total máximo de 21 dias, pois quando houve clorose ou degradação dos tecidos foliares, as análises foram interrompidas.



Figura 2. Bioensaios com *Ricciocarpus natans* expostas a metais: (A) Incubadoras utilizadas para controle de temperatura e iluminação, (B) bioensaios de crescimento com as diferentes concentrações de metais e indivíduos de *R. natans*, 5 repetições, (C) bioensaios de fisiologia com diferentes as diferentes concentrações de metais e indivíduos de *R. natans*, (D) balança utilizada para análise de biomassa da *R. natans*, (E) determinação da largura de *R. natans* através do paquímetro.

5.2.3. Antioxidantes não enzimáticos: flavonoides e antocianinas

Para determinação de antocianinas, as amostras frescas (0,02 g) de *R. natans* foram colocadas em tubos com 5 ml de solução de metanol e ácido clorídrico 99:1 (v/v)], mantidas a 25°C por 24h no escuro e foi realizada leitura em espectrofotômetro-UV (550 nm). Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção $33.000 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (WAGNER, 1979).

O teor de flavonoides foi determinado como descrito por Krizek et al. (1998). As amostras frescas (0,02 g) foram colocadas em tubos com 5 ml de solução de etanol e ácido acético [99:1 (v/v)], por 10 min em banho-maria (Dubnoff, marca Tecnal/TE- 053) a 80 °C e a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-VIS (Ultrospec: 2100 Pro Pharmacia) em três comprimentos de onda: 270, 300 e 330 nm.

5.2.4. Antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutase e catalase

A atividade de superóxido dismutase é avaliada através da habilidade da enzima em inibir a redução fotoquímica do NBT (Nitroblue tetrazolium). A atividade foi

determinada pela adição de 50 ml de extrato bruto a uma solução contendo 13 mM de metionina, 75 mM de NBT, 100 nM de EDTA e 2 mM de riboflavina em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. A reação iniciou pela iluminação dos tubos, por lâmpadas fluorescentes (15 W) a 25° C. Após 30 minutos de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). O composto azul formado (formazana) pela fotoredução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560 nm. Os tubos considerados branco receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos com papel alumínio, com ausência da luz. Para o cálculo da atividade específica da enzima, considerou-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra.

A atividade da enzima catalase foi determinada pelo monitoramento da variação da absorção do peróxido de hidrogênio, conforme Peixoto et al. (1999). A solução de reação consistiu em tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0) e H₂O₂. O ensaio teve início com a adição de 30 µl do extrato enzimático, em cubeta de quartzo e a leitura foi realizada em 240 nm por 1 minuto. A variação na absorbância (ΔA_{240}) foi multiplicada pelo coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (43,6 M⁻¹.cm⁻¹) e a atividade da enzima expressa em mM de H₂O₂ consumido por minuto por miligrama de proteína (mmol H₂O₂.min⁻¹.mg de proteína⁻¹).

5.2.5. Danos oxidativos: peroxidação lipídica e extravasamento de eletrólitos

A peroxidação lipídica em *R. natans* foi medida pela produção de malondialdeído (MDA) (HEATH E PACKER 1969; MEIR et al., 1992). Amostras frescas (0,05 g) foram homogeneizadas em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugadas (centrifuga: marca Heraeus: Megafuge 3.0 R a 6200 G). O sobrenadante gerado foi misturado com 3 ml de TCA 20% contendo 0,5% de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), sendo aquecido em banho maria por 30 min a 96°C. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Ultrospec: 2100 Pro Pharmacia) a 660, 532 e 455 nm para determinar os aldeídos. O coeficiente de absorção não-específica do sobrenadante a 600 nm foi subtraído da absorbância máxima a 532 nm para a determinação do MDA e em 455 nm para outros aldeídos. Para o cálculo do MDA, o coeficiente de extinção usado foi 1,55 x 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹.

O extravasamento de eletrólitos, que são íons presentes no meio intracelular, foi determinado como descrito por Hamed et al. (2007) e Rahman e Hasegawa, (2012). As amostras de plantas (0,05 g) foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de água

ultrapura. Os tubos ficaram a 25°C por 3h e depois foi determinada a condutividade elétrica inicial (CE1) com condutivímetro (modelo DM3, marca Digimed). Então, as amostras foram aquecidas por 20 min a 96°C (em banho Dubnoff, marca Tecnal/TE- 053) para a liberação de todos os eletrólitos. Após o resfriamento, a condutividade elétrica final (CE2) foi determinada. O extravasamento de eletrólitos (EE) foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$EE = (CE1/CE2) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

5.2.6. Pigmentos fotossintéticos

O conteúdo de clorofilas *a* e *b* e carotenoides foram extraídos através de 5 ml de solução de acetona 80% (v/v), carbonato de magnésio e água deionizada. Em seguida, as amostras frescas (0,05 g) foram homogeneizadas com dispersor Ultra Turrax (marca Ika pro Basic) e envolvidas em tubos com papel alumínio, sendo mantidas a 4 °C por 24 h. Após o período de 24 h, foi retirada uma alíquota do sobrenadante para leitura no espectrofotômetro UV-VIS (Ultrospec: 2100 Pro Pharmacia) nas seguintes absorvâncias: 470, 645, 662, 710 nm. Indivíduos de *R. natans* foram colocadas em uma placa de Petri em estufa a 45°C por 24 h e, após serem secas em estufa, foi determinada a biomassa seca dos indivíduos de *R. natans* (LICHTENTHALER, 1987).

5.3. Modelagem matemática

A cinética de crescimento de *R. natans* foi determinada por meio das massas frescas acumuladas durante o período de tempo amostral do estudo, sendo assim ajustadas ao modelo logístico (Equação I; (BIANCHINI et al., 2010)). Os parâmetros cinéticos foram obtidos por regressões não lineares de acordo com o algoritmo iterativo de Levenberg–Marquardt (PRESS et al., 1993).

Os valores máximos de biomassa fresca e largura acumulada dos indivíduos foram determinados por Gimenes, 2020, nos frascos dos bioensaios utilizados no estudo, sendo a capacidade suporte (K) delimitada em 1250 mg para peso e 35 cm para largura em função da área disponível para o crescimento. Os valores de K foram adotados como constante no

modelo (Equação 2) pois o K não foi limitante no experimento atribuindo-se a constante de crescimento (μ) o parâmetro com variação.

Equação 2:

$$\frac{dN}{dt} = \mu \times \left(1 - \frac{N}{K}\right)$$

em que: N = peso (mg) ou largura (cm), μ = coeficiente de crescimento (dia^{-1}), K = biomassa máxima ou largura máxima de *R. natans* no frasco do bioensaio e t = tempo (dia^{-1}).

O tempo de duplicação (td) dos indivíduos foi calculado pela Equação 3:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

O efeito da temperatura no crescimento de *R. natans* foi avaliado pelo coeficiente de temperatura (Q_{10}) (Equação 4). Este coeficiente é determinado por meio da variação da taxa de uma reação fisiológica quando há um aumento de 10 °C na temperatura.

$$Q_{10} = \left(\frac{\mu_2}{\mu_1}\right)^{\frac{10}{t_2 - t_1}}$$

em que: μ_2 = coeficiente de crescimento (dia^{-1}) da maior temperatura (°C), μ_1 = coeficiente de crescimento (dia^{-1}) da menor temperatura (°C), t_2 = tempo (dia^{-1}) da maior temperatura e t_1 = tempo (dia^{-1}) da menor temperatura.

5.4. Análises estatísticas

As normalidades dos dados, tanto de crescimento quanto fisiológicos, foram avaliadas pelo teste Kolmogorov-Smirnov. O teste de normalidade indicou distribuição normal, assim foi realizada a análise de variância Two-way ANOVA com medidas repetidas. Portanto, foi possível determinar a ocorrência ou não de diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre as médias dos grupos tratamentos controle e concentrações dos metais durante o tempo de exposição aos metais. Foi considerando nível de significância de 5,0% ($\alpha = 0,05$).

6. Resultados

6.1. Cinética de Crescimento da *Ricciocarpus natans* submetida a diferentes metais (Cd, Cu e Ni) individuais

Os efeitos das crescentes concentrações de Cd, Cu e Ni sobre o crescimento de *R. natans* são apresentados nas Figuras 3 a 8. Na Figura 3 pode ser observado o crescimento em largura (cm) dos indivíduos *R. natans* expostas ao Cd a 25°C (Figura 3A) e 27°C (Figura 3B). Indivíduos incubados a 25°C apresentaram crescimento no tratamento controle e, também, nos indivíduos expostos as menores concentrações de Cd (0,001 e 0,01 mg/L⁻¹ Cd), sendo estes diferentes estatisticamente ($p > 0,0001$) do tratamento controle a partir do 14º dia (Figura 3A). Na concentração de 0,001 mg/L Cd, os indivíduos *R. natans* mantidos a 27°C apresentou maior crescimento em relação a 25 °C ($p < 0,0001$). Entretanto, na concentração 0,01 e 0,375mg/L Cd, os indivíduos apresentaram um crescimento reduzido a 27°C, sendo diferente ($p < 0,0001$) dos indivíduos que cresceram a 25°C. Com 21 dias de exposição ao Cd tanto a 25°C quanto a 27°C, na concentração de 0,375 mg/L os indivíduos não foram mais mensurados, pois apresentavam total clorose, indicando senescência e morte.

Os indivíduos de *R. natans* expostos ao Cu a 25°C (Figura 3C) nas concentrações 0,002 e 0,009 mg/L apresentaram crescimentos similares aos do tratamento controle, todavia a 27°C (Figura 3D) os indivíduos apresentaram crescimento menor ($p < 0,001$) em relação ao controle a partir do 14º dia. Deste modo, na concentração 0,002 mg/L de Cu 27°C, o crescimento de *R. natans* foi 1,4 vezes menor ($p > 0,0001$) do que os indivíduos a 25°C. Com 7 dias de exposição tanto a 25°C quanto a 27°C, na concentração de 0,385 mg/L de Cu os indivíduos cessaram o crescimento. Assim, no 14º dia a 27 °C não foram mais mensurados, pois apresentavam total clorose.

Indivíduos de *R. natans* submetidos ao Ni 25°C (Figura 3E) e 27°C (Figura 3F) nas concentrações 0,025 e 0,221 mg/L apresentaram redução no crescimento a partir do 14º dia sendo estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$) dos indivíduos controle. Entretanto, a 25°C na concentração 0,002 mg/L de Ni, apresentaram maior crescimento ($p < 0,0001$) a partir do 7º dia em relação a 27°C.

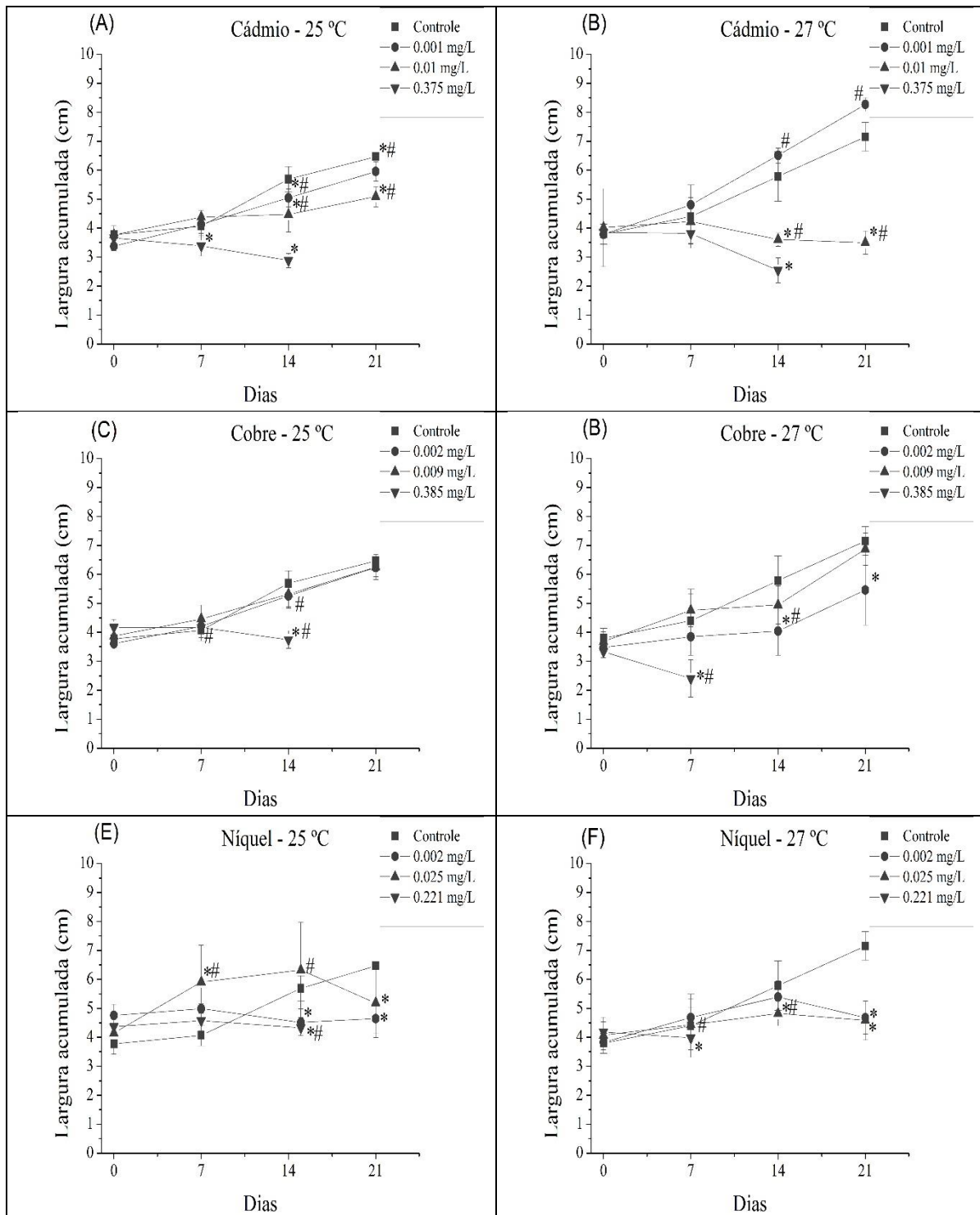


Figura 3. Largura acumulada (cm) em *Ricciocarpus natans* expostos: (A) Cádmiu e 25°C, (B) Cádmiu e 27°C, (C) Cobre e 25°C, (D) Cobre e 27°C, (E) Níquel e 25°C e (F) Níquel e 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

Na Figura 4 é apresentado o aumento em biomassa (g) dos indivíduos *R. natans* nas duas temperaturas (25°C e 27°C). Indivíduos submetidos a 0,001 mg/L de Cd a 25°C por 21 dias (Figura 4A) e 27°C (Figura 4B) apresentaram crescimento 1,3 vezes maior em relação ao tratamento controle ($p < 0,0001$). Entretanto, os indivíduos expostos a 0,01 e 0,375 mg/L de Cd a 25°C no 14º dia tiveram menor crescimento ($p < 0,0001$) em relação ao controle.

Os indivíduos de *R. natans* expostos ao Cu 25°C (Figura 4C) nas 3 concentrações apresentaram os menores valores ($p < 0,005$) de crescimento com 14 dias de exposição em relação ao controle. Os valores da biomassa de *R. natans* na concentração 0,002 e Cu a 27°C (Figura 4D) são inferiores aos valores a 25°C nesta concentração ($p < 0,005$). Nos indivíduos submetidos ao Cu a 27°C (Figura 4D) nas concentrações 0,002 e 0,385 mg/L apresentaram menores crescimentos dos indivíduos controle ($p < 0,0005$).

Os indivíduos *R. natans* expostos ao Ni a 25°C (Figura 4E) em 0,002 mg/L mostraram reduções nos crescimentos a partir do 14º dia sendo significativamente distinto ($p < 0,0001$) do controle. Indivíduos *R. natans* mantidos a 0,025 mg/L de Ni e 25°C apresentaram crescimento significativamente maior ($p < 0,0001$) dos que os indivíduos a 27°C (Figura 4F) por 14 dias de exposição. A *R. natans* expostas as 3 concentrações de Ni a 27°C apresentaram valores significativamente menores ($p < 0,0001$) em relação ao controle. Com 21 dias de exposição ao Ni tanto a 25 quanto a 27°C, na concentração 0,221 mg/L os indivíduos não foram mais mensurados, pois apresentava total clorose, indicando possível morte.

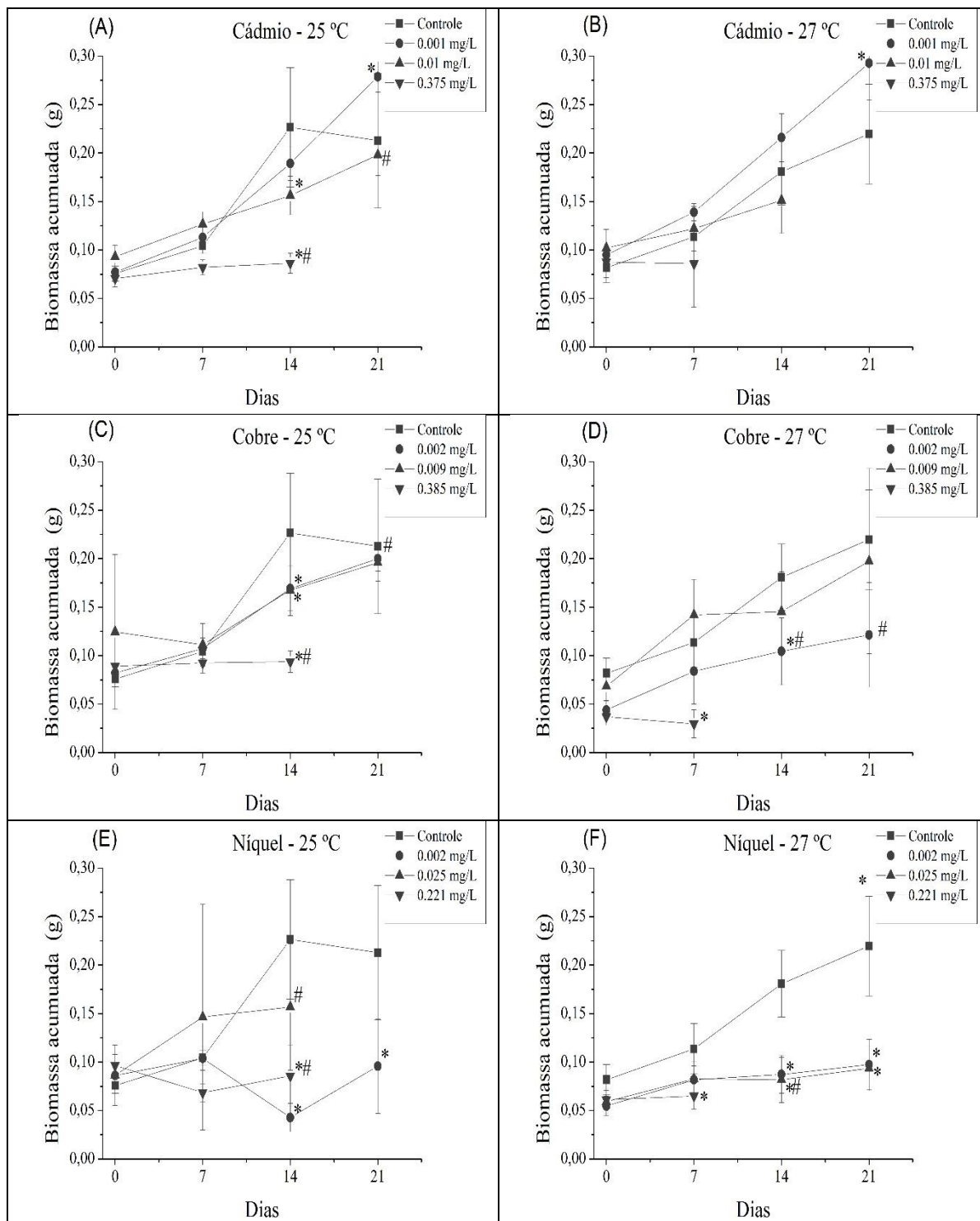


Figura 4. Biomassa acumulada (g) em *Ricciocarpus natans* expostos: (A) Cádmio a 25°C, (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

Na Tabela 3 são apresentados os valores dos coeficientes de crescimento (μ dia⁻¹) em função da largura acumulada (cm) de *R. natans* cultivadas com adição de Cd, Cu e Ni a 25°C e 27°C. Os indivíduos expostos aos metais Cd, Cu e Ni a 25°C apresentaram valores de μ abaixo do calculado para o grupo controle. Além disso, ocorreu maior redução dos valores de μ com aumento das concentrações dos metais a 25°C. Os valores de μ estão relacionados ao tempo de duplicação (td) do tamanho em largura (cm) da *R. natans*. Os indivíduos expostos aos metais apresentaram maiores valores de td chegando a 3 vezes mais que o tempo estimado para o grupo controle a 25°C.

No bioensaio a 27°C apenas o grupo exposto a 0,001mg/L de Cd apresentou o valor de μ maior que o controle. O coeficiente de determinação (r^2) para o ajuste de crescimento de *R. natans* submetidas a Cd e Cu foram próximos a 1,00, porém o grupo exposto a Ni apresentaram o (r^2) abaixo de 0,62. O coeficiente de temperatura (Q_{10}), no tratamento controle foi 1,89, os indivíduos do tratamento de 0,001 mg/L de Cd obtiveram valor 3,6 vezes maior que o controle. Entretanto bioensaios com alguns metais não foi possível calcular o Q_{10} , pois não houve incremento de largura.

Tabela 3. Constante de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), coeficiente de determinação (r^2) e Q_{10} calculados para largura acumulada de *Ricciocarpus natans* em função a exposição de diferentes concentrações de metais (Cd, Cu e Ni) nas temperaturas de 25 e 27 °C

Tratamento	25°C			27°C			Q_{10}
	μ	r^2	td (dias)	μ	r^2	td (dias)	
Controle	0,033	0,95	21,12	0,037	0,99	18,60	1,89
0,001 mg/L Cd	0,031	1,00	22,36	0,046	1,00	15,23	6,83
0,01 mg/L Cd	0,015	0,94	46,22	0,00		0,00	
0,375 mg/L Cd	0,00			0,00		0,00	
0,002 mg/L Cu	0,031	1,00	22,28	0,025	0,87	27,90	0,32
0,009 mg/L Cu	0,027	1,00	25,46	0,033	0,92	20,86	2,71
0,385 mg/L Cu	0,00			0,00		0,00	
0,002 mg/L Ni	0,00			0,011	0,41	63,55	
0,025 mg/L Ni	0,011	0,24	64,73	0,007	0,62	100,24	0,11
0,221 mg/L Ni	0,00			0,00		0,00	

Os ajustes cinéticos de crescimento em biomassa (g) de *R. natans* apresentaram coeficientes de determinação (r^2) em geral maiores que 0,8 (Tabela 4). Em geral, os valores de μ diminuíram quando aumentadas as concentrações de metais, chegando a não apresentar crescimento em algumas concentrações. Entretanto, houve uma exceção para os indivíduos expostos a 0,001 mg/L de Cd a 25°C e 27°C. O μ ($\mu \text{ dia}^{-1}$) para o bioensaio com 0,001 mg/L de Cd, foi até 1,35 vezes maior que o controle, apresentando o td menor (1,36 vezes) que o controle. Os valores de μ nos grupos expostos as demais concentrações de Cd, Cu e Ni foram até 2,21 vezes menores que o valor de μ do grupo controle (0,053). Dessa forma, o td (Tabela 4) para estes bioensaios foi até 2,74 vezes maior que os bioensaios controles. O coeficiente de temperatura (Q_{10}) no tratamento controle foi 1,03, nos indivíduos expostos aos metais só foi possível calcular em 0,001 mg/L de Cd e 0,002 e 0,009 mg/L de Cu, com este último tratamento alcançando 5,8 vezes mais que o controle. Para os tratamentos com Ni não foi possível calcular o coeficiente de temperatura (Q_{10}), pois não houve incremento da biobiomassa nos tratamentos à 25 °C.

Tabela 4. Constante de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), coeficiente de determinação (r^2) e Q_{10} em *Ricciocarpus natans* calculados pela biomassa em função a exposição de diferentes concentrações de metais (Cd, Cu e Ni) nas temperaturas de 25 e 27 °C

Tratamento	25°C			27°C			Q_{10}
	μ	r^2	Td (dias)	μ	r^2	td (dias)	
Controle	0,053	0,77	13,08	0,053	0,97	13,2	1,03
0,001 mg/L Cd	0,072	1,00	9,59	0,063	1,00	11,07	0,49
0,01 mg/L Cd	0,039	1,00	17,70	0,00			
0,375 mg/L Cd	0,00			0,00			
0,002 mg/L Cu	0,048	0,97	14,44	0,042	0,90	16,56	0,50
0,009 mg/L Cu	0,031	0,84	22,49	0,044	0,87	15,68	6,06
0,385 mg/L Cu	0,00			0,00			
0,002 mg/L Ni	0,00			0,024	0,86	28,34	
0,025 mg/L Ni	0,000			0,019	0,81	36,17	
0,221 mg/L Ni	0,00						

6.2. Respostas fisiológicas de *Ricciocarpus natans* a submetidas a diferentes metais (Cd, Cu e Ni) individuais

Os efeitos das crescentes concentrações de Cd, Cu e Ni sobre os parâmetros fisiológicos em *R. natans* são apresentados nas Figuras 5 a 10.

6.2.1. Antioxidantes não enzimáticos em *Ricciocarpus natans* submetidos a diferentes metais (Cd, Cu e Ni) e temperatura

Na Figura 9 podem ser observado os valores de antocianinas em função da exposição aos metais em 25 e 27°C. Nas Figuras 5A e 5B, os indivíduos de *R. natans* com 14 dias de exposição ao Cd apresentaram redução da antocianina em relação ao tratamento controle, sendo significativamente diferentes ($p < 0,001$).

Os indivíduos *R. natans* expostos ao Cu a 25°C (Figura 5C) com 7 dias de exposição às menores concentrações apresentaram aumento de até 2,3 vezes nos valores de antocianinas em relação ao tratamento controle ($p < 0,0001$). Entretanto, indivíduos *R. natans* expostos ao Cu 27°C (0,385 m/L) (Figura 5D) por 7 dias e 14 apresentaram redução das concentrações de antocianinas de até 1,75 vezes em relação ao controle. Dessa forma, houve diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os tratamentos com Cu 25°C (Figura 5C) e 27°C (Figura 5D).

Os indivíduos submetidos as concentrações de Ni a 25°C (Figura 5E) com 14 dias de exposição apresentaram aumento de 1,3 vezes nos valores de antocianinas em relação ao controle ($p < 0,0001$). Todavia, os indivíduos de *R. natans* submetidos ao Ni a 27°C (Figura 9F) por 7 dias apresentaram considerável aumento de 3,1 vezes das concentrações de antocianinas em relação ao controle ($p < 0,0001$). Desta forma, foi detectada diferença significativa ($p < 0,0001$) entre indivíduos expostos por 7 dias as concentrações de Ni tanto a 25°C (Figura 5E) e quanto a 27°C (Figura 5F).

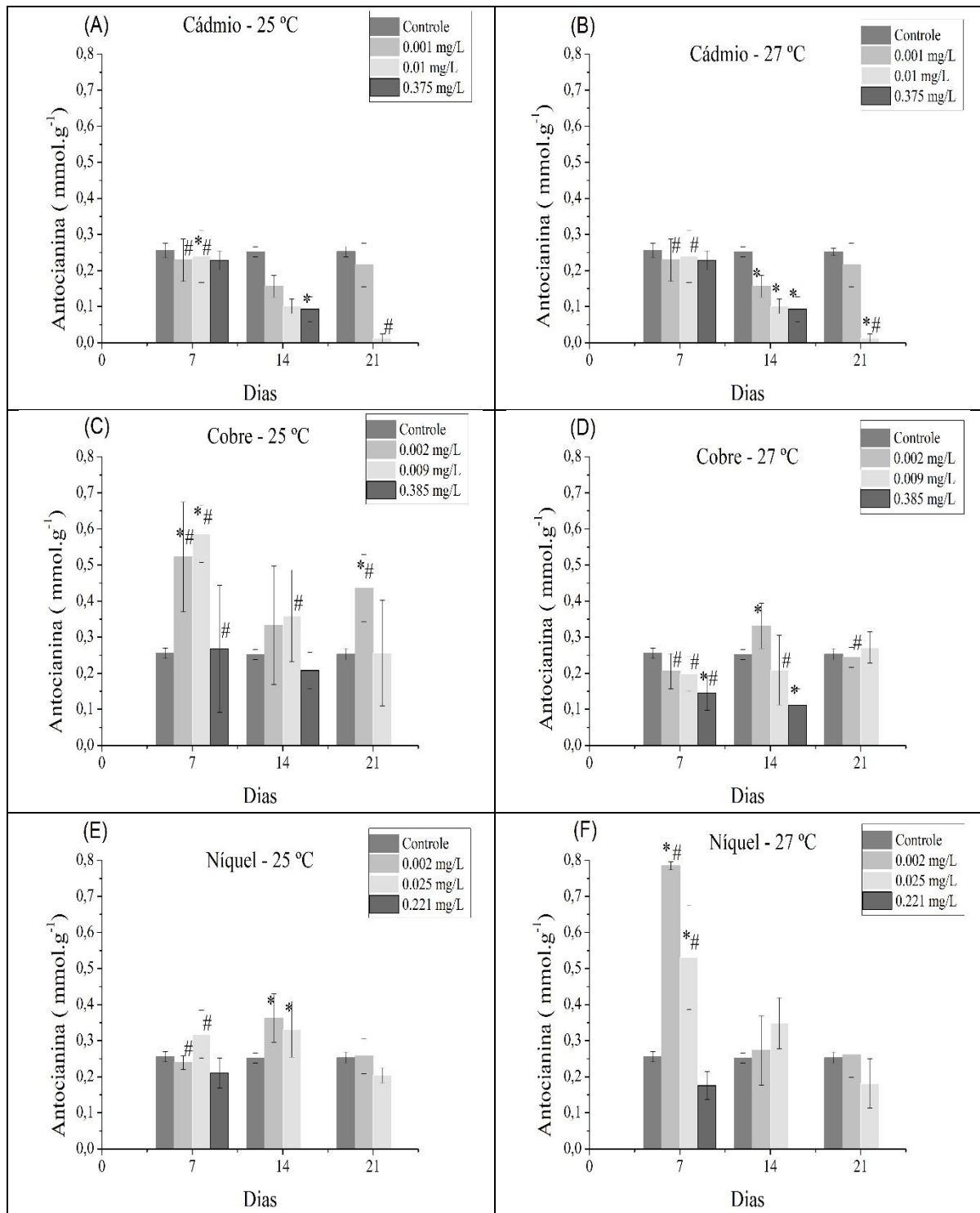


Figura 5. Antocianinas (mmol. g⁻¹) na biomassa de *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

Os indivíduos de *R. natans* submetidos às concentrações de 0,001 e 0,1 mg/L de Cd por 7 dias apresentaram um aumento de flavonoides e diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle, tanto a 25°C (Figura 6A) quanto a 27°C (Figura 6B). Porém, os valores sob ambas temperaturas foram distintos ($p < 0,0001$), sendo que a maior produção de flavonoides ocorreu a 25°C. Com 14 dias de exposição a 0,001 e 0,1 mg/L de Cd a 25°C indivíduos (Figura 6A) apresentaram aumento de até 3,8 vezes em relação ao controle ($p < 0,0001$), sendo estatisticamente diferente dos indivíduos a 27°C (Figura 6B).

Durante a exposição de *R. natans* ao Cu a 25°C por 14 dias (Figura 6C), conforme aumentou a concentração de cobre houve aumento de até 3,6 vezes de flavonoides em relação ao tratamento controle ($p < 0,0001$). Entretanto, os indivíduos expostos a 25°C e 27°C por 14 dias apresentaram valores diferentes ($p < 0,001$) entre si.

Os indivíduos de *R. natans* apresentaram redução na produção de flavonoides durante a exposição ao Ni a 25°C (Figura 6E) por 7 dias, diferenciando estatisticamente ($p < 0,0001$) dos indivíduos controle. Da mesma forma, os indivíduos expostos a Ni a 27°C (Figura 6F) por 7 dias diferiram dos indivíduos expostos ao Ni a 25°C (Figura 6E).

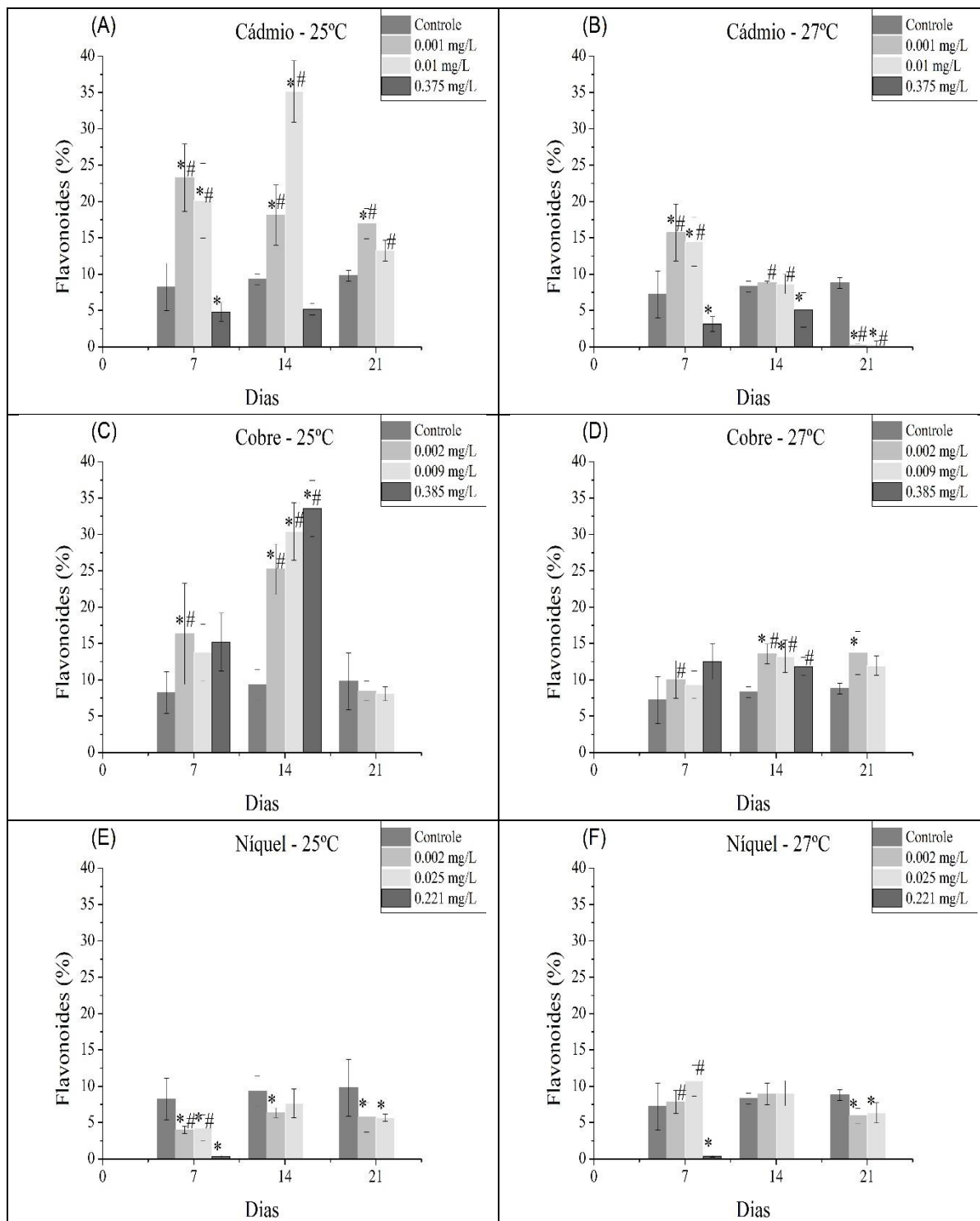


Figura 6. Flavonoides (%) em *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.2.2. Antioxidantes enzimáticos em *Ricciocarpus natans* submetida a diferentes metais (Cd, Cu e Ni) e temperaturas

As atividades enzimáticas antioxidantes da SOD e catalase são apresentadas nas Figuras 7 e 8, respectivamente. A atividade da SOD (Figura 7) apresentou aumento ($p < 0,001$) nos grupos expostos a Cu e Ni nas temperaturas de 25°C e 27°C em relação ao grupo controle durante o período de estudo. Os indivíduos expostos a 0,001 e 0,01 mg/L Cd a 25°C (Figura 12A) e 27°C (Figura 12B) por 7 dias apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$), porém com 14 dias de exposição observou-se um decréscimo de 4,3 vezes na atividade de SOD.

Em geral, a atividade da catalase (Figura 8) foi significativamente menor nos grupos expostos aos metais em relação ao grupo controle, tanto em 25°C quanto a 27°C. Contudo, houve exceção para os indivíduos expostos a 0,001 mg/L de Cd a 25°C por 7 dias e 14 dias (Figura 13A), a 0,002 mg/L de Ni a 27°C por 7 dias (Figura 11F) e a 0,009 mg/L de Cu a 25 °C por 21 dias (Figura 11C) estes apresentaram maior atividade ($p < 0,0001$) da enzima comparado ao grupo controle

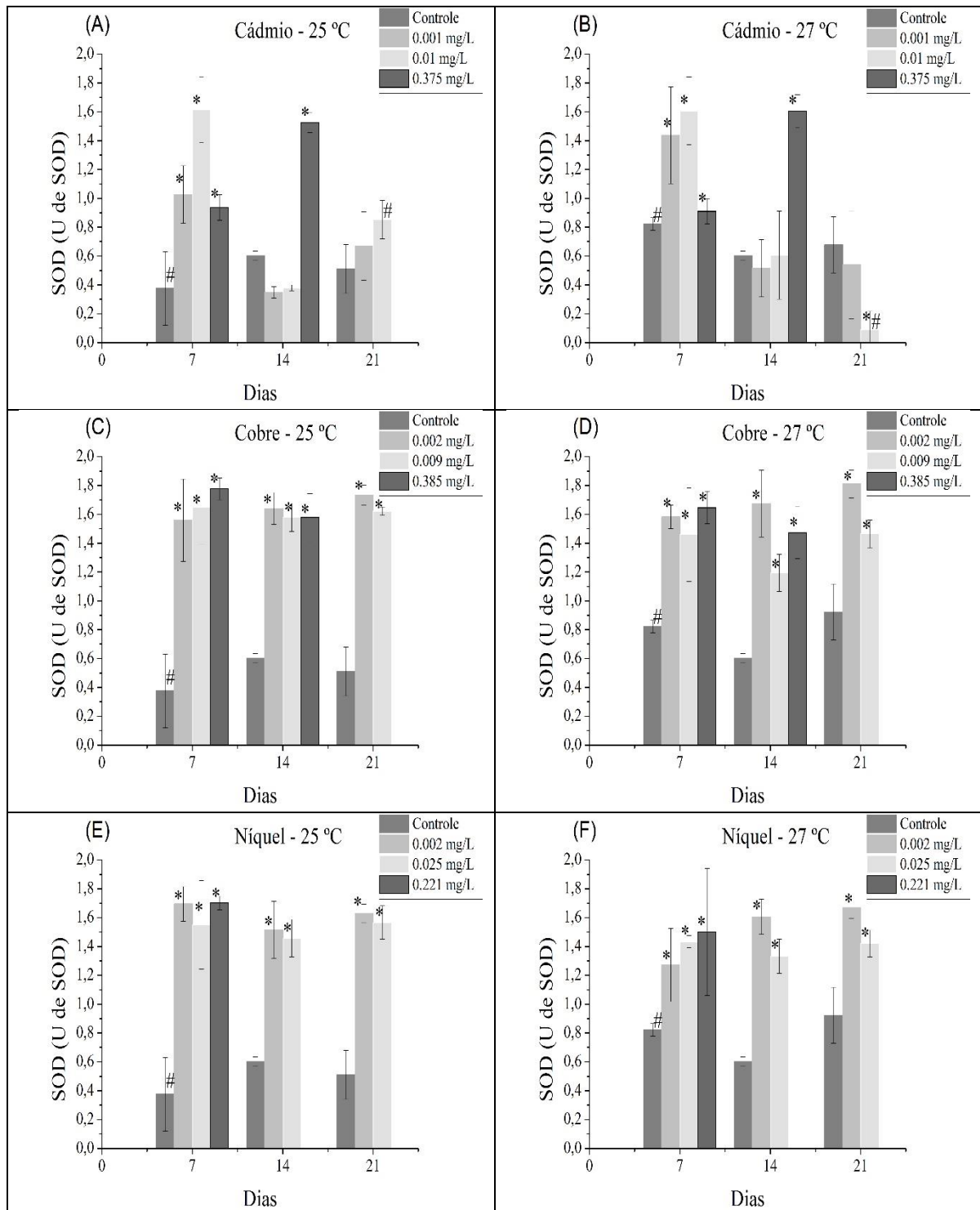


Figura 7. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em *Ricciocarpus natans* submetidas a diferentes concentrações e temperaturas: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

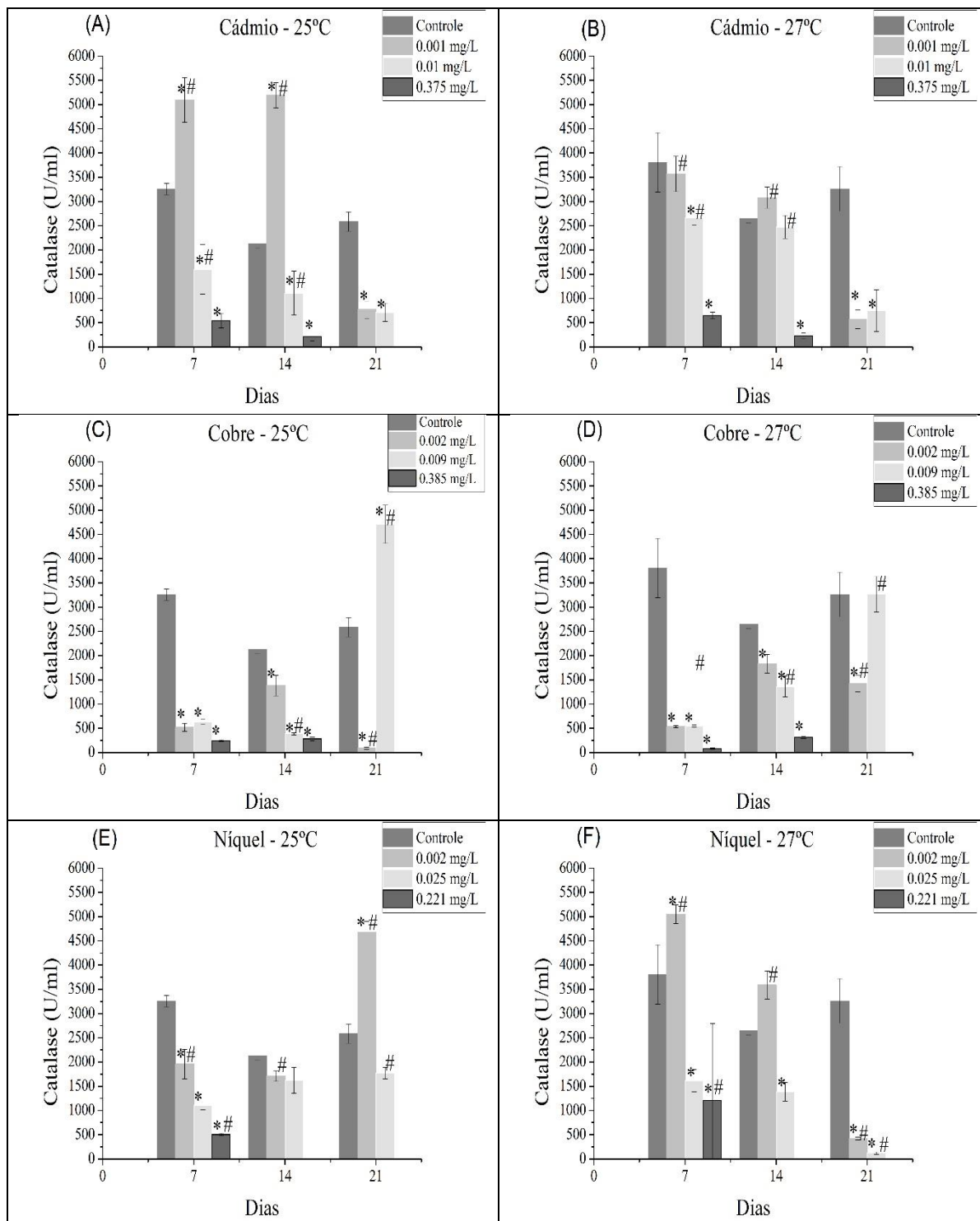


Figura 8. Atividade da catalase em *Ricciocarpus natans* submetidas a diferentes concentrações e temperaturas: (A) Cádmiu a 25°C (B) Cádmiu a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.2.3. Danos oxidativos em *Ricciocarpus natans* submetidas diferentes metais (Cd, Cu e Ni) e temperaturas

A peroxidação lipídica, representada neste estudo por malondialdeído (MDA) nos indivíduos de *R. natans* submetidos a 0,001 e 0,01 mg/L de Cd 25°C (Figura 9A) por 7 dias apresentou redução dos valores em até 3,7 vezes ($p < 0,001$) em relação aos indivíduos que cresceram no tratamento controle. Com 14 e 21 dias de exposição a 0,01 mg/L de Cd a 25°C (Figura 9A) houve um aumento nos valores de MDA diferenciando dos indivíduos controle ($p < 0,001$). Em relação aos indivíduos de *R. natans* expostos ao Cd a 27°C (Figura 9B) estes não diferiram quanto ao controle, entretanto apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,001$) dos indivíduos submetidos a Cd 25°C (Figura 9A).

R. natans submetidas a 0,002, 0,009 e 0,385 mg/L de Cu por 7 dias tiveram aumento na produção de MDA em comparação ao controle ($p < 0,0001$). Com 14 dias de exposição a 0,002, 0,009 mg/L de Cu *R. natans* teve redução na produção de MDA, e manteve a redução até o 21º dia. Entretanto na concentração de 0,385 mg/L de Cu houve aumento de MDA, mas com 21 dias de exposição não foi possível determinar.

Os indivíduos expostos a 0,002 e 0,025 mg/L Ni 25°C (Figura 9E) a 7, 14 e 21 dias apresentaram aumento nos valores de MDA relacionando aos indivíduos controle ($p < 0,0001$). No experimento com Ni a 27°C (Figura 9F), os indivíduos expostos a 0,002 e 0,025 mg/L de Ni 27°C a 7 e 21 dias, apresentaram valores com aumento de até 12,9 vezes em relação aos indivíduos do tratamento controle ($p < 0,0001$). Em relação a diferentes temperaturas 25 e 27°C os indivíduos submetidos a 0,002 e 0,025 mg/L de Ni a 25°C (Figura 9E) por 14 dias apresentaram maiores valores significativamente diferentes em relação a 0,002 e 0,025 mg/L de Ni a 27°C.

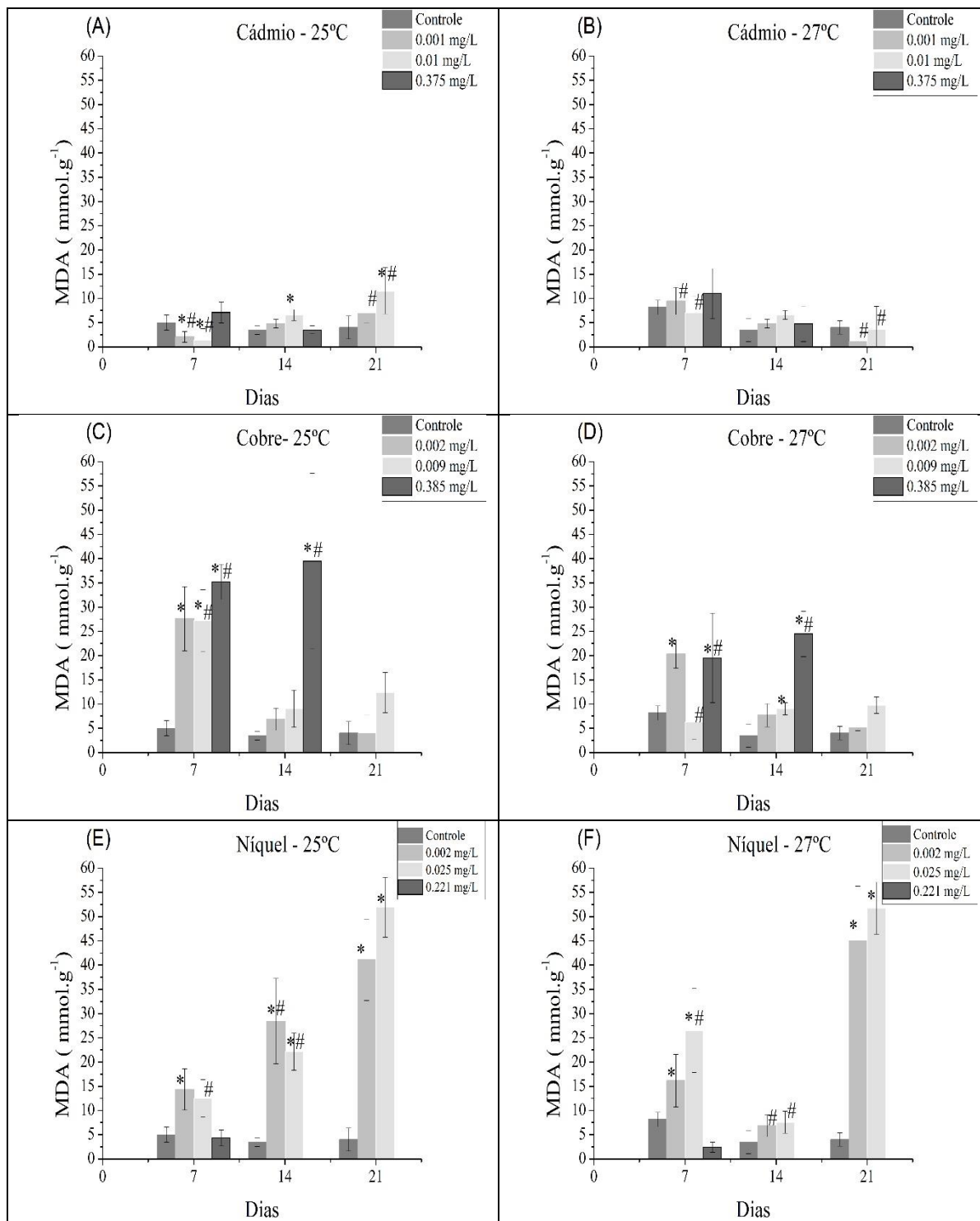


Figura 9. Malondialdeído (MDA) em *Ricciocarpus natans* expostas: a (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

O extravasamento de eletrólitos nos indivíduos de *R. natans* submetidos as menores concentrações (0,001 e 0,01 mg/L) Cd a 25°C (Figura 10A) apresentou aumento com o tempo de exposição, sendo observada diferença significativa na concentração 0,01 mg/L Cd em relação ao controle. O mesmo foi observado nos indivíduos expostos ao Cd a 27°C(10B). Com 14 dias de exposição a 0,375 mg/L de Cd o valor foi maior 6,8 vezes em relação aos indivíduos controle ($p < 0,0001$). Os indivíduos expostos a 0,375 mg/L de Cd a 25°C por 14 dias o valor diferiu em 2 vezes maior ($p < 0,0001$).

Os valores de extravasamento de eletrólitos em *R. natans* expostas ao Cu a 25°C (10C) apresentaram acréscimo nos valores com o aumento das concentrações e ao longo do tempo de exposição. Indivíduos expostos a concentração 0,385 mg/L de Cu a 25° por 14 dias apresentaram valores significativamente diferentes em relação ao controle. No tratamento com adição de Cu a 27°C (Figura 10D), a *R. natans* apresentou maiores valores com 14 e 21 dias de exposição comparando aos indivíduos controle ($p < 0,0001$). Indivíduos expostos as concentrações 0,002 e 0,009 mg/L de Cu a 27°C por 14 e 21 dias apresentaram valores superiores e diferentes significativamente ($p < 0,001$) em relação a indivíduos expostos a essas mesmas concentrações a 25°C.

Indivíduos *R. natans* submetidos a 0,002 e 0,025 mg/L de Ni com 7 dias de exposição apresentaram aumento em relação ao controle ($p < 0,005$), entretanto com 14 dias houve redução do extravasamento de eletrólitos. Com 21 dias de exposição a 0,002 e 0,025 mg/L de Ni houve aumento significativo dos valores em relação ao controle ($p < 0,0001$), tanto a 25 quanto a 27 °C. Na concentração de 0,221 mg/L de Ni somente foi possível verificar até o 7° dia de exposição, apresentando aumento em relação ao controle.

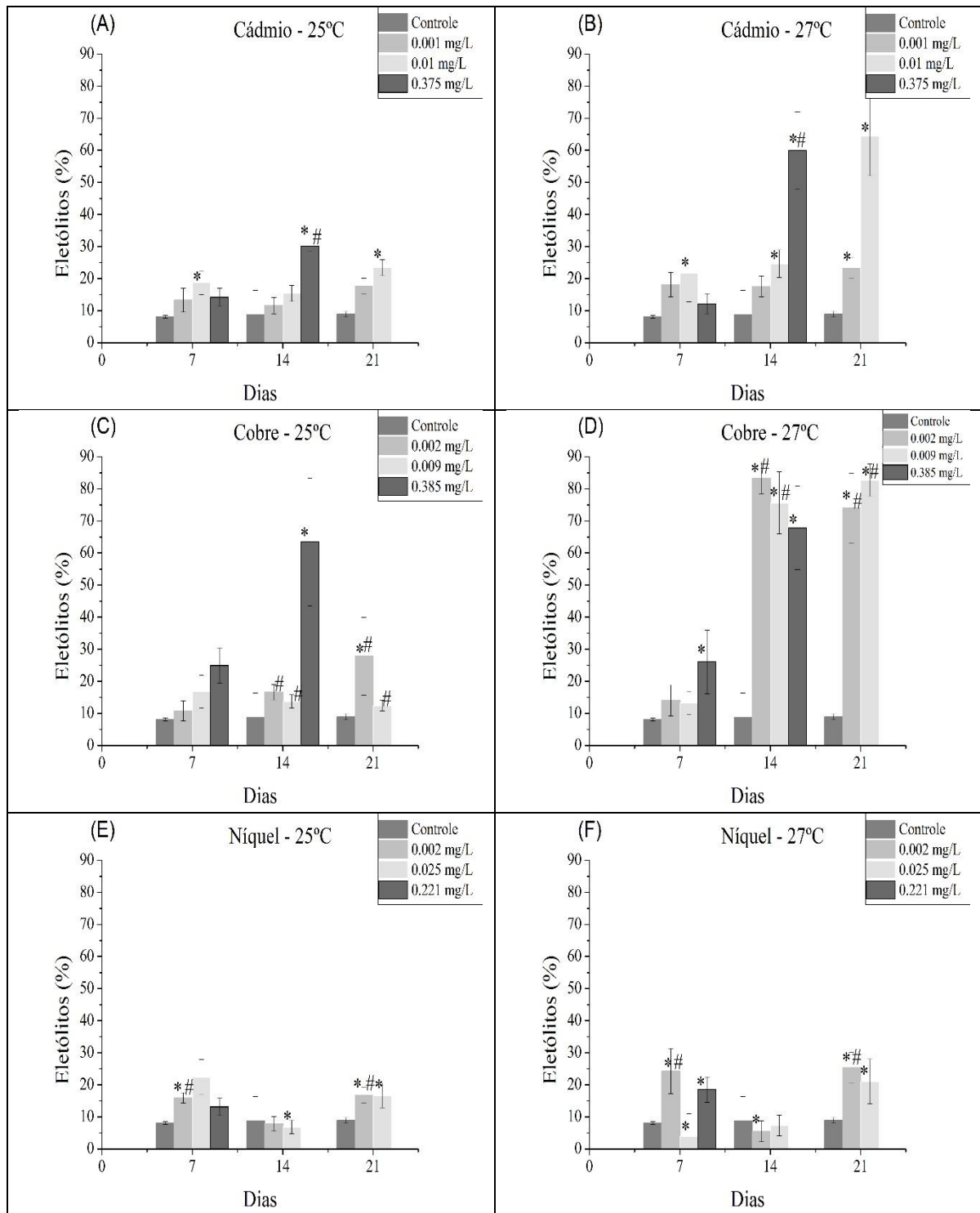


Figura 10. Extravasamento de eletrólitos em *Ricciocarpus natans* expostas a: (A) Cádmio a 25°C (B) Cádmio a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.2.4. Pigmentos fotossintéticos em *Ricciocarpus natans* submetida a diferentes metais (Cd, Cu e Ni) e temperatura

As análises das atividades dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides em *R. natans* expostas aos metais Cd, Cu e Ni estão apresentadas nas Figuras 15, 12 e 13, respectivamente. Os pigmentos clorofila *a* e *b* em indivíduos *R. natans* submetidos a concentração 0,001 mg/L de Cd aumentaram com 14 dias de exposição a 25°C, entretanto houve um decréscimo na produção dos indivíduos submetidos a concentrações 0,01 e 0,375 mg/L Cd a 25°C. Os indivíduos expostos a 0,001 e 0,01 mg/L de Cd a 27°C diferiram, apresentando aumento na produção de clorofila *a* e *b* a partir do 7º dia de exposição, mantendo a síntese estável em relação ao grupo controle.

As concentrações de 0,002 e 0,009 mg/L de Cu a 25°C interferiu de modo negativo na produção de pigmentos de *R. natans* a partir do 14º dia de exposição, ocorrendo um decréscimo significativo ($p < 0,0001$), porém a 27°C *R. natans* apresentou aumento nas concentrações de pigmentos diferenciando significativamente ($p < 0,0001$).

Os pigmentos fotossintéticos apresentaram maior concentração nos indivíduos expostos a 0,002 e 0,025 mg/L de Ni em 25 e 27°C (Figura 11E, 11F, 12E,12F e 12E,12F) e suas concentrações se mantiveram estáveis durante o período de análise.

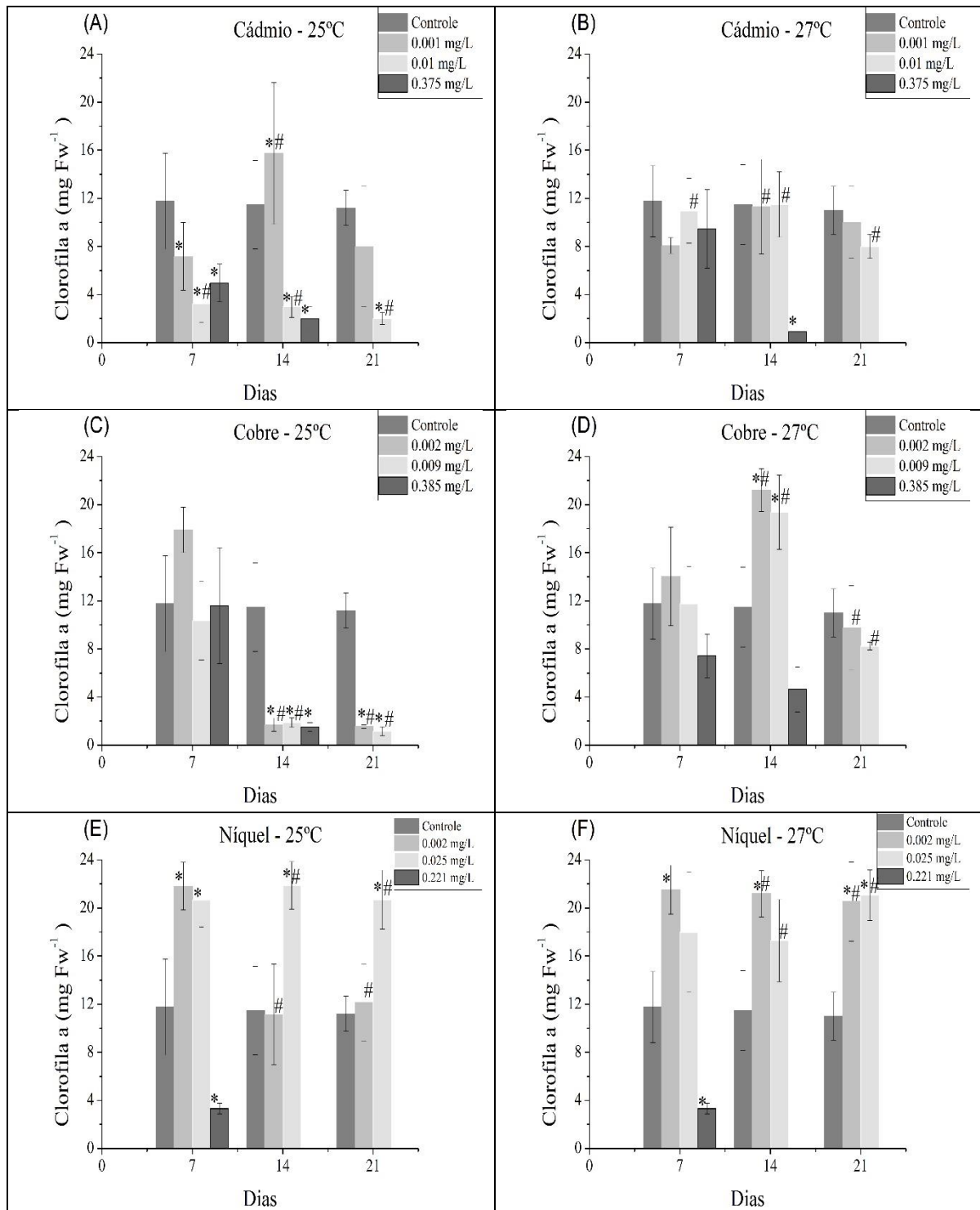


Figura 11. Produção de clorofila a em *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmiu a 25°C (B) Cádmiu a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

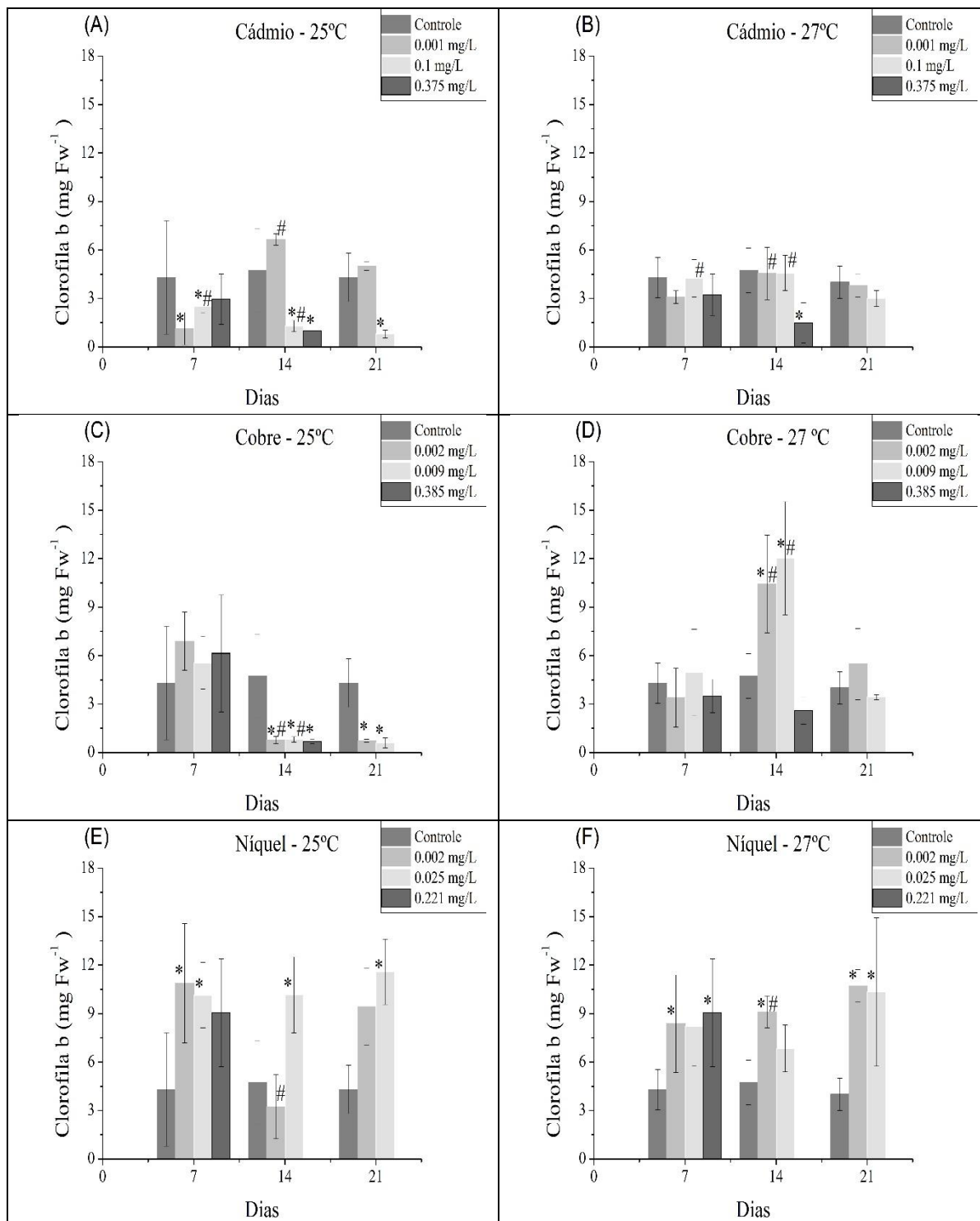


Figura 12. Produção de clorofila b em *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmió 25°C (B) Cádmió a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

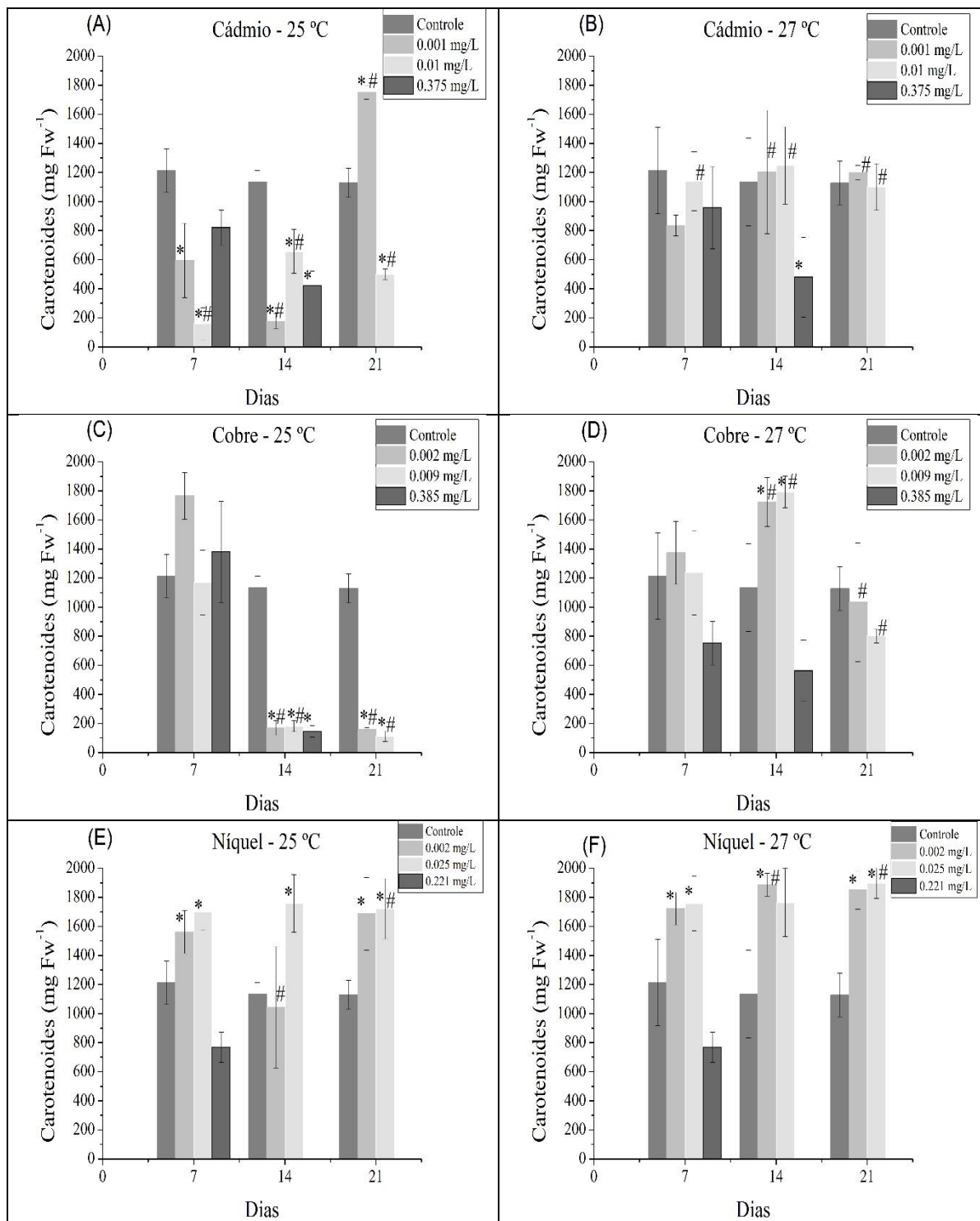


Figura 13. Produção de carotenoides em *Ricciocarpus natans* expostas ao: (A) Cádmiu a 25°C (B) Cádmiu a 27°C, (C) Cobre a 25°C, (D) Cobre a 27°C, (E) Níquel a 25°C e (F) Níquel a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição

6.3. Cinética de crescimento em *Ricciocarpus natans* submetida a combinações de metais e diferentes temperaturas

Nas Figuras 14 e 15 são apresentadas, respectivamente, a largura acumulada (cm) e biomassa acumulada (g) de *R. natans* expostas as interações de metais (Cd + Cu + Ni) nas concentrações permitidas pelo Conama 357/05, Diretriz Canadense de Qualidade da Água (CWQG) e encontrada em amostras de vinhaça. Observou-se que em nenhuma interação houve crescimento dos indivíduos, tanto em largura quanto em biomassa, portanto, não foi possível, assim obter a constante de crescimento. Os indivíduos expostos a interações de metais tiveram seu crescimento avaliado apenas até o 7º dia de experimento, pois neste tempo de exposição foi notado total clorose e necrose nos tecidos das plantas. Em geral, todas interações, tanto a 25°C quanto a 27°C, diferiram significativamente ($p < 0,0001$) do grupo controle. Nas concentrações de interações baseadas no Conama 357/05 (Figuras A e B) e vinhaça (Figuras E e F) houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os tratamentos submetidos a 25°C e 27°C.

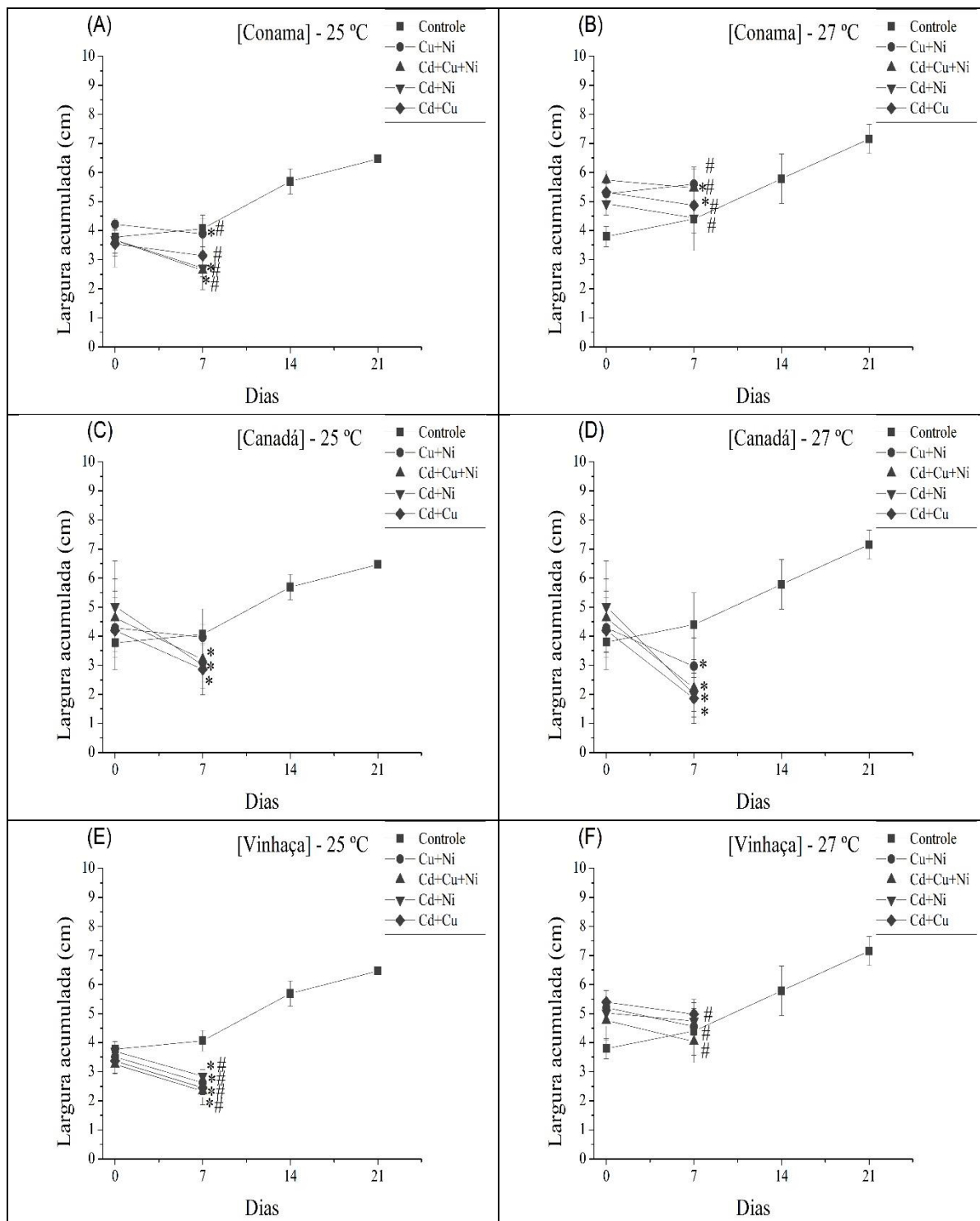


Figura 14. Largura acumulada (cm) em *Ricciocarpus natans* expostas a combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

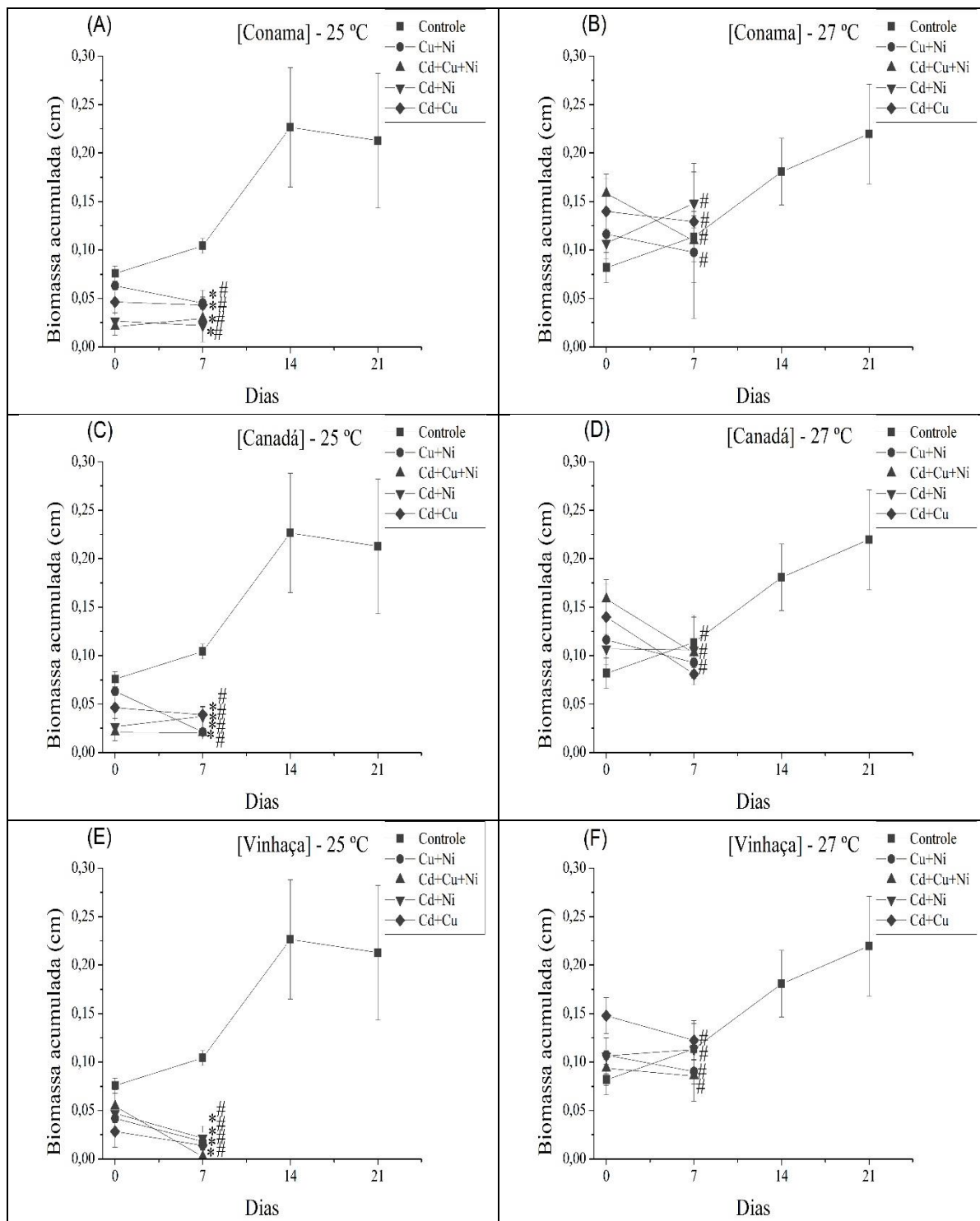


Figura 15. Biomassa acumulada (g) em *Ricciocarpus natans* exposta a combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.4. Respostas fisiológicas em *Ricciocarpus natans* submetida a combinações de metais e diferentes temperaturas

As análises fisiológicas dos indivíduos *R. natans* expostos a interações de metais foram realizadas até o 7º dia, pois a partir desse período, foi observada clorose e necrose dos tecidos dos indivíduos (Figuras 16-21).

6.4.1. Antioxidantes não enzimáticos em *Ricciocarpus natans* submetida a combinações de metais e temperaturas

Os conteúdos de antocianinas e flavonoides estão representados, respectivamente, nas Figuras 16 e 17. Em indivíduos expostos aos metais (Cd, Cu e Ni) nas concentrações permitidas pelo CONAMA 357/05 e pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (CWQG) apresentaram aumento da produção de antocianinas e flavonoides em relação ao controle tanto a tratamentos a 25°C (Figuras 16A, 16C, 17A, 17C) quanto a 27°C (Figuras 16B, 16D, 17B e 17D), na maioria a 27°C os valores foram estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$) dos valores controle.

Indivíduos expostos a metais a 25°C (Figuras 20E) nas concentrações encontradas na vinhaça apresentaram aumento na antocianina nos tratamentos Cu + Ni (1,18 vezes) e Cd + Cu + Ni (1,15 vezes) em relação ao controle ($p < 0,001$). Entretanto nos tratamentos Cd + Cu e Cd + Ni apresentaram redução de 5,1 e 127,7 vezes, respectivamente, em relação ao tratamento controle ($p < 0,0001$). Indivíduos expostos a 27°C nas concentrações encontradas na vinhaça (Figura 20F) apresentaram decréscimo nos valores de antocianinas e flavonoides em relação ao controle sendo diferentes ($p < 0,0001$), deste modo os valores de 27°C foram diferentes ($p < 0,0001$) dos valores obtidos a 25°C.

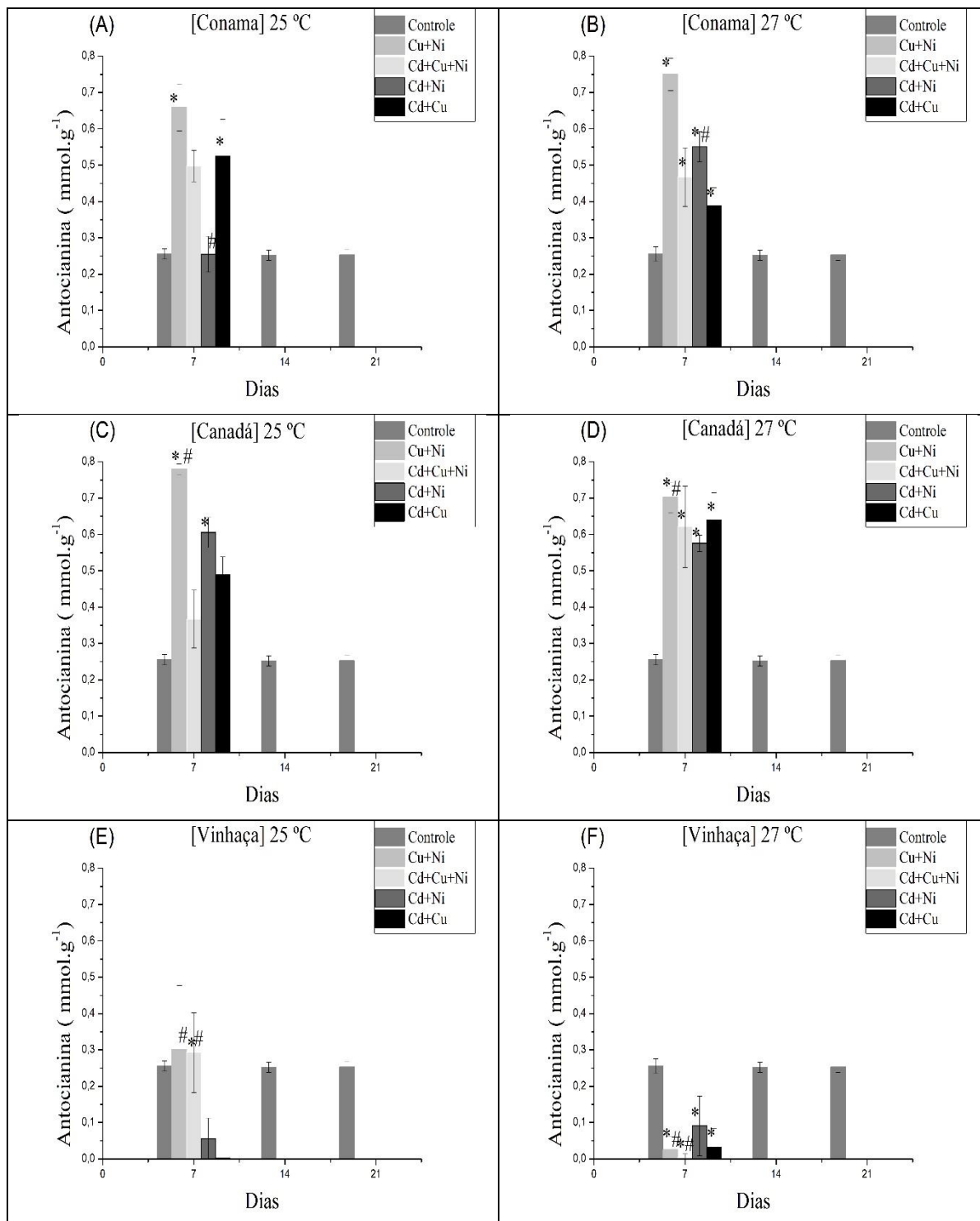


Figura 16. Antocianinas (mmol.g⁻¹) em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo Conama Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

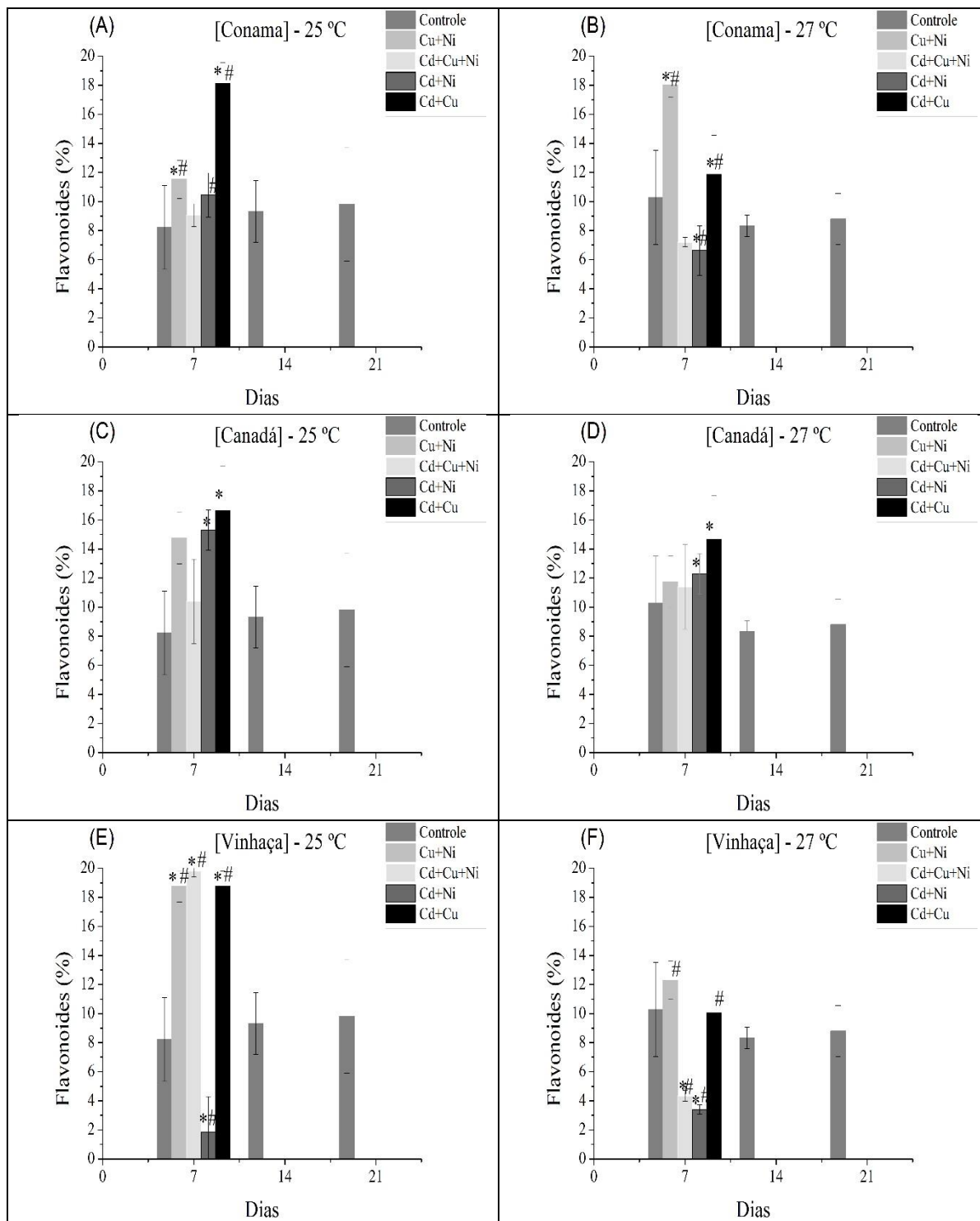


Figura 17. Flavonoides (%) em *Ricciocarpus natans* exposta as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo Conama Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.4.2. Antioxidantes enzimáticos em *Ricciocarpus natans* submetida a combinações de metais e diferentes temperaturas

A enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou aumento na atividade (Figura 18) em todos tratamentos nos indivíduos expostos a interações de metais em relação ao controle ($p < 0,001$). Quando expostos a Cd+Cu+Ni a 27°C [Conama] observou-se um aumento da atividade da SOD em relação ao controle, e a 25°C o maior aumento da SOD foi de 3,98 no grupo Cd+Cu+Ni em relação ao grupo controle. No tratamento controle, a atividade de SOD se manteve estável durante o período de análise, entretanto apresentou maiores valores ($p < 0,0001$) no controle a 27°C em relação ao controle 25°C.

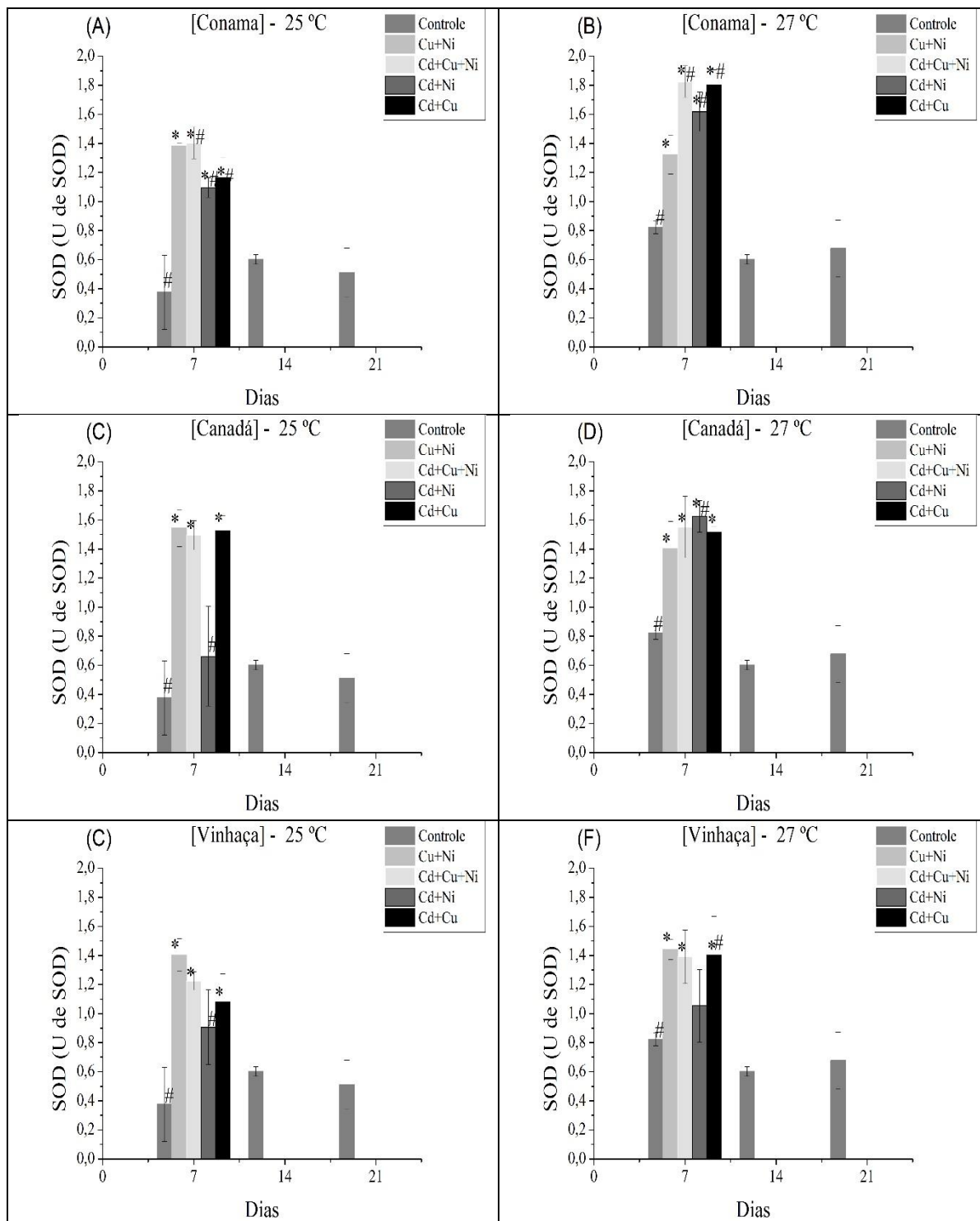


Figura 18. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

A atividade enzimática de catalase (Figura 19) em indivíduos *R. natans* expostos a interações de metais (Cd, Cu e Ni) em diferentes concentrações, no geral, diferiram entre as temperaturas, não havendo um padrão de resposta quanto as interações. Indivíduos expostos a [CONAMA] apresentaram redução da catalase em comparação controle ($p < 0,0001$), porém a interação Cu+Ni apresentou aumento da catalase ($p < 0,0001$). Entretanto, *R. natans* a 27°C na [CONAMA] (Figura 19A) apresentou aumento na interação Cd+Cu em relação ao controle ($p < 0,0001$). Na interação dos metais na concentração permitida pelo Canadá (CWQG) a 25°C, a interação Cd+Ni (Figura 22C) apresentou aumento de 1,25 vezes quanto ao controle ($p < 0,0001$), já a 27°C todas interações apresentaram menores valores de catalase em relação ao controle ($p < 0,0001$). Na Figura 19E e 19F é observado a atividade da catalase em indivíduos expostos a interação de metais na concentração encontrada na vinhaça que em geral apresentaram redução da catalase em comparação ao controle ($p < 0,0001$). Todavia, a interação Cu+Ni a 27°C apresentou uma atividade da catalase maior que o controle ($p < 0,0001$).

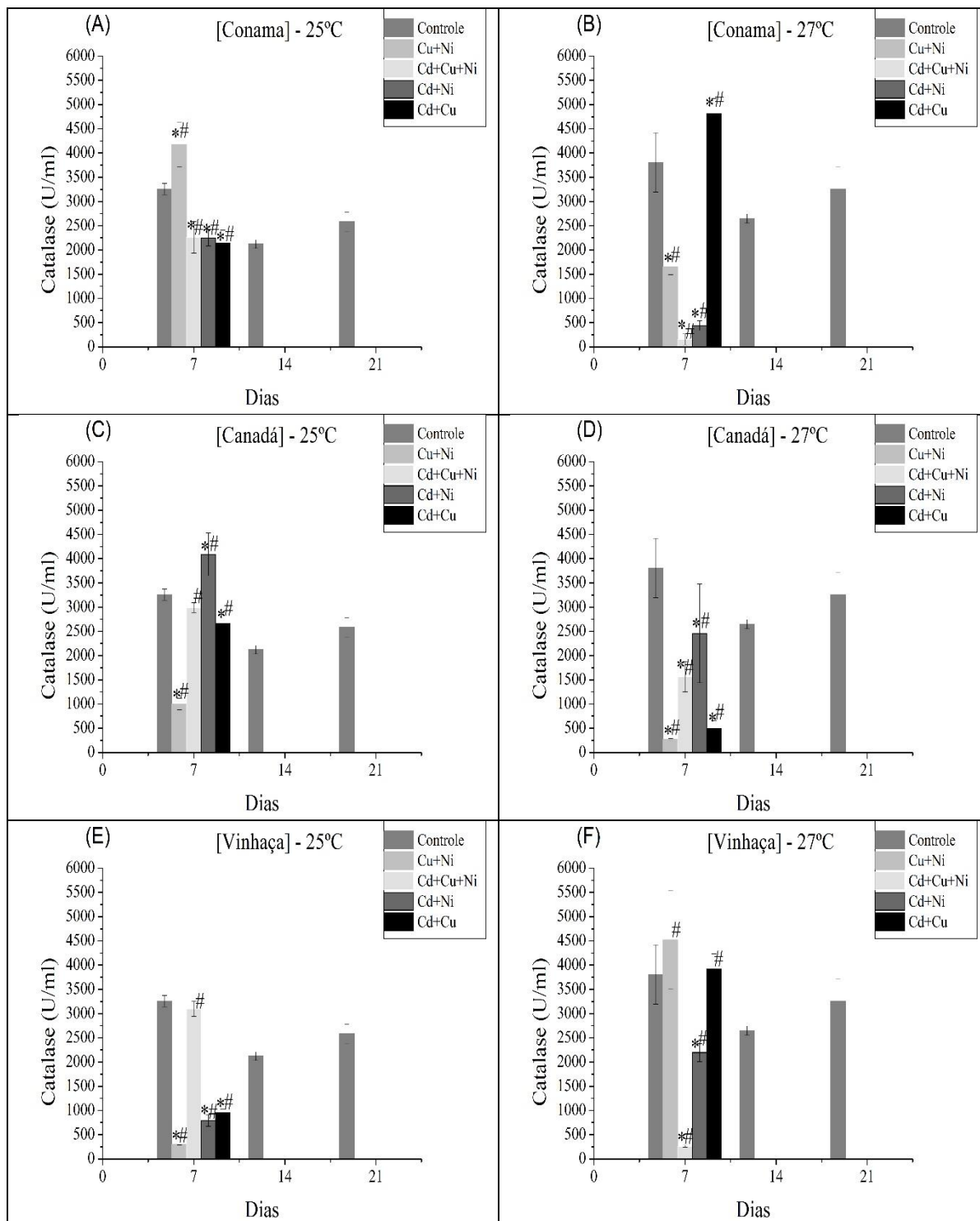


Figura 19. Atividade da Catalase em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.4.3. Danos oxidativos em *Ricciocarpus natans* submetida a combinações de metais e diferentes temperaturas

A peroxidação lipídica (MDA) em conjunto com extravasamento de eletrólitos são apresentados nas Figuras 20 e 21, respectivamente, nos indivíduos de *R. natans* expostos as combinações de metais (Cd, Cu e Ni) a 25 e 27°C. Os indivíduos expostos a concentrações permitidas pelo CONAMA apresentaram um leve aumento em relação ao controle quanto aos valores de MDA e eletrólitos. Todavia, *R. natans* apresentou maiores valores de MDA (Figura 24B) a 27°C comparando aos indivíduos a 25°C ($p < 0,0001$). Os indivíduos *R. natans* expostos a concentrações permitidas pelo Canadá (CWQG), tanto a 25°C quanto a 27°C apresentaram tendência a redução dos valores de MDA e eletrólitos em relação ao controle, principalmente a 27°C, ocorrendo diferença significativa ($p < 0,0001$). Entretanto, *R. natans* submetidas a interações de metais com valores encontrados na vinhaça, apresentaram aumento nos valores de MDA e eletrólitos a 25°C sendo significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,0001$).

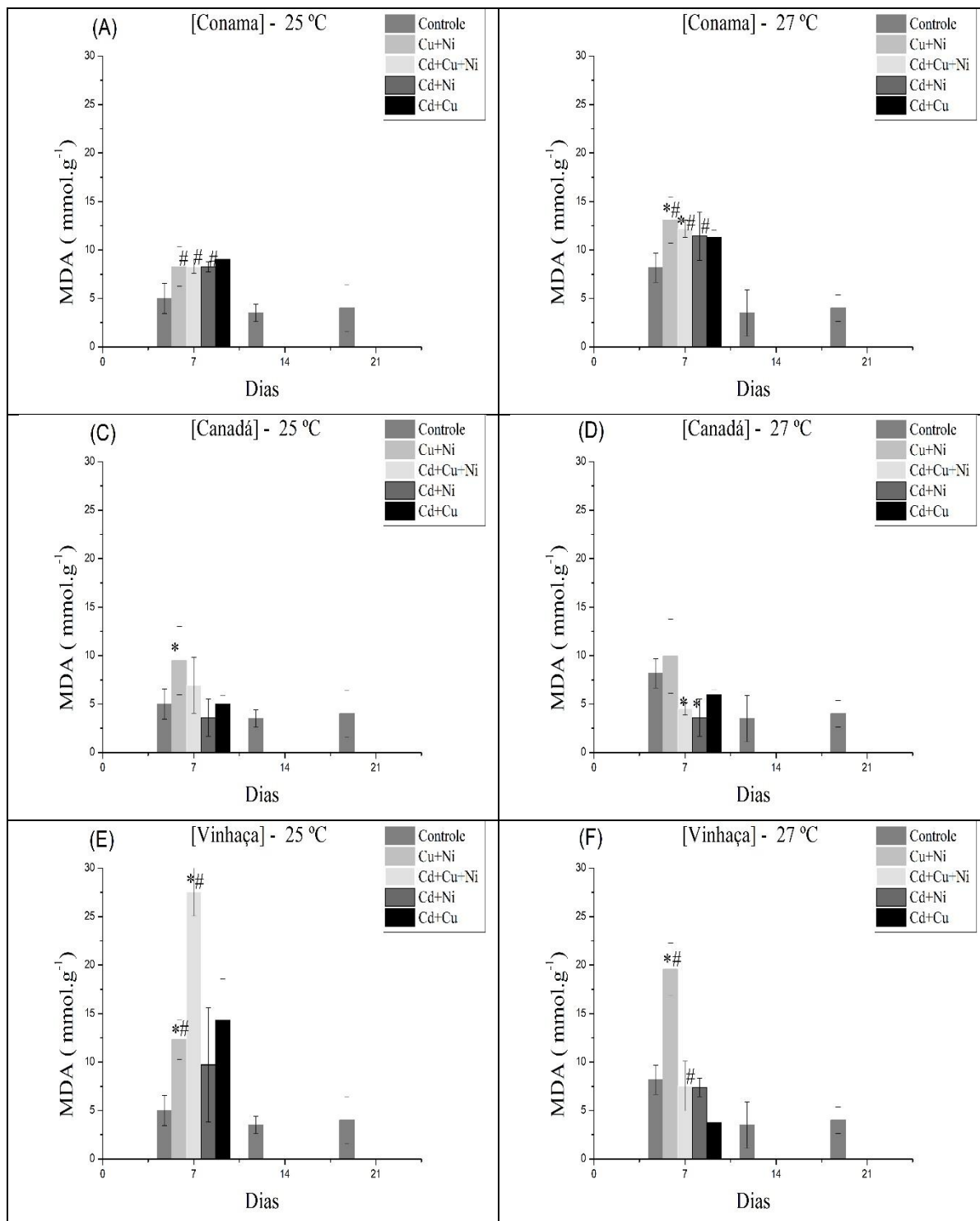


Figura 20. Malondialdeído (MDA) em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

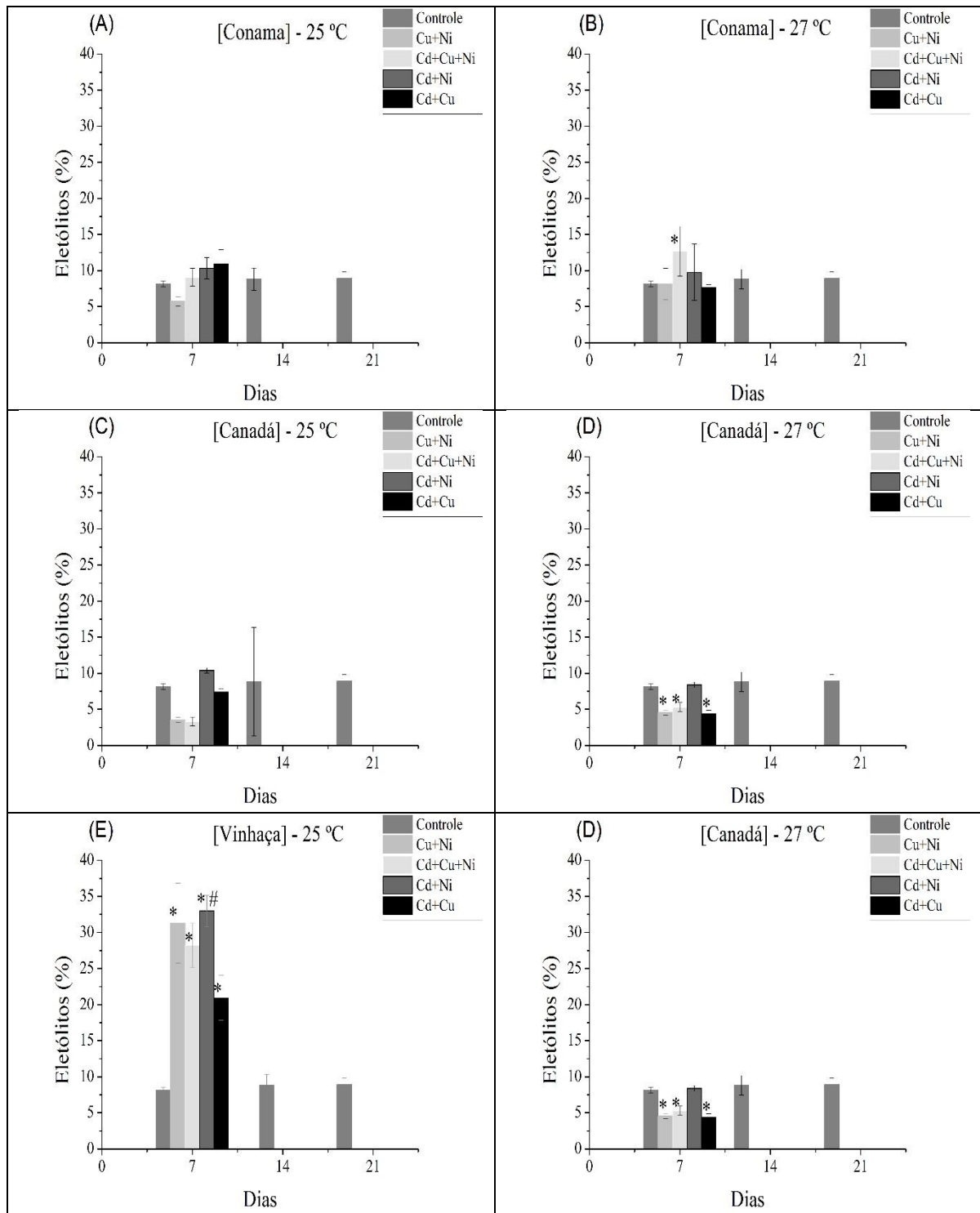
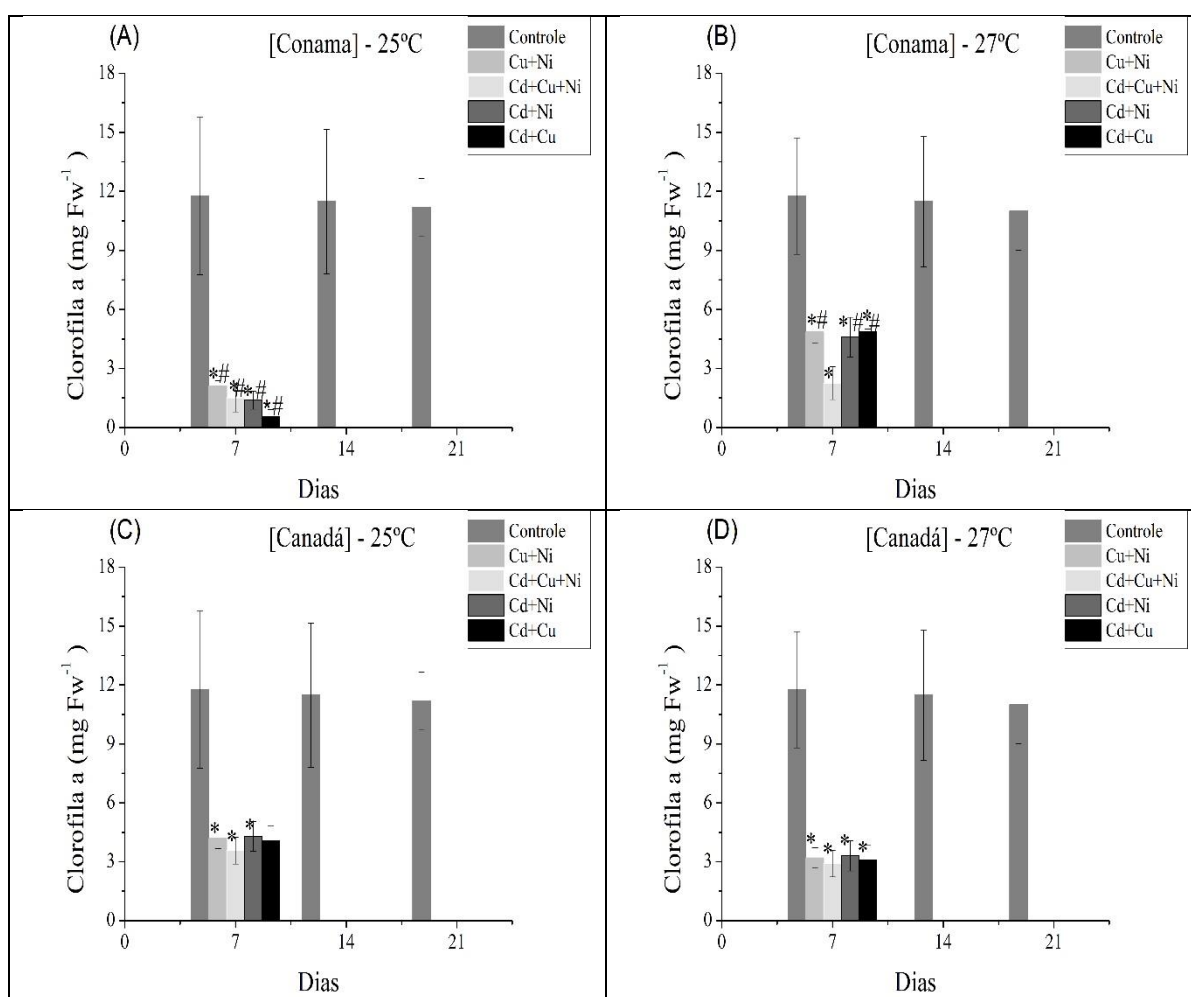


Figura 21. Extravasamento de eletrólitos em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.4.4. Pigmentos fotossintéticos em *Ricciocarpus natans* submetidas as combinações de metais e diferentes temperaturas

A análise de pigmentos fotossintéticos nos bioensaios com interação de metais (Figuras 22 a 24) indicou danos negativos na produção dos pigmentos em relação ao controle ($p < 0,0001$). As concentrações de clorofila *a* e *b* e carotenoides foram reduzidas drasticamente ($p < 0,0001$) em ambas temperaturas. No bioensaio com interações com concentração do CONAMA à 27 °C, a concentração de pigmentos foi maior do que à 25 °C ($p > 0,0001$). Além disso foi observado que os menores valores de pigmentos foram na interação dos 3 metais juntos (Cd+Cu+Ni) nas 3 concentrações testadas.



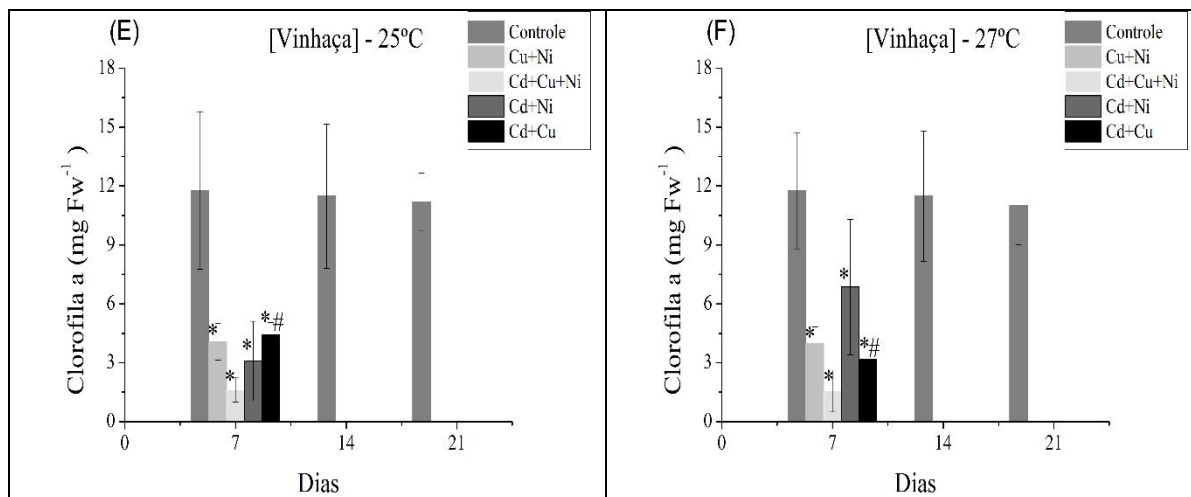


Figura 22. Clorofila a em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

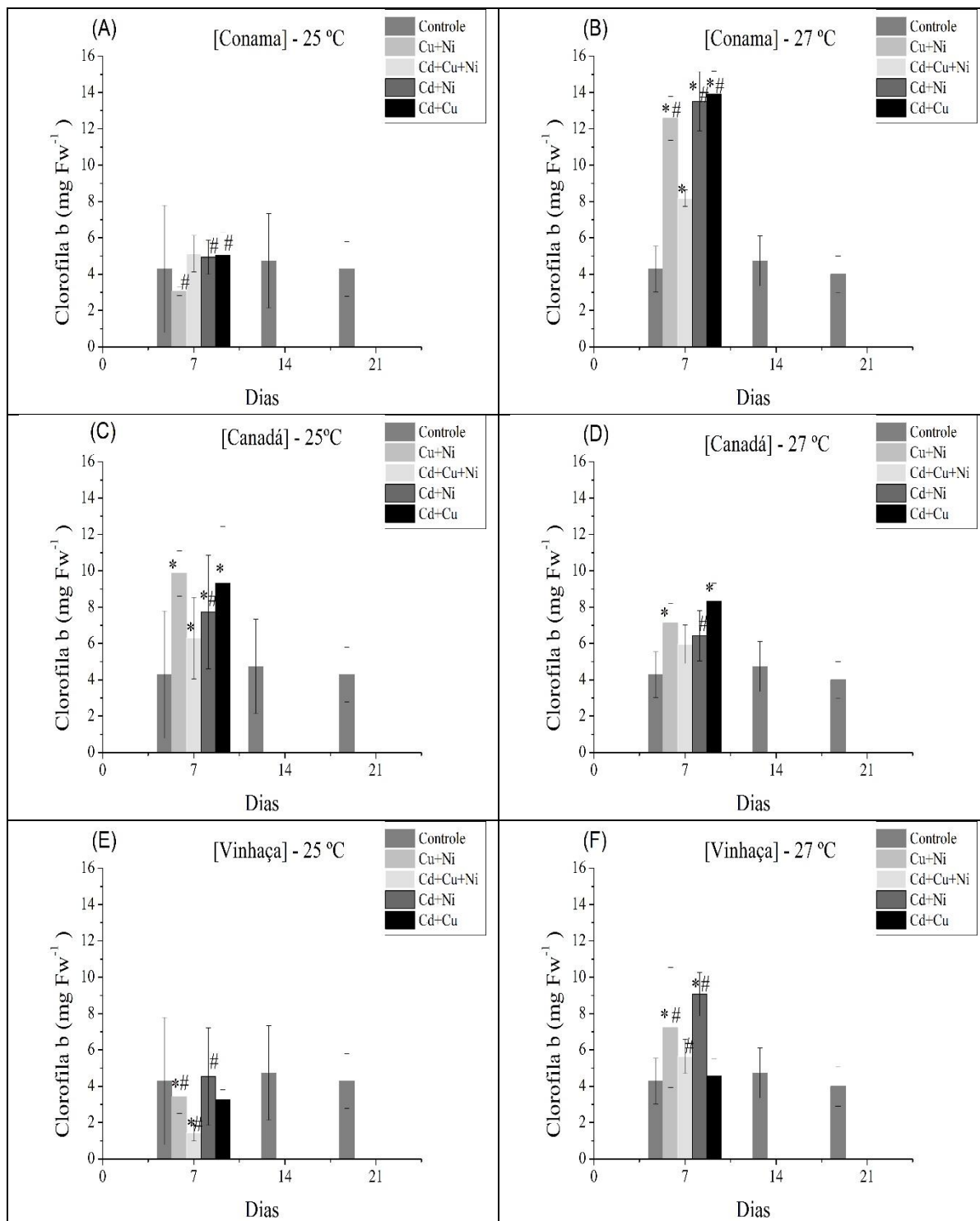


Figura 23. Clorofila b em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

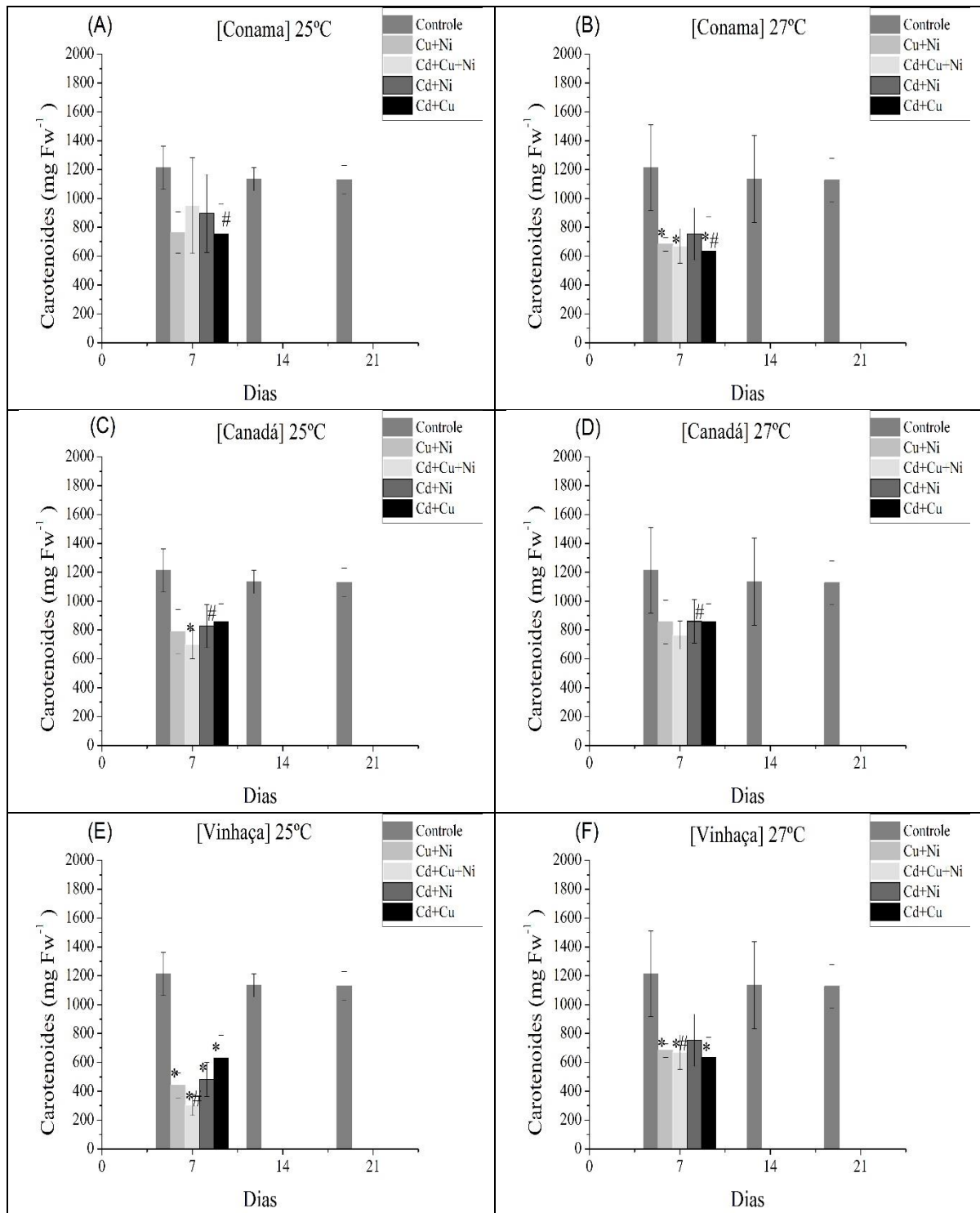


Figura 24. Carotenoides em *Ricciocarpus natans* expostas as combinações dos metais Cd, Cu e Ni na concentração: permitida pelo CONAMA Resolução 357/05 (A) a 25°C e (B) a 27°C; permitida pela Diretriz Canadense de Qualidade da Água (C) a 25°C e (D) a 27°C; encontrada na vinhaça (E) a 25°C e (F) a 27°C. (*) Representa diferença entre os tratamentos e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.5. Cinética de crescimento em *Ricciocarpus natans* submetida a diluições da vinhaça e diferentes temperaturas

O crescimento em largura (cm) e biomassa (g) da *R. natans* exposta as diluições de vinhaça são apresentados nas Figuras 25 e 26 respectivamente. No tempo 0 (inicial) os valores dos indivíduos que foram expostos a diluições da vinhaça foram maiores, entretanto houve decréscimo em seu tamanho. Somente foi possível mensurar os indivíduos expostos a vinhaça até o 7º dia de exposição, por apresentarem clorose e degradação dos tecidos após. Os indivíduos de *R. natans* expostos a 5%, 10% e 50% de vinhaça tiveram seu crescimento reduzido, tanto a 25°C (Figura 29A e 30A) quanto a 27°C (Figura 25B e 26B). A única exceção foram indivíduos expostos a 5% de vinhaça a 25 °C, que apresentaram um aumento de 1,7 vezes em sua biomassa (Figura 30A) em relação ao controle ($p < 0,05$).

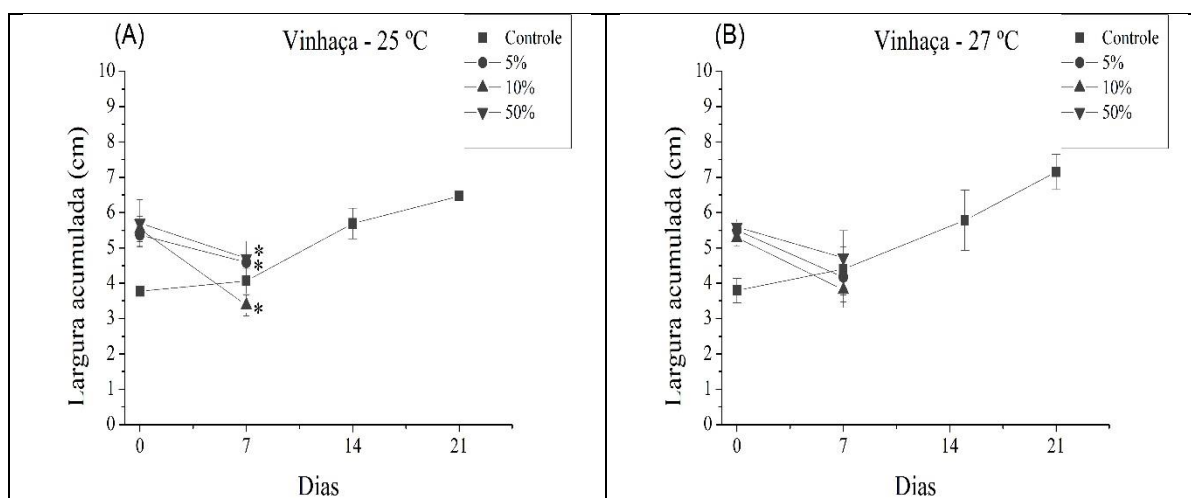


Figura 25. Largura acumulada (cm) em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

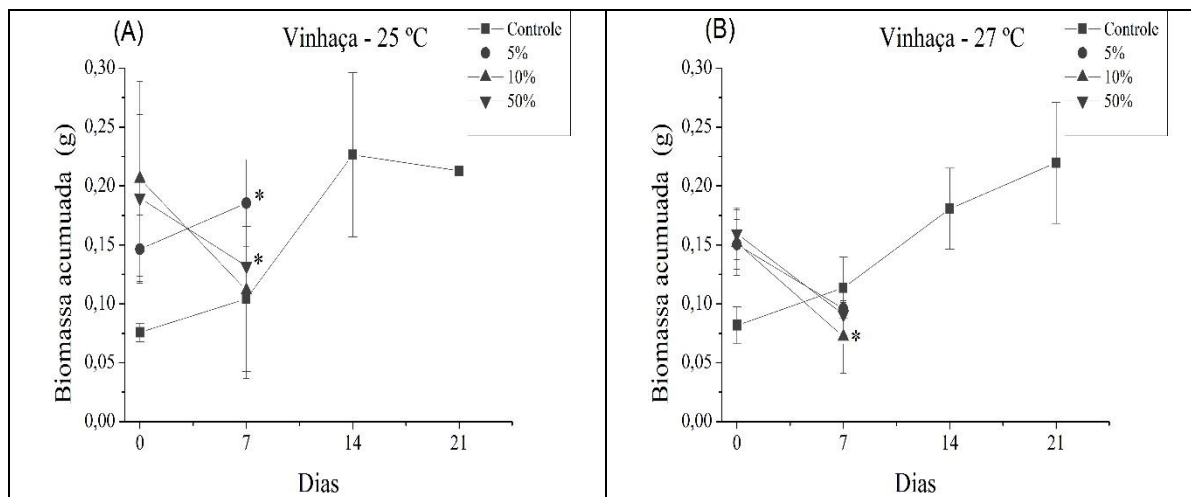


Figura 26. Biomassa acumulada (g) em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de Vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) Representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.6. Respostas fisiológicas em *Ricciocarpus natans* submetida a diluições de vinhaça e diferentes temperaturas

As análises fisiológicas em *Ricciocarpus natans* exposta a vinhaça nas 3 diluições analisadas (5, 10 e 50%) só foram possíveis de serem realizadas até o 7° dia de exposição, após o 7° dia havia alto grau de degradação dos tecidos dos indivíduos.

6.6.1. Antioxidantes não enzimáticos em *Ricciocarpus natans* submetida a diluições de vinhaça e diferentes temperaturas

Os antioxidantes não enzimáticos dos indivíduos *R. natans* expostos as diluições de vinhaça neste estudo são representados por antocianinas e flavonoides, presentes nas Figuras 27 e 28, respectivamente. A antocianina (Figura 27) aumentou significativamente nos bioensaios com 10% e 50% de vinhaça a 25°C. Em 27°C ocorreu redução significativa nos valores de antocianinas nos bioensaios com todas as diluições de vinhaça ($p < 0,0001$). O antioxidante flavonoide foi significativamente reduzido ($p < 0,0001$) a 5 e 10% de diluição da vinhaça, entretanto a 50% de diluição houve um discreto aumento em relação ao controle.

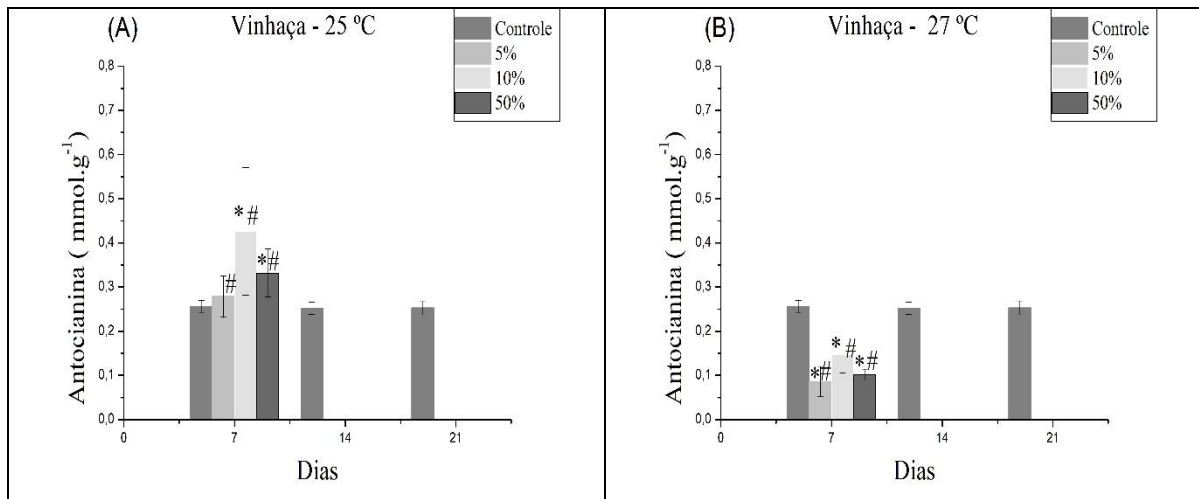


Figura 27. Antocianinas (mmol. g⁻¹) em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

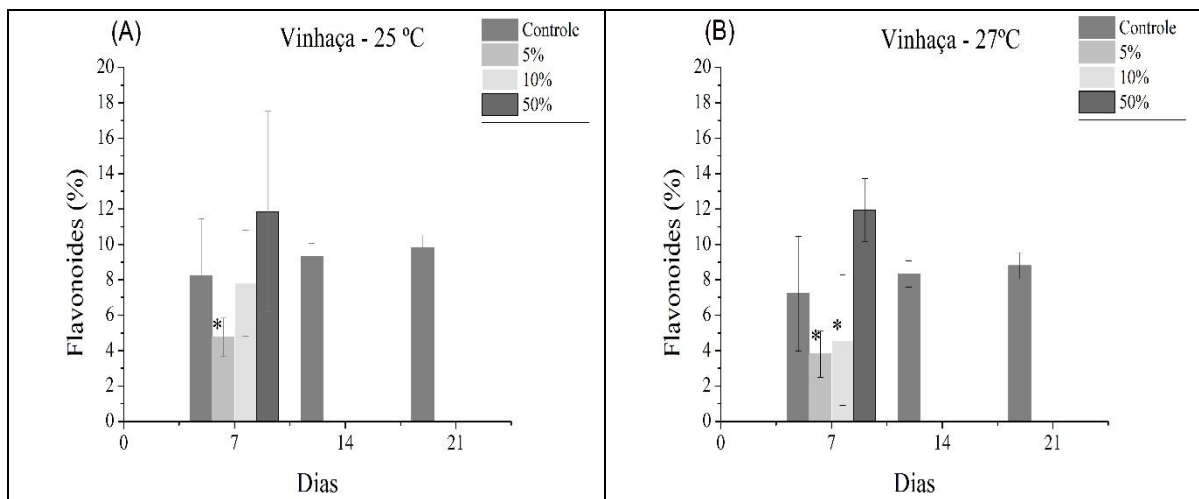


Figura 28. Flavonoides em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.6.2. Danos oxidativos em *Ricciocarpus natans* submetida a diluições de vinhaça e diferentes temperaturas

A *R. natans* expostas as diluições de 10 e 50% de vinhaça apresentaram valores semelhantes ao controle na produção de Malondialdeído (Figura 29) em 25 e 27°C. *R. natans* expostas a 5 % de vinhaça a 25 e 27°C apresentaram aumento no extravasamento de eletrólitos de 26 e 44% respectivamente em relação ao controle ($p < 0,0001$), porém esses valores diferiram quando comparados as temperaturas ($p < 0,0001$; Figura 34). Com o aumento dos valores das diluições houve redução dos eletrólitos.

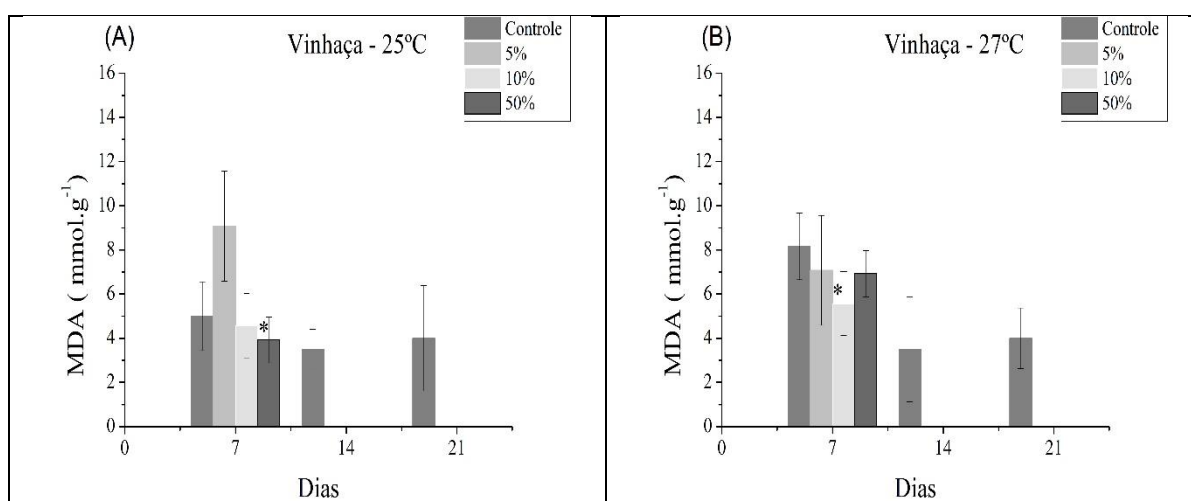


Figura 29. Malondialdeído (MDA) em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25°C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

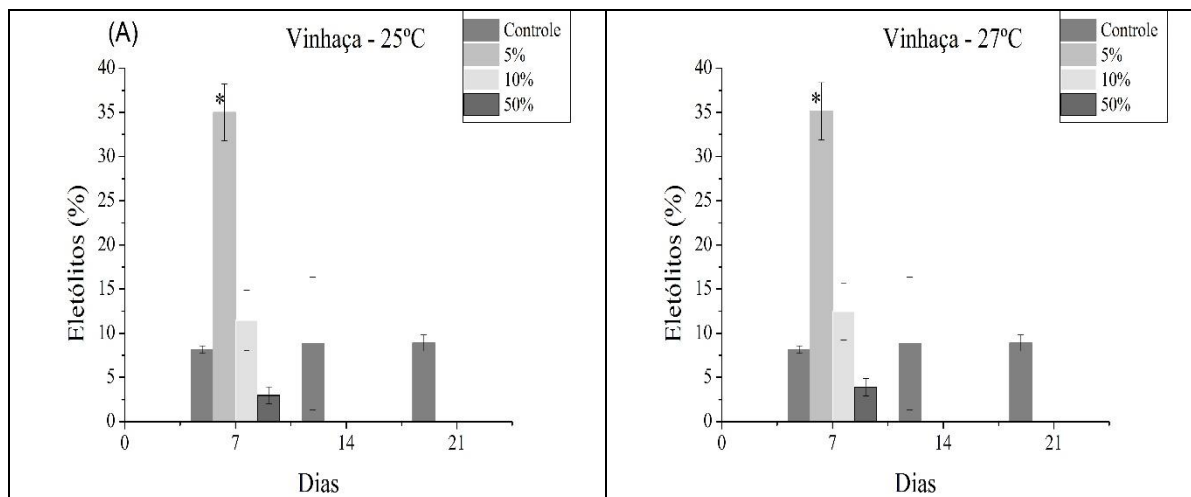


Figura 30. Extravasamento de eletrólitos em *Ricciocarpus natans* exposta as diluições de Vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

6.6.3. Pigmentos fotossintéticos em *Ricciocarpus natans* submetida a diluições de vinhaça e diferentes temperaturas

A análise de pigmentos fotossintéticos para os bioensaios com diluições de vinhaça (Figuras 31, 32 e 33) indicaram que *R. natans* apresentaram grande redução da concentração de pigmentos já na primeira semana ($p < 0,0001$) para todas os pigmentos analisados (clorofila *a*, *b* e carotenoides). Além disso, foi observado que quanto maior a concentração da vinhaça maior foi o efeito negativo na concentração dos pigmentos. Comparando-se as temperaturas, não houve diferença significativa entre si.

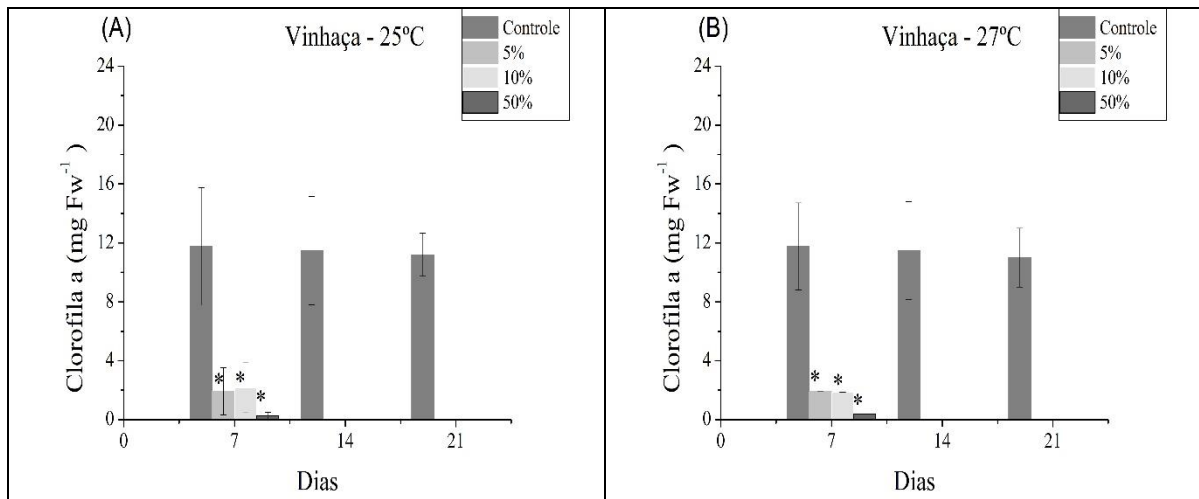


Figura 31. Clorofila a em *Riccioarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

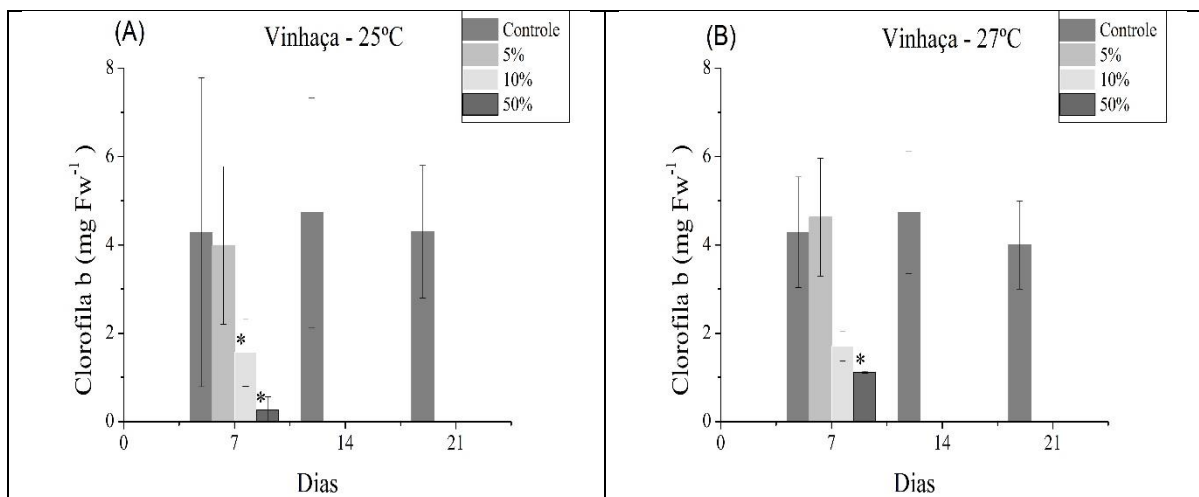


Figura 32. Clorofila b em *Riccioarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

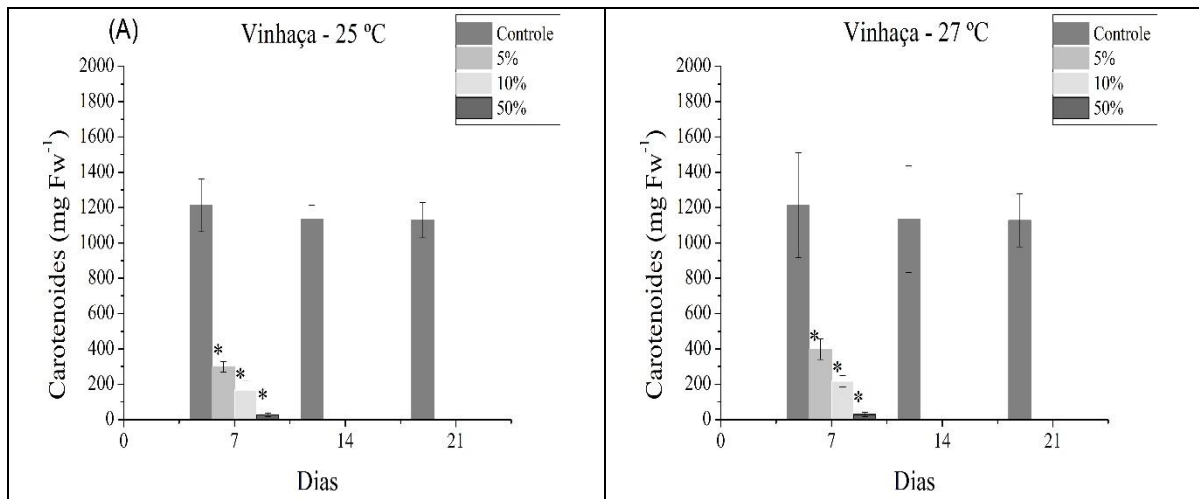


Figura 33. Carotenoides em *Riccioarpus natans* exposta as diluições de vinhaça (5, 10 e 50 %) a (A) 25°C e (B) a 27°C. (*) Representa diferença entre o tratamento com metais e o controle no mesmo tempo de exposição. (#) representa diferença entre o tratamento a 25° C e 27°C na mesma concentração de metal e tempo de exposição.

7. Discussão

7.1. Crescimento e pigmentos fotossintéticos em *R.natans* expostas a concentrações de metais individuais (Cd, Cu e Ni)

O crescimento das plantas é bastante utilizado para avaliar a toxicidade dos metais (KÖHL e LÖSCH, 2004). Os bioensaios de *R. natans* com concentrações dos metais Cd e Cu permitidas pelo CONAMA e Diretriz Canadense apresentaram crescimento ao longo dos 21 dias (Figuras 3 e 4), contudo, menor que o tratamento controle.

O Cd mesmo não sendo elemento essencial a planta, em baixas concentrações não induziu efeitos deletérios no crescimento, apresentando μ maior que o do controle na concentração 0,001 mg/L Cd (Tabelas 2 e 3). *R. natans* exposta aos metais como o manganês (Mn) em baixas concentrações também apresentou crescimento, com o μ maior que o do controle (GIMENES et al., 2020). Algumas plantas podem apresentar estratégia de tolerância e aumentar a taxa fotossintética como resposta à contaminação por baixas concentrações de metais (PEREIRA et al., 2016), foi possível manter o crescimento de *R. natans* pelo tempo de estudo. Um estudo com *Typha domingensis* mostrou crescimento e produção de pigmentos sob exposição a Cd em baixas concentrações. Espécies consideradas tolerantes como *Lonicera japonica* (JIA et al., 2015), *Schinus molle* (PEREIRA et al., 2016) e *Eichhornia crassipes* (PEREIRA et al., 2017) aumentaram a fotossíntese e o crescimento em resposta ao Cd. Em baixas concentrações de Cd, a planta pode desenvolver barreiras que atuam como bloqueio para que esse elemento não alcance órgãos reprodutivos e tecidos meristemáticos, evitando danos no crescimento dos indivíduos (CARVALHO et al., 2015; PEREIRA et al., 2016).

O Cu é um elemento essencial que em concentrações ideais contribui para o crescimento e desenvolvimento das plantas (YRUELA, 2005; 2009) e participa em vários processos vegetais. Por exemplo, o cobre é constituinte de proteína, necessário para o funcionamento normal de mais de 30 enzimas (EPSTEIN e BLOOM 2005; YRUELA 2005), desempenha papéis importantes nas cadeias de transporte de elétrons fotossintéticos e respiratórios como na plastocianina (HÄNSCH E MENDEL 2009). O Cu também atua no metabolismo da parede celular, na proteção do estresse oxidativo e desempenha um papel significativo na assimilação de CO₂ e na síntese de ATP (YRUELA, 2009). Sendo assim, o cobre nas concentrações permitidas não afetou

negativamente o crescimento dos indivíduos, apresentando μ próximo ao grupo controle. Em um estudo com *Lemna gibba* expostas a cobre, 10^{-4} – 10^{-1} $\mu\text{g/L}$ Cu, também apresentou relativo crescimento (MEGATELI et al, 2009). As concentrações de 0,01 mg/L; 0,1 mg/L de cobre em indivíduos de *Lemna minor* induziu um efeito estimulador para crescimento e desenvolvimento em comparação ao controle (PROENÇA et al., 2012).

Diferentemente de Cd e Cu, a concentração 0,002 mg/L de Ni a 25 °C (Figura 3E), mesmo sendo baixa, levou ao crescimento reduzido de *R. natans* em relação ao grupo controle, apresentando ausência de crescimento. Contudo, indivíduos expostos a 0,025 mg/L de Ni a 25 ° apresentaram crescimento até o 14º dia seguido de redução no 21º dia. O Ni como micronutriente essencial às plantas pode acelerar o crescimento em concentrações relativamente baixas (UGYA et al, 2015). Esse ligeiro aumento pode ser decorrente da síntese de ligantes de desintoxicação (como metalotioneínas, glutatona e fitoquelatinas). Este comportamento também foi observado em *Pistia stratiotes* que, submetidas a 1 mg/L de Ni, aumentaram ligeiramente a taxa de crescimento (LEBLEBICI et al., 2019); e em *Hydrilla verticillata* sob 33.06 μM de Ni a biomassa foliar aumentou primeiro e depois diminuiu após atingir um pico (ZHANG et al., 2020). Dessa forma, o tempo de exposição ao metal pode induzir toxicidade na planta, visto que são elementos bioacumulativos. Sendo assim, a exposição ao Ni por 21 dias pode inibir o crescimento das plantas, indicando que, embora o Ni seja necessário, ele se torna tóxico para as plantas quando a duração da exposição excede um limite específico (ZHANG et al., 2020). Além disso, indivíduos expostos a 0,002 e 0,025 mg/L de Ni a 27°C apresentaram redução de μ , conforme aumento da concentração e tempo de exposição. A redução da biomassa e tamanho podem estar relacionados com a degradação das paredes e membranas celulares das plantas e à catálise de proteínas por radicais livres sob toxicidade (MALEVA et al. 2009).

As concentrações de Cd, Cu e Ni presentes na vinhaça, (0,375; 0,385 e 0,221 mg/L respectivamente) parecem ser muito elevadas para o crescimento de *R. natans*. As plantas submetidas a estes tratamentos apresentaram redução, seguida de inibição de crescimento, a partir do 7 ° dia de exposição. Essas concentrações evidenciaram a toxicidade destes metais por gerarem valores nulos de μ .

Os aumentos das concentrações dos metais ocasionaram sintomas de toxicidade (i.e., perda de peso, tamanho e clorose) para *R. natans*. As concentrações mais elevadas neste estudo, mesmo para aqueles considerados micronutrientes, causaram efeitos tóxicos (UGYA et al, 2015). A inibição do crescimento por altas concentrações de metais pode ocorrer por desordem metabólica, por efeito direto ou indireto dos metais sobre a taxa fotossintética das plantas, e/ou diretamente através de interações dos metais com polissacarídeos da parede celular que resultam na redução de sua plasticidade, diminuindo o tamanho das células (SEREGIN E IVANOV, 2001). A perda de peso e a redução do tamanho parecem estar diretamente associadas à inibição do crescimento celular pelos metais, podendo impedir a sobrevivência das plantas sob altas concentrações (ALAOUI-SOSSÉ et al., 2004). O cádmio pode causar redução no crescimento e baixo desenvolvimento das plantas (BENAVIDES et al., 2005). Estudos mostram que o Cd pode atuar sobre a proporção dos tecidos radiculares e modificações no desenvolvimento de barreiras apoplásticas como a epiderme, exoderme e endoderme (REDJALA et al., 2009), sendo associado à queda do crescimento vegetal e clorose. De forma semelhante, concentrações acima de 0,25 mg / L de Cu podem reduzir o crescimento e os valores da clorofila (BABU et al, 2003), desencadeando inibição ao longo do tempo de exposição. O acúmulo excessivo de Cu resulta em efeitos prejudiciais em vários processos fisiológicos e bioquímicos nas plantas e também pode inibir o crescimento (FERNANDES e HENRIQUES, 1991; WANG et al., 2011). Da mesma forma, concentração mais elevada de Ni neste estudo ocasionou efeitos adversos, como, clorose e alteração no crescimento da planta também.

Nas concentrações mais baixas de Cd, Cu e Ni, *R. natans* apresentou capacidade de manter o crescimento como possível resultado da produção de pigmentos da fotossintéticos (Figuras 15-17). As concentrações de clorofila estão diretamente ligadas ao desenvolvimento e crescimento sendo, portanto, consideradas também um dos métodos para avaliar a toxicidade de alguns metais em plantas (HADAD et al., 2011).

Neste estudo foi observado que as respostas de pigmentos clorofila *a* e *b* e carotenoides de *R. natans* nas concentrações de 0,001 e 0,01 mg/L de Cd a 27°C (Figura 15B, 16B) apresentaram valores semelhantes ao grupo controle, corroborando com o crescimento ocorrido nos indivíduos, pois a produção dos pigmentos fotossintéticos contribui para o crescimento da planta. Entretanto, a 25 °C indivíduos expostos à menor concentração de Cd no estudo (0,001 mg/L) apresentaram redução no conteúdo de

pigmentos com 7 dias de experimentação, seguido de aumento na produção dos pigmentos com 14 dias de exposição. Estudos mostram que o Cd presente em meios de cultivo, mesmo em baixas concentrações podem afetar processo de biossíntese (STOBART et al., 1985) na produção de pigmentos fotossintéticos, interferindo negativamente no crescimento das plantas (CHINMAYEE et al., 2013; KUMMEROVÁ, et al., 2010). Mesmo sob baixa concentração (0,05 mg/L de Cd) *Lemna minor* teve efeitos adversos sobre os pigmentos fotossintéticos (HOU et al., 2007). Nas concentrações mais baixas desse estudo (0,001 e 0,01 mg/L Cd) em 21 dias de exposição *R. natans* apresentou recuperação na produção de pigmentos e crescimento. Dessa forma, a planta pode ter desenvolvido estratégia para tolerar o meio contaminado, podendo ser consideradas resistentes a concentrações de até 0,01 mg/L de Cd. O pigmento carotenoide acompanhou a produção dos pigmentos clorofila *a* e *b*. Os carotenóides são pigmentos fotossintéticos acessórios que também atuam como moléculas antioxidantes. Portanto, aumento nas concentrações de carotenoides nos cloroplastos podem proteger os fotossistemas I e II contra danos oxidativos causados pelo estresse do metal (PRADO et al., 2016).

Os pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, *b* e carotenoides em *R. natans* expostos a Cu por 7 dias (Figuras 15-17) apresentaram produção semelhante ao controle. As menores concentrações do cobre pode ser um fator estimulante para o crescimento e desenvolvimento fotossintético, tendo em vista as funções desse elemento essencial citadas anteriormente. Nas concentrações de a 0,002 e 0,009 mg/L de Cu a 27 °C houve aumento nos teores carotenoides, atuando como proteção ao estresse ocasionado pelo metal reduzindo a peroxidação lipídica e conseqüente dano oxidativo (JUAN et al., 2005). *Salvinia auriculata* submetidas 0.1 mM de Cu também apresentaram aumento nos carotenoides (BIZZO et al., 2014). Indivíduos expostos por 14 dias a Cu em 25°C apresentaram redução, seguido de estabilidade na produção de pigmentos. No entanto, essa redução nos valores não ocasionou danos severos a ponto de prejudicar o crescimento das plantas. Em geral, *R. natans* apresentou-se tolerante às concentrações de 0,002 e 0,009 mg/L de Cu, com base nos valores dos parâmetros de crescimento e concentrações de pigmentos. Em relação aos pigmentos, o cádmio, mostrou-se mais tóxico do que o cobre para *R. natans* pois, mesmo mantendo a produção estável, a quantificação foi menor que nos indivíduos expostos a cobre. No entanto, quando presentes em excesso, esses metais (Cd e Cu) tornam-se tóxico e podem inibir processos celulares.

R. natans apesar de quando cultivadas sob concentrações baixas de Ni não ter apresentado aumento de μ , mostrou aumento da produção de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) em relação ao controle até o 21º dia de estudo. Informações sobre a absorção de Ni pelas plantas são escassas e grande parte de suas vias de captação e transporte ainda são desconhecidas (ANDRESEN et al., 2018). Plantas consideradas hiperacumuladoras de Ni têm o metal sequestrado preferencialmente nas células epidérmicas, principalmente nos vacúolos, impedindo-o de interferir na fotossíntese e na respiração (KÜPPER et al., 2001). A desintoxicação do Ni também pode ocorrer por complexação, ao ser ligado a um quelante, como a histidina, o malato, o citrato e os ácidos orgânicos (KRÄMER et al., 1996; JAFFRÉ et al., 2013); mas, a via principal de desintoxicação é por sequestro (LEITENMAIER e KÜPPER, 2013). Sendo assim, a planta pode ter alocado maior energia para manter o desenvolvimento fotossintético, reduzindo o gasto energético para o crescimento, mantendo-o reduzido, porém estável.

A fotossíntese das plantas expostas as concentrações altas de Cd, Cu e Ni foi comprometida, reduzindo drasticamente os níveis de clorofila *a* e *b* e os carotenoides, caracterizando clorose foliar e possível morte dos indivíduos de *R. natans*; isso, provavelmente, por ocorrer inativação de enzimas responsáveis pela síntese desses pigmentos (RODRIGUES et al., 2017). O sistema fotossintético apresenta sensibilidade aos metais (PANDA e CHOUDHURY, 2005; BOONYAPOOKANA et al., 2002; TRIPATI E SMITH, 2000; GUIMARÃES et al., 2008). O acúmulo de metais tais como Cu, Zn, Cd, Cr, Hg ou Ni pode induzir à substituição dos íons de Mg^{2+} nas moléculas de clorofila e inibir a absorção de Mg e K em plantas, resultando em queda da taxa fotossintética (Küpper et al., 1996; GARDEA-TORRESDEY et al, 2004). Estudo com a macrófita aquática flutuante *Lemna minor* mostrou que a presença de metais Cu e Cd provocou a toxicidade nas folhas e inibição na produção de proteínas solúveis e pigmentos (HOU et al., 2007).

A interferência do Cd sobre a fotossíntese abrange redução na síntese e modificação na fluorescência da clorofila *a*, mudança na concentração e composição de outros pigmentos, inibição do fotossistema II, alteração na cadeia transportadora de elétrons, inativação das enzimas do ciclo de Calvin e redução da condutância estomática (PILON-SMITS et al., 2000; DALLAVECCHIA et al. 2005). Além disso, a clorose pode ser decorrente da competição do Cd com o ferro por sítios de absorção na membrana plasmática, o que interfere na estabilidade das clorofilas e também por reduzir o

transporte de manganês pelo Cd e por um decréscimo na replicação do cloroplasto (GUIMARÃES et al., 2008). As concentrações altas desse elemento podem ocasionar má formação dos cloroplastos e a dilatação da membrana do tilacoide, portando causar danos na produção de pigmentos fotossintéticos (MYŚLIWA et al., 2004); KÜPPER et al. 2007). Além disso, o cádmio pode causar grandes danos ao cloroplasto por meio do aumento da produção de radicais livres (HOU et al., 2007).

O excesso de Cu pode interagir com plastocianinas (transportadoras de elétrons) e SOD prejudicando o processo de fotossíntese e desintoxicação em cloroplastos (HANIKENNE e NOUET et al., 2011), afetando então a produção de pigmentos, como ocorreu com *R. natans* que apresentou declínio na produção de pigmentos sob maior concentração de Cu. Em estudo com a macrófita flutuante *S. auriculata* constatou-se que o aumento na concentração de Cu no ambiente reduziu a biomassa, ocasionou perda no conteúdo de água, clorofila e carotenoides (BIZZO et al., 2014). A ação do Cu no cloroplasto, quando internalizado em excesso, pode se ligar a proteínas responsáveis pelo transporte de elétrons no fotossistema II, resultando na diminuição das taxas de transferência de elétrons, inibindo a fotossíntese e, conseqüentemente, a produção de energia das plantas (ARELLANO et al., 1995; MAKSYMIEC, 1998). Alguns outros trabalhos também relataram alterações na produção de pigmentos fotossintéticos em plantas aquáticas expostas aos metais (PIETRINI et al., 2003; HOU et al., 2007; SIVACI et al., 2008; COSTA, 2014).

Neste estudo, as plantas expostas a maior concentração de Ni (0,221 mg/ L) apresentaram também sintomas de toxidez com 7 dias de exposição. A toxicidade causada pelo excesso de Ni ocorre principalmente devido à ligação deste elemento com grupos SH e interferência com proteínas e enzimas (ANDRESEN et al., 2018). Outra possível interferência do Ni é na inibição da enzima RuBisCo através da reação de carboxilação da enzima (VAN ASSCHE e CLIJSTERS, 1990). O mecanismo da inibição do crescimento pode ocorrer também pela interferência do Ni na fotossíntese, por exemplo, diretamente criando [Ni] –clorofila (KÜPPER et al., 2006), que como no caso do [Cu] –clorofila, não pode reemitir os elétrons absorvidos e age como uma extinção desses elétrons, ocasionando uma grande limitação da fotossíntese.

A toxidez dos metais Cd, Cu e Ni em *R. natans* tem associação com a concentração do metal no meio e o período de exposição. Visto que os metais não são degradados no ambiente, estes se acumulam ao longo do tempo, induzindo efeitos adversos aos

organismos expostos (DÍEZ et al., 2017), como danos oxidativos celular (MYSLIWA et al., 2004).

7.2. Respostas de antioxidantes em *Ricciocarpus natans* expostas a concentrações de metais (Cd, Cu e Ni) individuais

Estudos mostraram alterações no funcionamento do sistema antioxidante atribuídas aos metais em várias espécies de plantas (MILLER et al. 2010; AHMAD et al. 2011; ZHANG et al, 2019). A restauração e o equilíbrio antioxidante para toxicidade de metal dependem do tipo de metal, quantidade e espécie de planta. Neste estudo, *R. natans* apresentou aumento da atividade da enzima SOD com o aumento da concentração de metais (Cd, Cu e Ni) e tempo de exposição. Os aumentos das atividades de enzimas antioxidantes sob metais foram observados também em *Salvinia natans* e *Phragmites* sp. (DHIR et al. 2009b). Resultados semelhantes foram relatados também em estudos com *Lemna trisulca*, *Phragmites australis*, *Salvinia minima* e *Ceratophyllum demersum*, que mostraram maiores atividades de SOD quando cultivadas em água com concentrações de Cu e Cd (HOU et al. 2007). Além destes, um estudo com exposição de plantas ao Ni em diferentes concentrações demonstrou o aumento das atividades de SOD e, assim, induziu a ativação de outras defesas antioxidantes e, finalmente, levou à remoção de EROs (FREEMAN, et al., 2004; SACHAN e LAL, 2017).

Os resultados de MDA e eletrólitos do presente estudo, demonstraram danos causados pelo estresse oxidativo. Isso ocorre porque o sistema antioxidante não foi capaz de neutralizar o excesso de EROs, ocorrendo um desequilíbrio. No entanto, quando em altas concentrações dos metais Cd, Cu e Ni (0,375; 0,385 e 0,221 mg/L, respectivamente) a atividade enzimática da SOD em *R. natans* primeiro aumentou e depois houve morte dos indivíduos. Este resultado indica que a enzima não pode combater altos níveis de toxicidade de Cd, Cu e Ni. Estudo com *H. verticillata* exposta a 33,06 µM de Ni e 40 µM de Cd também apresentou essa variação na atividade da enzima (ZHANG et al., 2020).

Plantas sob estresse de Cd induzem o sistema de defesa enzimático da CAT e SOD, a fim de mitigar os danos oxidativos (SHANMUGARAJ et al., 2019). Quando *R. natans* expostas a menor concentração de Cd apresentaram acréscimos na produção com 7 dias de exposição, seguido de redução na produção e estabilidade nas menores concentrações, sugere tolerância. A tolerância ao estresse por Cd está relacionada com aumento da capacidade de eliminar ou desintoxicar EROs (HASHEM et al., 2016). A SOD é uma metaloproteína que dismuta o superóxido em H₂O₂ e oxigênio molecular

(ALLEN, 1995). O H_2O_2 também é tóxico para células e precisa ser adicionalmente desintoxicada em água e oxigênio por CAT (SHANMUGARAJ et al., 2019). Portanto, essas enzimas são fundamentais para o controle de danos oxidativos. O estresse oxidativo induzido pela menor concentração de Cd pareceu ser reduzido de forma eficaz por enzimas antioxidantes, incluindo CAT E SOD.

As atividades da CAT em *R. natans* sob diferentes concentrações de Cu e Ni apresentou declínio chegando até a inibição ao longo do tempo. A redução da atividade de catalase com o aumento da concentração de metal foi também relatada anteriormente por SHANKER et al., (2005). Um motivo para esse acontecimento pode ser devido ao acúmulo de íons metálicos gerando efeitos inibitórios diretamente nas enzimas antioxidantes, inibindo as atividades da CAT (SHANKER et al., 2005). Quando *H. verticillata* foi exposta a 25 μ M. Cu, resultados semelhantes de redução da CAT foram encontrados (SRIVASTAVA et al. 2006). Estudos relataram plantas que cresceram sob estresse de metais e que apresentaram rápido declínio na atividade de CAT, relacionado ao aumento na produção de EROs ($O_2 \cdot^-$, $OH \cdot$) provavelmente inativando uma ligação do grupo heme com a enzima (ARAVIND e PRASAD 2005; SHANKER et al., 2005; TANWIR et al., 2020). Um estudo de Srivastava (2017) indicou que em *H. verticillata* a atividade de CAT foi inibida em 4 dias de exposição a Cu e o conteúdo de SOD aumentou.

Neste estudo, o conteúdo da enzima antioxidante SOD também aumentou após a exposição aos três metais em comparação com o grupo controle, indicando forte resistência de *R. natans* à toxicidade dos três metais. A resistência da macrófita é maior em baixas concentrações de Cd, Cu e Ni, corroborando com o estudo com *H. verticillata* exposta a Cd apresentou maior resistência quando exposta a baixas concentrações (ZHANG et al., 2019).

Os teores de flavonoides aumentaram com o aumento das concentrações de Cd e Cu a 25°C, o que sugere que esse antioxidante desempenhou papel importante na defesa contra o estresse oxidante induzido por esses elementos. Estudo com outras plantas, também relataram resultados semelhantes (WANG et al. 2011b). Em *R. natans* exposta ao Ni observou-se a produção de flavonoides reduzida, o que sugere que este antioxidante, nesse caso, não é tão efetivo, ou sua produção é mais lenta e custosa do que os demais antioxidantes (BIZZO et al., 2014), levando a planta a investir em outra via.

Os conteúdos de antocianinas em *R. natans* expostas a menores concentrações de Ni apresentaram acréscimos. Em baixas concentrações, o Ni desempenha um papel importante em vários processos metabólicos (MULROONEY e HAUSINGER, 2003) sendo essencial para a biossíntese de antocianinas (RAGSDALE, 1998). Assim, o Ni nas menores concentrações, pôde ter contribuído para o aumento da produção de antocianinas, sendo possível manter a síntese desse composto. Dessa forma, com aumento do conteúdo de antocianinas, este, possivelmente, pode colaborar para a proteção de danos oxidativos.

Os antioxidantes não enzimáticos flavonoides e antocianinas tiveram notória participação na defesa celular de *R. natans*, principalmente nas menores concentrações de Cd, Cu e Ni. Na maior concentração, 0,221 mg/L Ni, os indivíduos de *R. natans* apresentaram redução nos níveis desses antioxidantes, indicando possível inibição deste sistema antioxidante pelo excesso de EROs e danos na membrana, corroborado pelos dados de eletrólitos.

Os antioxidantes não enzimáticos são importantes na tolerância aos metais, sendo enfatizado como um sistema poderoso que atua contra os efeitos danosos dos radicais hidroxila nas macromoléculas celulares (SONG et al., 2018). A sensibilidade das plantas aos danos oxidativos depende do equilíbrio entre os fatores que aumentam a geração de espécies reativas e os compostos celulares com capacidade antioxidante (Jiménez et al., 1998).

7.3. Estresse oxidativo em *Ricciocarpus natans* expostas a concentrações de metais (Cd, Cu e Ni) individuais

Importante efeito tóxico causado pelos metais no metabolismo vegetal está relacionado ao estresse oxidativo. A degradação oxidativa dos lipídios da membrana é definida como peroxidação lipídica, sendo o MDA considerado um determinante da peroxidação lipídica (YILDIZ et al., 2011). A integridade da membrana também pode ser avaliada pelo extravasamento de eletrólitos pois, quando afetada, pode ocorrer aumento no vazamento de íons (LEBLEBICI et al., 2019).

Neste estudo, *R. natans* exposta aos metais Cd, Cu e Ni por até 21 dias, em crescentes concentrações e duas temperaturas apresentaram respostas diferentes de MDA e extravasamento de eletrólitos entre os metais. Indivíduos *R. natans* submetidos a 0,001 e 0,01 mg/L de Cd 25°C com 7 dias apresentaram redução de MDA. Estudos com plantas

aquáticas também mostraram reduções nos níveis de MDA devido à exposição a metais como Cd em menores concentrações (GUPTA et al., 1996; DHIR et al., 2004; DING et al., 2007). Essas reduções podem ser devidas às EROs estarem sendo eliminadas pelo sistema de enzimas antioxidantes defensivas, reduzindo a peroxidação de lipídios. Entretanto, com o tempo de exposição ao metal, a concentração de MDA apresentou aumento. Outras macrófitas também apresentaram aumento do conteúdo de MDA com o aumento da concentração e tempo de exposição ao Cd (KUMAR e PRASAD, 2004; DOGAN et al., 2018). O maior conteúdo de MDA ocorrido foi na maior concentração de Cd (0,375 mg/L) e isso foi devido ao estresse, afetando o sistema antioxidante. A toxicidade ocasionada pelo Cd (0,375 mg/L) pode ter atingido a produção de pigmentos fotossintético de *R. natans*, visto que houve um decréscimo na produção destes.

O estresse oxidativo induzido por Cd pode levar ao acréscimo da disponibilidade de EROs. Porém, diferente de outros metais, o Cd não atua diretamente na produção de EROs (OLMOS et al., 2003). O Cd, sendo um metal não redox, não pode transferir elétrons individuais, conseqüentemente, não gerando EROs (BENAVIDES et al., 2005). Entretanto, o Cd pode interferir diretamente nas enzimas antioxidantes, resultando em dano oxidativo celular, como a peroxidação lipídica (IANNELLI et al., 2002; GRATAO et al., 2005), devido ao desequilíbrio entre a produção de EROs e sua desintoxicação pelo sistema antioxidante alterado (GOMEZ et al., 1999). Além disso, em concentrações elevadas, o Cd estimula a NADPH oxidase nos peroxissomos pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio, seguido pelo acúmulo de oxigênio celular e hidroperóxido de ácido graxo (HEYNO et al. 2008; GILL e TUTEJA, 2010).

Com 7 dias de exposição a Cu, *R. natans* apresentou aumento no conteúdo de MDA com aumento nas concentrações do metal; no entanto, esse padrão foi seguido de decréscimo no conteúdo de MDA nas menores concentrações (0,002 e 0,009 mg/L) com 14 dias e aumento do MDA na maior concentração (0,385 mg/L). Este aumento imediato do conteúdo de MDA pode se dever ao dano oxidativo induzido por Cu; o Cu catalisa a formação do radical hidroxila (OH) da reação química não enzimática entre O_2^- e H_2O_2 (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1986; SHARMA et al., 2012). O excesso de Cu estimula o acúmulo de EROs, visto que o Cu possui propriedade redox e é capaz de atuar diretamente na produção de EROs, que ao reagir com biomoléculas, induz danos como a peroxidação lipídica da membrana, aumentando o conteúdo de MDA (TEISSEIRE e

GUY, 2000; UPADHYAY e PANDA, 2009). A redução de MDA subsequente ocorrida se deve à ativação do sistema antioxidante.

Houve aumento da produção de MDA com aumento da concentração e tempo de exposição ao Ni. O aumento da peroxidação lipídica (MDA) pode ser decorrente da maior produção de EROs (GRATÃO et al., 2005). Estudo com *Pistia stratiotes* exposta a Ni corrobora com o resultado deste estudo, apresentando aumentos na concentração e na duração da exposição, causando aumento dos níveis de MDA (LEBLEBICI et al., 2019). Conteúdos mais elevados de MDA também foram observados em *Oryza sativa* exposta a 200 e 400 μM de Ni (MAHESHWARI e DUBEY, 2009).

O Ni apresenta afinidades elevadas com os grupos sulfidríla e ligações dissulfeto que causam danos à estrutura secundária das proteínas e também afetam as atividades de enzimas celulares, levando à perturbação de várias vias metabólicas (SIEDLECKA e KRUPA, 2002). Dado que o Ni não é um metal redox-ativo, não pode gerar diretamente EROs, porém, interfere em enzimas antioxidantes (PANDEY e SHARMA, 2002) como SOD, CAT, glutaciona peroxidase (GPOX), glutaciona redutase (GR), peroxidase (POD) e peroxidase de ascorbato (APX). Desse modo, em excesso, o Ni aumenta a concentração de radicais hidroxila, ânions superóxidos, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (SACHAN e LAL, 2017). O aumento na concentração de Ni pode reduzir a atividade de muitas enzimas antioxidantes celulares, conseqüentemente, também, a capacidade das plantas de atuar contra EROs, levando ao acúmulo de EROs e, por fim, estresse oxidativo nas plantas (BHALERAO et al., 2015; PRASAD e SHIVAY, 2019).

O teor de MDA pode indicar informações sobre o mecanismo de defesa antioxidante da planta, e quando se encontra níveis altos de MDA, pode-se inferir que estão sob forte estresse (LEBLEBICI et al., 2019). Em adição, o estresse oxidativo induzido por Ni pode estar associado à competição entre Ni e Fe em processos bioquímicos e fisiológicos e também devido à modulação intercedida por Ni das atividades de enzimas antioxidantes mediadas por Fe (por exemplo, Fe SOD e CAT) (SEREGIN e KOZHEVNIKOVA, 2006; GAJEWSKA e SKŁODOWSKA, 2007)

A membrana plasmática da planta, sendo a primeira estrutura afetada pela toxicidade dos metais, pode sofrer mudanças na composição lipídica ligadas à peroxidação de ácidos graxos insaturados induzida por radicais livres (GROPPA et al., 2001; CUYPERS et al., 2011). Dessa forma, pode ocorrer vazamento de íons (IANNONE

et al., 2010), sendo o extravasamento de eletrólitos um indicador avaliativo de danos na membrana plasmática. *R. natans* exposta a Cd, Cu e Ni apresentou maior extravasamento dos íons com aumento da concentração e tempo de exposição. Esse comportamento pode indicar alteração na fluidez da membrana devido à presença dos metais e produção de EROs. Resultado semelhante foi encontrado em estudos com *S. auriculata* sob ação de Cu, que demonstrou aumento no extravasamento de eletrólitos com aumento de concentração (BIZZO et al. 2014; BARROSO, 2018). Assim, quando ocorre a degradação da membrana celular, ocorre extravasamento de íons presentes na célula, representando a extensão dos danos membranares (BANDEOGLU et al., 2004). Além disso, essa ruptura da membrana biológica leva à redução do turgor celular e a prováveis mudanças na elasticidade da parede celular (GUIMARÃES et al., 2008). O aumento nos extravasamentos iônicos das células por danos causados à membrana plasmática pelos metais tóxicos pode contribuir para o desequilíbrio iônico e/ou causar alterações em proteínas nucleares e DNA, provocar a deterioração oxidativa das macromoléculas biológicas e a peroxidação de lipídeos das membranas (RODRIGUES et al., 2016). Esses danos podem ser consequência de diferentes processos, como as ligações com grupos sulfidríla das proteínas, peroxidação dos lipídeos, inativação de proteínas chave e mudanças na composição e fluidez da membrana lipídica.

O maior extravasamento ocorreu com *R. natans* exposta a Cu em 27 °C após 14 dias de exposição. Com a exposição prolongada ao metal, houve redução significativa no índice de estabilidade da membrana e, portanto, vazamento de eletrólitos (GONÇALVES et al., 2007), o que indica sério dano à integridade das membranas (MORADI e EHSANZADEH 2015).

No presente estudo, levando em consideração o aumento das concentrações de metais e o aumento da duração da exposição, observou-se que as atividades das enzimas foram alteradas e a permeabilidade e integridade da membrana foram afetadas (LEBLEBICI et al., 2019). A alteração nos níveis de EROs também pode atuar como sinalizadores celulares para a regularização dos processos fisiológicos, como adaptação ao estresse abiótico (GECHEV et al., 2005). O estresse oxidativo, quando elevado, aciona o mecanismo de defesa do organismo celular, objetivando restaurar o equilíbrio celular (GRATÃO et al, 2005).

7.4. Crescimento e pigmentos fotossintéticos em *R. natans* sob combinações de metais (Cd, Cu e Ni) e diluições da vinhaça

Nos bioensaios com as diversas combinações de metais (Cd, Cu e Ni), em todas as concentrações selecionadas, não foi possível obter crescimento *R. natans*, visto que houve decréscimo na biomassa e tamanho das plantas em relação ao controle, em todas as combinações testadas. Dessa forma, as combinações dos metais aumentaram a toxidez nas plantas inibindo o seu desenvolvimento e crescimento; apresentando efeito tóxico mais intenso em comparação aos tratamentos com metais individuais. As manifestações de fitotoxicidade por metais são evidenciadas pela redução do crescimento, clorose e necrose das folhas e, posteriormente, sintomas típicos de senescência (SHAW et al., 2004). Esses efeitos atingem diretamente a capacidade de fotossíntese da planta e, conseqüentemente, seu crescimento, sendo eles observados neste estudo em alguns dias de exposição a interação. Estudos com combinações de metais mostraram inibição de crescimento e lesões nos tecidos em *Hordeum vulgare* (GUO; ZHANG; ZHANG, 2007)

Estudo com *L. gibba* exposta as combinações de Ni e Zn e Cd e Zn, mostrou que tais combinações afetaram negativamente o crescimento, reduzindo-o com aumento das concentrações dos metais em interação (MARTINEZ et al., 2019; MARTINEZ et al., 2020). Neste estudo, a *R. natans* não cresceu nem nas menores concentrações das interações (Cd, Cu e Ni). Este fato evidencia que, apesar de o Cu e Ni serem micronutrientes essenciais para as plantas, quando a presença no meio está acima de certos limites causam efeitos deletérios nas plantas vivas (DI MARZIO et al. 2005). Contudo, o Cd não possui funções biológicas, mas é facilmente absorvido pelas plantas; (GAUTAM et al. 2017). Efeitos deletérios de toxicidade como consequência da quantidade excessiva dos metais são observados e estão sendo relacionados às deficiências nutricionais. Os sintomas como clorose pode ser resultado de uma deficiência de Fe ou Mg induzida por Ni, Cd ou Cu, com base no fato de que esses metais têm raios de íons semelhantes entre si (SEREGIN E KOZHEVNIKOVA 2006; GAUTAM et al. 2017). Cada metal pode afetar a planta em diferentes processos como citado, e assim neste estudo o efeito dos metais combinados foram mais deletérios que individualmente.

O comportamento de *R. natans* na exposição às diluições de vinhaça (5,10 e 50%) foi similar à combinação de metais, tendo seus desenvolvimentos e processos fisiológicos prejudicados. *R. natans* nessas condições não cresceu, apresentou redução no crescimento

na biomassa e tamanho, acompanhada de notória clorose e necrose tecidual com menos de 7 dias de exposição. Um estudo com a *Lemna minor* exposta a diversas diluições de vinhaça apresentou 100% de mortalidade com 5 % de vinhaça, portanto sendo tóxico (da SILVA et al, 2018). A vinhaça possui teores altos de matéria orgânica, principalmente sob forma de ácidos orgânicos e, levando-se em conta que na vinhaça se encontram concentrações elevadas de diferentes tipos de metais, estes elementos são capazes de interferir sinergicamente e negativamente no metabolismo (SOUZA, 2014). A redução do crescimento da *R. natans* nessas condições mostrou estar associada à diminuição dos pigmentos fotossintéticos. Com 7 dias de exposição, tanto nas combinações metálicas quanto nas diluições da vinhaça, houve uma queda acentuada na clorofila a, b e carotenoides de *R. natans*.

Nos organismos fotossintetizantes o cloroplasto é um dos locais mais sensíveis à toxicidade pelo excesso de metais (HADAD et al., 2011). A presença destes elementos em conjunto e em excesso podem ocasionar maior degradação, inibindo a captação e o transporte de outros elementos metálicos como Mn, Zn e Fe por efeitos antagonísticos e, portanto, as folhas perdem a capacidade de síntese de pigmentos (DAS et al., 1997; GARDEA-TORRESDEY et al., 2004). Outro evento influenciado pelos metais em pigmentos fotossintéticos é a acumulação desses elementos nos cloroplastos, ocasionando estresse oxidativo, que causa danos como peroxidação de membranas de cloroplasto (SANDALIO et al., 2001; ROMERO-PUERTAS et al., 2004). Os metais em conjunto podem atuar ativando a enzima pigmentar e acelerar a degradação das moléculas de pigmentos (HOU et al., 2007). A combinação de metais ocasionaram inibição em plantas aquáticas como *Hydrilla verticillata*, *Hydrocharis dubia*, *Salvinia natans* (PARK et al, 2011). Entretanto, cada espécie apresentou tolerâncias individuais sob ação de cada metal e tempo de exposição. *Hydrilla verticillata* exposta a interações de metais apresentou redução no crescimento e na produção de clorofila e clorose acentuada (SINGH et al., 2012). Em geral, os metais atingem as membranas biológicas, causando alterações na permeabilidade e seletividade dessas estruturas (SOLANKI e DHANKHAR, 2011). Essas alterações podem ser decorrentes da ação direta do metal ou de espécies reativas de oxigênio (EROs); vez que quando sob estresse há um aumento na produção destes (GRATÃO et al., 2005).

7.5. Respostas de antioxidantes em *R. natans* sob combinações de metais (Cd, Cu e Ni) e diluições da vinhaça

Quando exposta a combinações de metais nas concentrações permitidas pelo Conama, Diretriz Canadense e encontrada na vinhaça, *R. natans* apresentou, em geral, acréscimo no conteúdo de flavonoides, antocianinas e SOD com 7 dias de exposição. Esse aumento pode ser decorrente do deslocamento de energia da planta para a síntese de compostos defensivos para manter-se viva e controlar danos oxidativos membranares. Entretanto, visualmente, a planta apresentou clorose e degradação dos tecidos foliares, indicando que possivelmente houve colapso no seu sistema fotossintético, dado que os conteúdos dos pigmentos fotossintéticos foram reduzidos. Efeitos de combinações metálicas e estudos de interações de mistura em parâmetros bioquímicos como enzimas antioxidantes são bastante escassos para as macrófitas (SHARMA et al. 1999; GUO et al. 2007; MALEVA et al. 2012).

Apesar da escassez, esses resultados também foram verificados em estudos com outras espécies de plantas que apresentaram acréscimos nas atividades de enzimas antioxidantes estimulados por combinações de metais (BALEN et al. 2011; VERSIEREN et al. 2017). Todavia, *R. natans* apresentou diferenças entre as atividades enzimáticas da CAT e SOD, sendo provavelmente dependentes de metais, ocorrendo interferências de metais sobre a ativação/inibição dessas mesmas enzimas (MARTINEZ et al. 2019). No presente trabalho, a atividade SOD foi maior do que CAT; levando-se em conta as afinidades diferenciais para H₂O₂, considerada a ERO mais estável produzida sob estresse metálico, a CAT apresenta muito mais afinidade do que SOD (MARTINEZ et al. 2020). Embora as atividades da enzima antioxidante avaliada tenham aumentado nessas plantas, o desempenho na eliminação de H₂O₂ não foi suficiente para prevenir os efeitos deletérios no crescimento.

As atividades dos antioxidantes também não foram suficientes para minimizar os efeitos das diluições de vinhaça e dos danos celulares oxidativos, sendo as vias fotossintética e de crescimento as mais afetadas neste estudo.

7.6. Estresse oxidativo em *R. natans* sob combinações de metais (Cd, Cu e Ni) e diluições da vinhaça

As plantas *R. natans* expostas as combinações de metais por 7 dias apresentaram clorose, danos nos tecidos e sintomas de senescência. Esses sintomas sugeriram

fitotoxicidade dos metais sobre as planta e degradação tecidual, o que pode ter influenciado nos resultados das análises.

Nas combinações de concentrações permitidas pelo Conama e pela Diretriz Canadense, o conteúdo de MDA e eletrólitos foram menores e semelhantes estatisticamente ao tratamento controle. Esse resultado foi decorrente da ativação de sistemas de defesa antioxidantes, controlando a disponibilidade de EROs e portanto, reduzindo danos membranares e, conseqüentemente, menor conteúdo de MDA. Em certas concentrações, pode ocorrer forte interação ou competição entre os metais pelos mesmos transportadores, podendo causar redução na captação em comparação com quando estão presentes isoladamente (CHERIF et al. 2011).

Nas combinações de metais na concentração da vinhaça, os efeitos tóxicos foram maiores por apresentarem maior conteúdo de MDA e extravasamento de eletrólitos. Esses efeitos podem ser atribuídos pelos metais Cd, Cu e Ni serem íons divalentes e interferirem com outros elementos essenciais, especialmente, quando os transportadores têm afinidades semelhantes para ligação (ANDRESEN et al., 2018). Dessa forma, os metais podem induzir alteração no sistema antioxidante, gerando maior acúmulo de EROs nas células e conseqüentemente danos na membrana celular. Os danos na membrana celular induzem ao acréscimo no conteúdo de MDA e vazamento de íons.

Os indivíduos de *R. natans* expostos as diluições de vinhaça apresentaram fortes sintomas de clorose e degradação com 7 dias de exposição. A diluição de 50% ocasionou redução dos conteúdos de MDA e eletrólitos em *R. natans*. A vinhaça possui elevadas concentrações de diferentes metais, dessa forma a exposição a diluição de 50% pode ter induzido os sistemas antioxidantes que contiveram os danos membranares. Entretanto, tendo em vista a intensa clorose e degradação, é provável que a toxicidade tenha atingido outras vias metabólicas, como a fotossíntese e o desenvolvimento, corroborando com os resultados obtidos para pigmentos fotossintético e crescimento.

Embora os contaminantes existam como misturas e combinações no ambiente, não há consideração quanto à toxicidade das combinações de metais nos procedimentos atuais de avaliação de risco ambiental, uma vez que não é explicitamente incorporado. Melhorar a compreensão dos efeitos da mistura de metais é muito importante para incluir a toxicidade das combinações de metais em estruturas de avaliação de risco em todo o

mundo, que atualmente são baseadas principalmente em toxicidades de metais isolados (NYS et al. 2018).

7.7. Efeitos da variação de temperatura no crescimento e respostas fisiológicas em *R. natans*

A temperatura pode influenciar a química da água, a solubilidade do metal, a absorção de metal pelas plantas e o crescimento das plantas. Além disso, mudanças na composição da membrana e alterações da fluidez da membrana também são respostas comuns das plantas à aclimação térmica (FALKOWSKI E RAVEN, 2013) e estão relacionadas à absorção de contaminantes da água (GOMES E JUNEAU, 2017). Portanto, as mudanças de temperatura têm importantes influências na toxicidade de produtos químicos em sistemas aquáticos e em sua remoção (GOMES E JUNEAU, 2017).

A membrana celular é afetada pelas alterações na temperatura ocorrendo mudanças na composição dos lipídios, modificando a fluidez da membrana da planta, resultando em menor permeabilidade a baixas temperaturas e menor absorção, todavia em maiores temperaturas há maior permeabilidade da membrana. (MARSCHNER, 1995; LYNCH E STEPONKUS, 1987). Na hepática *Dumortiera hirsuta* (Sw.), tanto a captação intracelular quanto a extracelular de Cd foi estimulada por um aumento na temperatura (MAUTSOE e BECKETT, 1996). Dessa forma, estudos têm evidenciado aumento geral da absorção de metal com o aumento da temperatura e provavelmente, este processo atinge as respostas metabólicas e defensivas dos vegetais (FRITIOFF et al., 2005; GOMES et al., 2018). Assim, as mudanças na temperatura podem resultar na modulação do processo passivo e ativo de absorção de metais pelas plantas.

R. natans é uma briófito, hepática, dessa forma tem pouca ou nenhuma cutícula desenvolvida, o que está associado à sua capacidade de reter contaminantes, pois os produtos químicos na superfície das células têm acesso direto aos seus locais de absorção (SHARMA E SACHDEVA, 2015). A temperatura também pode interagir de forma aditiva ou sinérgica com poluentes, acentuando seus efeitos prejudiciais sobre os mecanismos celulares (CHALIFOUR e JUNEAU, 2011). De fato, os efeitos negativos dos metais na *R. natans* foram intensificados nas respostas fisiológicas de extravasamento de eletrólitos e na atividade da enzima SOD sob maior temperatura (27°C).

Um aspecto que indica termo tolerância é o crescimento. O crescimento é mais do que apenas adicionar biomassa e comprimento, envolve metabolismo e reações

bioquímicas. Muitas espécies de briófitas hepáticas possuem o crescimento ideal a 25°C (WAGNER et al., 2013). Os indivíduos *R. natans* do grupo controle a 25 e 27°C não apresentaram diferença nos μ , indicando ausência de danos causados pela diferença de temperatura. Entretanto, no estudo realizado por Gimenes et al (2020), houve redução do μ na biomassa de *R. natans* a 27 °C do tratamento controle. Essa diferença nos μ pode ser ocasionada pela variação fenotípica, proporcionando maior adaptabilidade a variação da temperatura, outra possibilidade é pela seleção dos indivíduos *R. natans* ter ocorrido em diferentes estágios de vida.

Efeitos da temperatura sobre o crescimento de macrófitas aquáticas flutuantes *Salvinia molesta* e *Lemna minor* foram verificados. Em temperaturas entre 25 e 30 °C apresentaram maior crescimento, entretanto a 35°C o crescimento foi reduzido (VAN DER HEIDE et al, 2006), Estudo com *Pistia stratiotes* a 30°C também apresentou crescimento reduzido através da biomassa (CANCIAN et al. 2009). Dessa forma, temperaturas superiores a 30°C podem ser prejudiciais ao desenvolvimento de algumas espécies.

Os grupos de *R. natans* expostos aos metais que apresentaram crescimento não foram significativamente diferentes comparando as temperaturas. Dessa forma, não foi possível notar alterações ocasionadas pelo acréscimo de 2 °C nos coeficientes de crescimento de *R. natans*. Pelo contrário, *R. natans* quando exposta a 0,001 mg/L de Cd e 0,009 mg/L de Cu a 27°C apresentou μ maior que a 25°C. Tendo em vista que o aumento da temperatura pode aumentar as taxas de reações bioquímicas, poderá influenciar a produção e o metabolismo dos organismos vegetais, incluindo a taxa de crescimento das plantas (BORNETTE e PUIJALON, 2011). Diferentemente, estudo com *R. natans* exposta a Al e Mn teve o crescimento através da biomassa afetado negativamente a 27°C comparado ao bioensaio a 25°C (GIMENES et al., 2020). Sendo assim, os danos decorrentes da interação do metal com a temperatura dependem da toxicidade e concentração dos metais.

Em relação às combinações de metais e diluições da vinhaça, não houve muitas diferenças nos danos oxidativos, fotossintéticos nem no crescimento em relação a diferença de temperatura (25°C + 2°C). Independentemente da temperatura, a exposição às combinações de metais resultou em diminuição do conteúdo de pigmentos fotossintéticos e crescimento nas plantas.

Nos tratamentos com metais em que houve crescimento dos indivíduos *R. natans* foi possível calcular o Q_{10} . Em geral, um aumento de 10 °C na temperatura induz à duplicação na velocidade de reações químicas (BOWIE *et al.*, 1985), processo descrito na regra de Van't Hoff, sendo frequentemente adotado o valor de 2 para Q_{10} e em sistemas biológicos, é geralmente entre 2 e 3 (AISAMI *et al.*, 2017). No atual estudo, em geral, os valores de Q_{10} relativos à cinética de crescimento, em geral, foram baixos. Estes resultados sugerem mais uma vez que o crescimento foi principalmente afetado pela presença e exposição a metais.

Os pigmentos fotossintéticos também podem ser afetados pela variação de temperatura, pela alteração na integridade da membrana nos cloroplastos (DHIR, 2013). Muitas espécies de briófitas sob altas temperaturas tem o processo fotossintético limitado, podendo estar relacionado ao estado de ativação de RuBisCO, uma vez que RuBisCO ativase é termolábil (HE *et al.*, 2016). Na avaliação dos pigmentos fotossintéticos de *R. natans* foi observado aumento do teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides nas menores concentrações de metais (Cd, Cu e Ni) a 27°C. *R. natans* exposta a 0,002 e 0,009 mg/L de Cu a 27°C manteve maior produção dos pigmentos clorofila *a* e *b* por até 21 dias, em comparação a 25 °C. Este acréscimo no teor pode ser devido à elevação da temperatura aumentar exponencialmente as taxas de reações bioquímicas da fotossíntese (CARR *et al.*, 1997; TAIZ *et al.*, 2017). Alterações nos atributos fotossintéticos das plantas sob estresse térmico também podem ser consideradas indicadores confiáveis de termo tolerância nas plantas (WAHID *et al.* 2007). Estudo com *Elodea nuttallii* apresentou altas concentrações de clorofila *a* e clorofila *b* quando exposta à temperatura de 30°C indicando uma melhora na produção de pigmentos fotossintéticos. Portanto, foi sugerido que *E. nuttallii* apresentou termo tolerância sob temperatura de 30°C (CHALANIKA DE SILVA e ASAEDA, 2017). Dado que em *R. natans* não houve diferença nem danos no conteúdo de pigmentos fotossintéticos quando comparados ao grupo controle a 25°C e 27°C, sugere-se que *R. natans* apresentou características de tolerância sob acréscimo de 2°C (27°C). É importante destacar que algumas espécies de briófitas apresentam diminuições na fotossíntese e produtividade sob temperaturas superiores a 27 °C (WAGNER *et al.*, 2013), e isto deve ser avaliado para *R. natans*.

Neste estudo, a atividade da enzima antioxidantes SOD foi significativamente maior em plantas cultivadas sob tratamento controle a 27°C em relação ao controle a 25°C, mostrando-se sensível a temperatura. A temperatura modula as atividades enzimáticas,

incluindo ativação, síntese e reparo de moléculas danificadas, neutralizando o dano induzido pela exposição a compostos tóxicos (BICALHO et al., 2017). A atividade de SOD em *R. natans* expostas a metais se manteve alta nas duas temperaturas, é possível que esta tenha controlado os danos causados pelo metal e pela temperatura, contribuindo para redução do MDA.

O antioxidante antocianina em *R. natans* também apresentou acréscimo nas menores concentrações de Ni a 27°C. Este aumento pode ser devido ao Ni participar na síntese deste composto. O aumento da temperatura pode ter disponibilizado mais íons à célula, devido à alteração na permeabilidade da membrana. Dessa forma este antioxidante não enzimático pode também ter contribuído para a proteção contra danos oxidativos.

O extravasamento de eletrólitos foi significativamente maior nas plantas cultivadas sob condições de temperatura elevada (27°C) com Cd e Cu em comparação com as condições de 25°C. Este resultado indica que o aumento da temperatura pode ter acelerado a toxicidade dos metais nas plantas, atingindo negativamente a integridade da membrana plasmática levando ao vazamento de íons, visto que no controle não houve diferença em relação à variação de temperatura. O aumento de extravasamento de eletrólitos também foi constatado em *R. natans* exposta a outros metais (Mn, Al e Zn) a 27°C por Gimenes (2020).

Quando o aumento da temperatura causa estresse na planta, induz a superprodução de EROs, o que gera danos oxidativos (WAHID et al. 2007). Neste estudo o conteúdo de MDA não aumentou com o aumento da temperatura, sugerindo que não houve dano oxidativo induzido por estresse térmico. Tanto a 25°C quanto 27°C, *R. natans* apresentou redução nos conteúdos de MDA, podendo estar associadas ao aumento das atividades dos antioxidantes.

As variações de temperatura são conhecidas por alterar os efeitos de contaminantes químicos em organismos aquáticos e os efeitos de cada estressor (contaminante e temperatura) por si só podem ser atenuados ou exacerbados por suas interações (CHALIFOUR e JUNEAU, 2011; GOMES e JUNEAU, 2017). Tendo em vista mudanças climáticas, como elevação de temperatura, é essencial entender como essa variação na condição ambiental irá modificar a toxicidade dos contaminantes da água (IPCC, 2015; GOMES e JUNEAU, 2017). Nesse contexto, considerando os parâmetros

de crescimento e respostas fisiológicas no tratamento controle e sob estresse metálico avaliados nesse estudo, não houve muita diferença entre a exposição a 25°C e 27°C. Este resultado sugere que a planta *R. natans* apresentou tolerância à variação da temperatura (+ 2°C) nas condições testadas.

8. Conclusões

Os metais Cd, Cu e Ni nas concentrações testadas influenciaram o crescimento e pigmentos fotossintéticos de *R. natans* com o tempo de exposição, apresentando baixos valores de μ e altos de td. Entretanto, o Cd não foi mais tóxico como esperado. As concentrações dos metais encontrados na vinhaça foram tóxicas a *R. natans*, sendo possível avaliar o crescimento por até 14 dias.

A combinação de metais assim como a diluição da vinhaça foi extremamente tóxica a *R. natans*, induzindo clorose e degradação dos tecidos com menos de 7 dias de exposição. Houve perda de biomassa e redução dos pigmentos fotossintéticos. *R. natans* foi sensível a combinações de metais.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a peroxidação lipídica em indivíduos de *R. natans* submetidos às concentrações menores (permitidas pelo Conama e Diretriz Canadense) de Cd, Cu e Ni isoladamente indicam baixo estresse oxidativo, sugerindo adaptabilidade da planta ao estresse causado diretamente pelo metal e EROs. O estresse oxidativo nestas concentrações apresentou baixa toxicidade às células, mostrando que, algumas vezes, elevações transitórias e moderadas dos níveis de EROs são necessárias para a mudança de mecanismos de proteção que induzem à adaptação da planta ao estresse. Sendo assim, podem ocorrer alterações nos sistemas antioxidantes, sendo estimulado como forma de defesa do vegetal para recuperar o equilíbrio. As respostas fisiológicas de *R. natans* expostas aos metais em menores concentrações mostraram eficiência das atividades dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos por controlar os danos oxidativos avaliados pelo MDA e extravasamento de eletrólitos. O estresse oxidativo quando elevado pode ocasionar redução da capacidade antioxidante e fotossintética da planta, o que ocorreu com *R. natans* exposta às maiores concentrações de metais e combinações de metais.

Houve aumento dos compostos antioxidantes durante o estresse metálico em combinações. Entretanto, não foi suficiente para as plantas e suas estratégias de adaptação para lidar com esses estresses. Apesar da atividade antioxidante estarem bastante aumentadas nos meios com combinações de metais, foi observado efeito negativo no crescimento, indicando que os metais estariam exercendo e que este mecanismo antioxidante não foi suficiente para superar a toxicidade.

Não houve diferença significativa nos tratamentos controle no crescimento e parâmetros fisiológicos entre as duas temperaturas. Isto pode indicar a tolerância da *R. natans* a essa variação de temperatura. Apenas a enzima SOD mostrou-se sensível a temperatura. Quando expostas a metais, a modulação de temperatura (+ 2°C) teve pouca influência na toxicidade dos metais nas concentrações avaliadas. Os fatores predominantes de estresse foram as concentrações dos metais e o tempo de exposição.

Através deste estudo foi possível entender o impacto no crescimento e fisiologia da *R. natans* sob exposição de contaminantes, como, a vinhaça e também outros contaminantes contendo concentrações elevadas dos metais deste estudo.

Neste estudo em particular, *R. natans* pode tolerar estresse de metais Cd, Cu e Ni isoladamente em baixas concentrações. Visto que possui um mecanismo eficiente contra o estresse causado por estes metais em concentrações de até 0,01 mg/L Cd, 0,009 mg/L Cu e 0,025 mg/L Ni. As investigações sobre respostas fisiológicas são necessárias para entender a capacidade das plantas tolerarem variadas concentrações de metais, sendo importante para aplicação na fitorremediação de sistemas aquáticos contaminados.

Biomarcadores fisiológicos

COLOCAR PERSPECTIVAS FUTURAS

9. Referências Bibliográficas

Abraham, M. R., & Susan, T. B. (2017). Water contamination with heavy metals and trace elements from Kilembe copper mine and tailing sites in Western Uganda; implications for domestic water quality. *Chemosphere*, *169*, 281-287.

Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., ... & Bharwana, S. A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(11), 8148-8162.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 2004. Toxicological profile for DDT/DDD/DDE. US Public Health Service, Atlanta, GA. Bonassi, S., Znaor, A

Ahmad, P., Nabi, G., & Ashraf, M. (2011). Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. *South African Journal of Botany*, *77*(1), 36-44.

Aisami, A., Yasid, N. A., Johari, W. L. W., & Shukor, M. Y. (2017). Estimation of the Q10 value; the temperature coefficient for the growth of *Pseudomonas* sp. aq5-04 on phenol. *Bioremediation Science and Technology Research*, *5*(1), 24-26.

Alaoui-Sossé, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D., & Badot, P. M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, *166*(5), 1213-1218.

Ali, S., Abbas, Z., Rizwan, M., Zaheer, I. E., Yavaş, İ., Ünay, A., ... & Kalderis, D. (2020). Application of Floating Aquatic Plants in Phytoremediation of Heavy Metals Polluted Water: A Review. *Sustainability*, *12*(5), 1927.

Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, *91*(7), 869-881.

Andresen, E., Peiter, E., & Küpper, H. (2018). Trace metal metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*, *69*(5), 909-954.

- Aravind, P., & Prasad, M. N. V. (2005). Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and biochemistry*, *43*(2), 107-116.
- Arellano, J. B., Lázaro, J. J., López-Gorgé, J., & Baron, M. (1995). The donor side of photosystem II as the copper-inhibitory binding site. *Photosynthesis Research*, *45*(2), 127-134.
- Azevedo, F. D., & Chasin, A. D. M. (2003). As bases toxicológicas da ecotoxicologia. *São Carlos, SP: RiMa, 2004*, 30-36.
- Babu, T. S., Akhtar, T. A., Lampi, M. A., Tripuranthakam, S., Dixon, D. G., & Greenberg, B. M. (2003). Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: implication of reactive oxygen species as common signals. *Plant and Cell Physiology*, *44*(12), 1320-1329.
- Balen, B., Tkalec, M., Šikić, S., Tolić, S., Cvjetko, P., Pavlica, M., & Vidaković-Cifrek, Ž. (2011). Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. *Ecotoxicology*, *20*(4), 815-826.
- Barroso, L. M. (2018). Interação de planta aquática e microrganismos promotores do crescimento vegetal resistentes a cobre. Dissertação.
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany*, *65*(5), 1229-1240.
- Bhalerao, S. A., Sharma, A. S., & Poojari, A. C. (2015). Toxicity of nickel in plants. *Int. J. Pure App. Biosci*, *3*(2), 345-355.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian journal of plant physiology*, *17*(1), 21-34.
- Bianchini, I., Cunha-Santino, M. B. D., Milan, J. A. M., Rodrigues, C. J., & Dias, J. H. P. (2010). Growth of *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle under controlled conditions. *Hydrobiologia*, *644*(1), 301-312.
- Bicalho, E. M., Gomes, M. P., Rodrigues-Junior, A. G., Oliveira, T. G. S., Gonçalves, C. D. A., Fonseca, M. B., & Garcia, Q. S. (2017). Integrative effects of zinc and temperature

on germination in *Dimorphandra wilsonii* rizz.: implications of climate changes. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(8), 2036-2042.

Bielmyer-Fraser, G. K., Waters, M. N., Duckworth, C. G., Patel, P. P., Webster, B. C., Blocker, A., ... & Ragan, J. T. (2017). Assessment of metal contamination in the biota of four rivers experiencing varying degrees of human impact. *Environmental monitoring and assessment*, 189(1), 23.

Bizzo, A. L. T., Intorne, A. C., Gomes, P. H., Suzuki, M. S., & Esteves, B. D. S. (2014). Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 26(3), 268-277.

Bjerregaard, P., Andersen, C. B., & Andersen, O. (2015). Ecotoxicology of metals—sources, transport, and effects on the ecosystem. In *Handbook on the Toxicology of Metals* (pp. 425-459). Academic Press.

Boonyapookana, B., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., & Singhakaew, S. (2002). Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duckweed *Wolffia globosa*. *International Journal of Phytoremediation*, 4(2), 87-100

Bornette, G., & Puijalón, S. (2011). Response of aquatic plants to abiotic factors: a review. *Aquatic sciences*, 73(1), 1-14.

Bowie, G. L., Mills, W. B., Porcella, D. B., Campbell, C. L., Pagenkopf, J. R., Rupp, G. L., ... & Barnwell, T. O. (1985). Rates, constants, and kinetics formulations in surface water quality modeling. *EPA*, 600, 3-85.

Cancian, L. F., Camargo, A. F. M., & Silva, G. H. G. (2009). Crescimento de *Pistia stratiotes* em diferentes condições de temperatura e fotoperíodo. *Acta Botanica Brasilica*, 23(2), 552-557.

Carvalho, M. T. V., Pongrac, P., Mumm, R., van Arkel, J., van Aelst, A., Jeromel, L., ... & Aarts, M. G. (2015). *Gomphrena claussenii*, a novel metal-hypertolerant bioindicator species, sequesters cadmium, but not zinc, in vacuolar oxalate crystals. *New Phytologist*, 208(3), 763-775.

- Carr, G. M., Duthie, H. C., & Taylor, W. D. (1997). Models of aquatic plant productivity: a review of the factors that influence growth. *Aquatic Botany*, 59(3-4), 195-215.
- Cempel, M., & Nickel, G. J. P. J. S. (2006). Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(3).
- CETESB–COMPANHIA, D. T. D. S. (2007). AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. 2008. *Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo em*.
- Chalanika De Silva, H. C., & Asaeda, T. (2017). Effects of heat stress on growth, photosynthetic pigments, oxidative damage and competitive capacity of three submerged macrophytes. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 228-236.
- Chalifour, A., & Juneau, P. (2011). Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine. *Aquatic Toxicology*, 103(1-2), 9-17.
- Chaney, R. L., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., & Baker, A. J. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current opinion in Biotechnology*, 8(3), 279-284.
- Cherif, J., Mediouni, C., Ammar, W. B., & Jemal, F. (2011). Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 837-844.
- Chinmayee, M. D., Stephan, P., Anu, M. S., Sheeba, A. M., Mini, I., & Swapna, T. S. (2013). Cadmium stress on antioxidant activity of two *Alternanthera* sp.
- Chiodi Boudet, L. N., Escalante, A. H., Von Haeften, G., Moreno, V., & Gerpe, M. S. (2011). Assessment of heavy metal accumulation in two aquatic macrophytes: a field study.
- Christofoletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste management*, 33(12), 2752-2761.
- Clayton, J. (1998). New Zealand native plants for use in aquariums and ponds. *Website: www.thekrib.com/Plants/Plants/NZ/(accessed October, 2009)*.

- Clemens, S., Palmgren, M. G., & Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science*, 7(7), 309-315.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88(11), 1707-1719.
- CONAMA, R. (2005). 357/2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.*
- Costa, M. B. (2014). Efeitos do cobre na macrófita *Potamogeton pectinatus L.* e sua possível utilização o monitoramento ou remediação de ambientes aquáticos contaminados por este metal (Master's thesis).
- Cuyper, A., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., ... & Jaco, V. (2011). The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of plant physiology*, 168(4), 309-316.
- Dalla Vecchia, F., La Rocca, N., Moro, I., De Faveri, S., Andreoli, C., & Rascio, N. (2005). Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. *Plant science*, 168(2), 329-338.
- Das, P., Samantaray, S., & Rout, G. R. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental pollution*, 98(1), 29-36.
- Daud, M. K., Ali, S., Abbas, Z., Zaheer, I. E., Riaz, M. A., Malik, A., ... & Zhu, S. J. (2018). Potential of duckweed (*Lemna minor*) for the phytoremediation of landfill leachate. *Journal of Chemistry*, 2018.
- Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P. P., & Nasim, S. A. (2009). Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6), 1790-1797.
- Dhir, B., Sharmila, P., & Saradhi, P. P. (2009 b). Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(9), 754-781.

Dhir, B. (2013). *Phytoremediation: Role of aquatic plants in environmental clean-up* (Vol. 14). New Delhi: Springer.

Dhote, S., & Dixit, S. (2009). Water quality improvement through macrophytes—a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 152(1-4), 149-153.

Ding, B., Shi, G., Xu, Y., Hu, J., & Xu, Q. (2007). Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb leaves to cadmium stress. *Environmental pollution*, 147(3), 800-803.

Di Marzio, W. D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M., & Silvana, G. (2005). Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 61(3), 380-391.

Dogan, M., Karatas, M., & Aasim, M. (2018). Cadmium and lead bioaccumulation potentials of an aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L.: a laboratory study. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, 431-440.

Epstein E, Bloom JA (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspective, 2nd edn. Sinauer, Sunderland.

Esteves, FA. (1998). *Fundamentos de limnologia*. Interciência, p 602.

Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2013). *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press.

Fernandes, J. C., & Henriques, F. S. (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The botanical review*, 57(3), 246-273.

Finkel, Z. V., Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T. A. V., & Raven, J. A. (2010). Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of plankton research*, 32(1), 119-137.

Freeman, J. L., Persans, M. W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I. J., & Salt, D. E. (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *The Plant Cell*, 16(8), 2176-2191.

- Fusari, L. M. (2006). Estudo das comunidades de macroinvertebrados bentônicos das Represas do Monjolinho e do Fazzari no campus da UFSCar, município de São Carlos, SP.
- Fritioff, Å., Kautsky, L., & Greger, M. (2005). Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants. *Environmental pollution*, 133(2), 265-274.
- Gadd, G. M. (1990). Biosorption. *Chemistry and Industry (London)*, (13), 421-426.
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147-163.
- Galal, T. M., Eid, E. M., Dakhil, M. A., & Hassan, L. M. (2018). Bioaccumulation and rhizofiltration potential of *Pistia stratiotes* L. for mitigating water pollution in the Egyptian wetlands. *International journal of phytoremediation*, 20(5), 440-447.
- Gall, J. E., Boyd, R. S., & Rajakaruna, N. (2015). Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental monitoring and assessment*, 187(4), 201.
- Gajewska, E., & Skłodowska, M. (2007). Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals*, 20(1), 27-36.
- Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., De la Rosa, G., & Corral-Diaz, B. (2004). Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresource technology*, 92(3), 229-235.
- Gautam, R. K.; et al (2014). In: Sharma, Sanjay. Heavy metals in water: presence, removal and safety. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 380 p.
- Gautam, S., Rathoure, A. K., Chhabra, A., & Pandey, S. N. (2017). Effects of nickel and zinc on biochemical parameters in plants-a review. *Octa Journal of Environmental Research*, 5(1).
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., & Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28(11), 1091-1101.

- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2), 309-314.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gimenes, L. L. S., Freschi, G. P. G., Júnior, B. I., & da Cunha Santino, M. B. (2020). Growth of the aquatic macrophyte *Ricciocarpos natans* (L.) Corda in different temperatures and in distinct concentrations of aluminum and manganese. *Aquatic Toxicology*, 105484.
- Gimenes, L. L. S. (2020). Efeitos da temperatura e da contaminação de rejeitos da mineração no crescimento e na fisiologia de *Ricciocarpos natans* (L.) Corda. Tese.
- Glime, J. M. (2017) Temperature: Effects. *Bryophyte Ecology*. [S.l.]: Michigan Technological University and International Association of Bryologists, 1, 25. Disponível em: <https://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology/>.
- Gomes, M. P., & Juneau, P. (2017). Temperature and light modulation of herbicide toxicity on algal and cyanobacterial physiology. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 50.
- Gomes, M. P., de Brito, J. C. M., Bicalho, E. M., Silva, J. G., de Fátima Gomides, M., Garcia, Q. S., & Figueredo, C. C. (2018). Ciprofloxacin vs. temperature: Antibiotic toxicity in the free-floating liverwort *Ricciocarpus natans* from a climate change perspective. *Chemosphere*, 202, 410-419.
- Gomez, J. M., Hernandez, J. A., Jimenez, A., Del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1999). Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research*, 31(sup1), 11-18.
- Guilherme, L. R. G., Marques, J. J., Pierangeli, M. A. P., ZULIANI, D. Q., CAMPOS, M. L., & MARCHI, G. (2005). Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. *Tópicos em ciências do solo*, 4, 345-390.

- Guimarães, M. D. A., Santana, T. A., Silva, E. V., Zenzen, I. L., & Loureiro, M. E. (2008). Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, 2, 58-68.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional plant biology*, 32(6), 481-494.
- Groppa, M. D., Tomaro, M. L., & Benavides, M. P. (2001). Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science*, 161(3), 481-488.
- Guo, T. R., Zhang, G. P., & Zhang, Y. H. (2007). Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 57(2), 182-188.
- Hadad, H. R., Maine, M. A., Mufarrege, M. M., Del Sastre, M. V., & Di Luca, G. A. (2011). Bioaccumulation kinetics and toxic effects of Cr, Ni and Zn on *Eichhornia crassipes*. *Journal of hazardous materials*, 190(1-3), 1016-1022.
- Hall, D. S., Lockwood, D. J., Bock, C., & MacDougall, B. R. (2015). Nickel hydroxides and related materials: a review of their structures, synthesis and properties. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 471(2174), 20140792.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 219(1), 1-14.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Hamed, K. B., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A., & Abdelly, C. (2007). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regulation*, 53(3), 185-194.
- Hanikenne, M., & Nouet, C. (2011). Metal hyperaccumulation and hypertolerance: a model for plant evolutionary genomics. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 252-259.

- Hänsch, R., & Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3), 259-266.
- Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Al Huqail, A. A., Egamberdieva, D., & Wirth, S. (2016). Alleviation of cadmium stress in *Solanum lycopersicum* L. by arbuscular mycorrhizal fungi via induction of acquired systemic tolerance. *Saudi journal of biological sciences*, 23(2), 272-281.
- He, X., He, K. S., & Hyvönen, J. (2016). Will bryophytes survive in a warming world?. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 19, 49-60.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- Heyno, E., Klose, C., & Krieger-Liszkay, A. (2008). Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytologist*, 179(3), 687-699.
- Hoseini, S. M., & Zargari, F. (2013). Cadmium in plants: a review. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2(17), 579-581.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., & Chang, C. C. (2007). Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant physiology and biochemistry*, 45(1), 62-69.
- Iannelli, M. A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., & Massacci, A. (2002). Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(11), 977-982.
- IPCC. (2018). Global warming of 1.5°C: Summary for Policymakers. *Intergovernmental Panel on climate change*, p. 3–26. Disponível em: https://report.ipcc.ch/sr15/pdf/sr15_spm_final.pdf.
- Jaffré, T., Pillon, Y., Thomine, S., & Merlot, S. (2013). The metal hyperaccumulators from New Caledonia can broaden our understanding of nickel accumulation in plants. *Frontiers in plant science*, 4, 279.

- Jia, L., Liu, Z., Chen, W., Ye, Y., Yu, S., & He, X. (2015). Hormesis Effects Induced by Cadmium on Growth and Photosynthetic Performance in a Hyperaccumulator, *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(1), 13-21.
- Juan, M., Rivero, R. M., Romero, L., & Ruiz, J. M. (2005). Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 54(3), 193-201.
- Kacienė, G., Milčė, J. Ž. E., & Juknys, R. (2015). Role of oxidative stress on growth responses of spring barley exposed to different environmental stressors. *Journal of Plant Ecology*, 8(6), 605-616.
- Kamal, M., Ghaly, A. E., Mahmoud, N., & Cote, R. (2004). Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environment international*, 29(8), 1029-1039.
- Köhl, K. I., & Lösch, R. (2004). Experimental characterisation of metal tolerance. In *Heavy Metal Stress in Plants* (pp. 434-454). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J., & Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379(6566), 635-638.
- Kummerová, M., Zezulka, Š., Kráľová, K., & Masarovičová, E. (2010). Effect of zinc and cadmium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita*. *Biologia Plantarum*, 54(2), 308-314.
- Kumar, G. P., & Prasad, M. N. V. (2004). Cadmium toxicity to *Ceratophyllum demersum* L.: Morphological symptoms, membrane damage, and ion leakage. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 72(5), 1038-1045.
- Küpper, H., Küpper, F., & Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, 47(2), 259-266.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F. J., Wieshammer, G., & McGrath, S. P. (2001). Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum*

bertolonii and *Thlaspi goesingense*. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2291-2300.

Küpper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtilek, M., & Šetlík, I. (2007). Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 175(4), 655-674.

Leblebici, Z., Dalmiş, E., & Andeden, E. E. (2019). Determination of the potential of *Pistia stratiotes* L. in removing nickel from the environment by utilizing its rhizofiltration capacity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62.

Leitenmaier, B., & Küpper, H. (2013). Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Frontiers in plant science*, 4, 374.

Leyva-Ramos, R., Rangel-Mendez, J. R., Mendoza-Barron, J., Fuentes-Rubio, L., & Guerrero-Coronado, R. M. (1997). Adsorption of cadmium (II) from aqueous solution onto activated carbon. *Water Science and Technology*, 35(7), 205-211.

Licthenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic apparatus biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 349-382.

Limons, R. D. S. (2008). Avaliação do potencial de utilização da macrófita aquática seca *Salvinia* sp. no tratamento de efluentes de fecularia.

Lin, H., Liu, J., Dong, Y., Ren, K., & Zhang, Y. (2018). Absorption characteristics of compound heavy metals vanadium, chromium, and cadmium in water by emergent macrophytes and its combinations. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(18), 17820-17829.

Lynch, D. V., & Steponkus, P. L. (1987). Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology*, 83(4), 761-767.

Mackie, K. A., Müller, T., & Kandeler, E. (2012). Remediation of copper in vineyards—a mini review. *Environmental Pollution*, 167, 16-26.

Maheshwari, R., & Dubey, R. S. (2009). Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant growth regulation*, 59(1), 37-49.

- Maksymiec, W. (1998). Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica*, 34(3), 321-342.
- Malec, P., Mysliwa-Kurdziel, B., Prasad, M. N. V., Waloszek, A., & Strzałka, K. (2011). Role of aquatic macrophytes in biogeochemical cycling of heavy metals, relevance to soil-sediment continuum detoxification and ecosystem health. In *Detoxification of Heavy Metals* (pp. 345-368). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Maleva, M. G., Nekrasova, G. F., Malec, P., Prasad, M. N. V., & Strzałka, K. (2009). Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure. *Chemosphere*, 77(3), 392-398.
- Maleva, M. G., Nekrasova, G. F., Borisova, G. G., Chukina, N. V., & Ushakova, O. S. (2012). Effect of heavy metals on photosynthetic apparatus and antioxidant status of *Elodea*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 190-197.
- Marschner, H. (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
- Martinez, R. S., Sáenz, M. E., Alberdi, J. L., & Di Marzio, W. D. (2019). Comparative ecotoxicity of single and binary mixtures exposures of nickel and zinc on growth and biomarkers of *Lemna gibba*. *Ecotoxicology*, 28(6), 686-697.
- Martinez, S., Sáenz, M. E., Alberdi, J. L., & Di Marzio, W. D. (2020). Comparative ecotoxicity of single and binary mixtures exposures of cadmium and zinc on growth and biomarkers of *Lemna gibba*. *Ecotoxicology (London, England)*.
- Mautsoe, P. J., & Beckett, R. P. (1996). A preliminary study of the factors affecting the kinetics of cadmium uptake by the liverwort *Dumortiera hirsuta*. *South African Journal of Botany*, 62(6), 332-336.
- Megateli, S., Semsari, S., & Couderchet, M. (2009). Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(6), 1774-1780.
- Meir, S., Philosoph-Hadas, S., & Aharoni, N. (1992). Ethylene-increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during senescence of parsley by a

newly developed method. *Journal of the American Society for Horticultural science*, 117(1), 128-132.

Metwally, A., Safronova, V. I., Belimov, A. A., & Dietz, K. J. (2005). Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 167-178.

Meyer, J. S., Farley, K. J., & Garman, E. R. (2015). Metal mixtures modeling evaluation project: 1. Background. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(4), 726-740.

Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. U. L. T. A. N., & Mittler, R. O. N. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.

Mishra, V. K., & Tripathi, B. D. (2008). Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource technology*, 99(15), 7091-7097.

Moradi, L., & Ehsanzadeh, P. (2015). Effects of Cd on photosynthesis and growth of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. *Photosynthetica*, 53(4), 506-518.

Mulrooney, S. B., & Hausinger, R. P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 239-261.

Myśliwa-Kurdziel, B., Prasad, M. N. V., & Strzałka, K. (2004). Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In *Heavy Metal Stress in Plants* (pp. 146-181). Springer, Berlin, Heidelberg.

Núñez, S. R., Negrete, J. M., Rios, J. A., Hadad, H. R., & Maine, M. A. (2011). Hg, Cu, Pb, Cd, and Zn accumulation in macrophytes growing in tropical wetlands. *Water, Air, & Soil Pollution*, 216(1-4), 361-373.

Nys, C., Van Regenmortel, T., Janssen, C. R., Oorts, K., Smolders, E., & De Schamphelaere, K. A. (2018). A framework for ecological risk assessment of metal mixtures in aquatic systems. *Environmental toxicology and chemistry*, 37(3), 623-642.

Oliveira, J. A. D., Cambraia, J., Cano, M. A. O., & Jordão, C. P. (2001). Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(3), 329-341.

- Olmos, E., Martínez-Solano, J. R., Piqueras, A., & Hellín, E. (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany*, *54*(381), 291-301.
- Panda, S. K., & Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian journal of plant physiology*, *17*(1), 95-102.
- Pandey, N., & Sharma, C. P. (2002). Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, *163*(4), 753-758.
- Park, S., Kang, D., Kim, Y., Lee, S. M., Chung, Y., & Sung, K. (2011). Biosorption and growth inhibition of wetland plants in water contaminated with a mixture of arsenic and heavy metals. *Engineering in Life sciences*, *11*(1), 84-93.
- Patsikka, E. (2002). Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition by outcompeting iron and causing decreases in leaf chlorophyll. *Plant Physiol.*, *129*, 1-9.
- Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P. R., & Moreira, M. A. (1999). Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, *11*(3), 137-143.
- Pereira, M. P., de Almeida Rodrigues, L. C., Corrêa, F. F., de Castro, E. M., Ribeiro, V. E., & Pereira, F. J. (2016). Cadmium tolerance in *Schinus molle* trees is modulated by enhanced leaf anatomy and photosynthesis. *Trees*, *30*(3), 807-814.
- Pereira, F. J., de Castro, E. M., Pires, M. F., de Oliveira, C., & Pasqual, M. (2017). Anatomical and physiological modifications in water hyacinth under cadmium contamination. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *90*.
- Perl-Treves, R., & Perl, A. (2002). Oxidative stress: an introduction. *Oxidative stress in plants*, 1-32.
- Petrucio, M. M., & Esteves, F. A. (2000). Uptake rates of nitrogen and phosphorus in the water by *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata*. *Revista Brasileira de Biologia*, *60*(2), 229-236.

- Pietrini, F., Iannelli, M. A., Pasqualini, S., & Massacci, A. (2003). Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant physiology*, 133(2), 829-837.
- Pilon-Smits, E. A., Zhu, Y. L., Sears, T., & Terry, N. (2000). Overexpression of glutathione reductase in *Brassica juncea*: effects on cadmium accumulation and tolerance. *Physiologia plantarum*, 110(4), 455-460.
- Pompêo, M. (2008). Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. *Oecologia brasiliensis*, 12(3), 5.
- Pott, V. J., & Pott, A. (2000). *Plantas aquáticas do Pantanal*. Brasília: EMBRAPA Comunicação para transferência de Tecnologia.
- Prasad, R., & Shivay, Y. S. (2019). Nickel in Environment and Plant Nutrition: A Mini Review. *International Journal of Plant and Environment*, 5(04).
- Press, W. H. et al. 1993. *Numerical recipes in C: The art of scientific computing*. 2. ed. New York, U.S.A: [s.n.], v. 16.
- Proença, M. A., de Oliveira, L. L. D., & Rocha, O. (2012). Efeito tóxico do cobre sobre o crescimento da macrófita aquática *Lemna minor*. *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista*, 8(12).
- Quartacci, M. F., Cosi, E., & Navari-Izzo, F. (2001). Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *Journal of Experimental Botany*, 52(354), 77-84.
- Ragsdale, S. W. (1998). Nickel biochemistry. *Current opinion in chemical biology*, 2(2), 208-215.
- Rai, U. N., Sinha, S., Tripathi, R. D., & Chandra, P. (1995). Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: removal of heavy metals. *Ecological engineering*, 5(1), 5-12.
- Rial, A., & Lasso, C. A. (1998). *Ricciocarpos natans* (L.) Corda (Ricciaceae) in Venezuela: taxonomical and habitat observations. *Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*, 58(149), 85-88.

- Rahman, I. M., & Hasegawa, H. (Eds.). (2012). *Water stress*. BoD–Books on Demand.
- Rauser, W. E. (1995). Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology*, *109*(4), 1141.
- Rodrigues, A. C. D., dos Santos, A. M., dos Santos, F. S., Pereira, A. C. C., & Sobrinho, N. M. (2016). Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: Possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. *Revista Virtual de Química*, *8*(1), 262-276
- Redjala, T., Sterckeman, T., & Morel, J. L. (2009). Cadmium uptake by roots: contribution of apoplast and of high-and low-affinity membrane transport systems. *Environmental and Experimental Botany*, *67*(1), 235-242.
- Romero-Puertas, M. C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F. J., Gomez, M. D., Del Rio, L. A., & Sandalio, L. M. (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂^{·-} and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell & Environment*, *27*(9), 1122-1134.
- Ruiz, A. M. (2008). *Ricciocarpus natans* (Marchantiophyta), una hepática acuática en México. *ContactoS*, *70*, 67-70.
- Sachan, P., & Lal, N. (2017). An overview of nickel (Ni²⁺) essentiality, toxicity and tolerance strategies in plants. *Asian Journal of Biology*, 1-15.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., & Del Rio, L. A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of experimental botany*, *52*(364), 2115-2126.
- Santos, M. G. D. (2009). Decomposição aeróbia de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. e caracterização limnológica na bacia hidrográfica do rio do Monjolinho (São Carlos, SP, Brasil).
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, *101*(1), 7.
- Schiavone, D. C. (2019). Decomposição in situ de macrófitas aquáticas: influência das características de diferentes ecossistemas, atividade celulolítica e interação de macroinvertebrados.

Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L., & Polle, A. (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in *Scots pine* roots. *Plant physiology*, 127(3), 887-898.

Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian journal of plant physiology*, 48(4), 523-544.

Seregin, I., & Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2), 257-277.

Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment international*, 31(5), 739-753.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

Siedlecka, A., & Krupa, Z. (2002). Functions of enzymes in heavy metal treated plants. In *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants* (pp. 303-324). Springer, Dordrecht.

da Silva, A. F., Carraschi, S. P., Gírio, A. C. F., Neto, A. N., & PITELLI, R. (2018). Ecotoxicidade da vinhaça para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) e para a macrófita lentilha d'água (*Lemna minor*). *Boletim do Instituto de Pesca*, 41(3), 557-565.

Singh, V. P. (1995). Toxic metal cadmium: phytotoxicity and tolerance in plants. *Advances in environmental science technology*. New Delhi: Ashish Publication House, 225-256.

Sinha, S., Singh, S., Mallick, S., & Sinam, G. (2009). Role of antioxidants in Cr tolerance of three crop plants: metal accumulation in seeds. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(4), 1111-1121.

Sisinno, C. L. S., & Oliveira-Filho, E. C. (2013). Princípios de toxicologia ambiental. In *Princípios de toxicologia ambiental* (pp. 198-198).

Sivaci, A., Elmas, E., Gümüş, F., & Sivaci, E. R. (2008). Removal of cadmium by *Myriophyllum heterophyllum* Michx. and *Potamogeton crispus* L. and its effect on pigments and total phenolic compounds. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(4), 612-618.

Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment international*, 31(5), 739-753.

Shanmugaraj, B. M., Malla, A., & Ramalingam, S. (2019). Cadmium stress and toxicity in plants: an overview. In *Cadmium toxicity and tolerance in plants* (pp. 1-17). Academic Press.

Sharma, A., & Sachdeva, S. (2015). Cadmium toxicity and its phytoremediation: A review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 6(9), 395-405.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

Shaw, B. P., Sahu, S. K., & Mishra, R. K. (2004). Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In *Heavy metal stress in plants* (pp. 84-126). Springer, Berlin, Heidelberg.

Solanki, R., & Dhankhar, R. (2011). Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. *Biologia*, 66(2), 195-204.

Souza, M. A. D. *Efeitos da suplementação de metais traço no processamento da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios mesofílicos em batelada* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Song, Y., Zhang, L. L., Li, J., He, X. J., Chen, M., & Deng, Y. (2018). High-potential accumulation and tolerance in the submerged hydrophyte *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle for nickel-contaminated water. *Ecotoxicology and environmental safety*, 161, 553-562.

Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R. D., Dwivedi, S., & Gupta, D. K. (2006). Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. *Aquatic Toxicology*, 80(4), 405-415.

- Srivastava, S., & Shrivastava, M. (2017). Zinc supplementation imparts tolerance to arsenite stress in *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. *International Journal of Phytoremediation*, 19(4), 353-359.
- Sulaymon, A. H., Mohammed, A. A., & Al-Musawi, T. J. (2013). Competitive biosorption of lead, cadmium, copper, and arsenic ions using algae. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 3011-3023.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., & Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta physiologiae plantarum*, 35(4), 985-999.
- Tanner, C. C. (2001). Plants as ecosystem engineers in subsurface-flow treatment wetlands. *Water Science and Technology*, 44(11-12), 9-17.
- Tanwir, K., Javed, M. T., Shahid, M., Akram, M. S., Haider, M. Z., Chaudhary, H. J., ... & Lindberg, S. (2020). Ecophysiology and Stress Responses of Aquatic Macrophytes Under Metal/Metalloid Toxicity. In *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives I* (pp. 485-511). Springer, Singapore.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p. TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2009). Transporte de soluto. *Taiz L, Zeiger E. Fisiologia vegetal. In Fisiologia vegetal. Artmed*, 131-139.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora.
- Teisseire, H., & Guy, V. (2000). Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant science*, 153(1), 65-72.
- Tripathi, R. D., & Smith, S. (2000). Effect of Chromium (VI) on Growth and Physiology of Giant Duckweed *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. In *Environmental Stress: Indication, Mitigation and Eco-conservation* (pp. 195-205). Springer, Dordrecht.

- Tundisi, J. G., & Barbosa, F. A. R. (2008). Conservação e uso sustentável de recursos hídricos. *Ângulos da água: desafios da integração. Belo Horizonte: Editora UFMG*, 157-83.
- Tüzen, M. (2003). Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food chemistry*, 80(1), 119-123.
- Ugya, A. Y., Imam, T. S., & Tahir, S. M. (2015). The use of *Pistia stratiotes* to remove some heavy metals from Romi stream: A case study of Kaduna Refinery and Petrochemical company polluted stream. *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol*, 9, 48-51.
- Upadhyay, R. K., & Panda, S. K. (2009). Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Comptes rendus biologiques*, 332(7), 623-632.
- Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Ali, M. B., & Singh, S. N. (2000). Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, 41(7), 1075-1082.
- Vaitsman, D. S., Dutra, P. B., & Afonso, J. C. (2001). *Para que servem os elementos químicos*. Interciencia.
- Van Assche, F., & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment*, 13(3), 195-206.
- Van der Heide, T., Roijackers, R. M., Van Nes, E. H., & Peeters, E. T. (2006). A simple equation for describing the temperature dependent growth of free-floating macrophytes. *Aquatic Botany*, 84(2), 171-175.
- Vaz, A. J., & Lima, I. V. D. (2003). Imunotoxicologia dos metais. *Metais Gerenciamento da Toxicidade: Editora Aterem*, 399-414.
- Vecchia, FD., La Rocca, N., Moro, I., De Faveri, S., Andreoli, C., & Rascio, N. (2005). Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. *Plant science*, 168(2), 329-338.

- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., & Hitmi, A. (2007). Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere*, 68(8), 1563-1575.
- Versieren, L., Evers, S., AbdElgawad, H., Asard, H., & Smolders, E. (2017). Mixture toxicity of copper, cadmium, and zinc to barley seedlings is not explained by antioxidant and oxidative stress biomarkers. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(1), 220-230.
- Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology*, 64(1), 88-93.
- Wagner, S., Zotz, G., Salazar Allen, N., & Bader, M. Y. (2013). Altitudinal changes in temperature responses of net photosynthesis and dark respiration in tropical bryophytes. *Annals of botany*, 111(3), 455-465.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.
- Wang, P., Wang, C., Ouyang, P., Qian, J., & Shi, R. (2011). Physiological responses of *Vallisneria spiralis* L. induced by different hydraulic conditions when exposed to copper and nitrogen. *African Journal of Biotechnology*, 10(38), 7441-7452.
- Wang, C., Lu, J., Zhang, S., Wang, P., Hou, J., & Qian, J. (2011b). Effects of Pb stress on nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte *Vallisneria natans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1297-1303.
- Wetzel, R. G. (1981). *Limnología* (No. 504.45 WET).
- [WHO] World Health Organization. (2004). *The World health report: 2004: changing history*. World Health Organization.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., & Stoffella, P. J. (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4), 339-353.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145-156.

- Yruela, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(5), 409-430.
- Yruela, I. (2013). Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics*, 5(9), 1090-1109.
- Zagatto, P. A. (2008). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações* (Vol. 478). E. Bertoletti (Ed.). São Carlos: Rima.
- Zavoda, J., Cutright, T., Szpak, J., & Fallon, E. (2001). Uptake, selectivity, and inhibition of hydroponic treatment of contaminants. *Journal of Environmental Engineering*, 127(6), 502-508.
- Zechmeister, H. G., Grodzińska, K., & Szarek-Łukaszewska, G. (2003). Bryophytes. In *Trace Metals and other Contaminants in the Environment* (Vol. 6, pp. 329-375). Elsevier.
- Zhang, H., Zhang, L. L., Li, J., Chen, M., & An, R. D. (2020). Comparative study on the bioaccumulation of lead, cadmium and nickel and their toxic effects on the growth and enzyme defence strategies of a heavy metal accumulator, *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13.

10. Apêndice 1

Tabela 5. Variáveis limnológicas em *Ricciocarpus natans* nos bioensaios de tratamento controle, exposição a diferentes concentrações de metais, individuais e em combinações, e diluições da vinhaça, em 25 °C e 27 °C. pH - Potencial hidrogeniônico, CE - condutividade elétrica e OD - oxigênio dissolvido.

Bioensaios	pH		CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		OD (mg L^{-1})	
	25 °C	27 °C	25 °C	27 °C	25 °C	27 °C
Controle	6,85	6,9	18,5	17,5	4,2	4,9
0,002 mg/L Cu	7,2	6,9	20,3	18,7	4,7	4,6
0,009 mg/L Cu	7,1	6,8	23,3	21,2	4,6	4,5
0,385 mg/L Cu	5,1	6,6	32,3	30,3	4,7	4,6
0,001 mg/L Cd	6,4	6,8	19,7	18,5	3,8	5,2
0,01 mg/L Cd	6,05	6,9	23,2	21,2	3,7	5,4
0,375 mg/L Cd	5,9	6,6	32,8	26,2	3,6	5,2
0,002 mg/L Ni	7,1	6,9	16,4	18,1	5,2	5,1
0,025 mg/L Ni	6,8	7,2	20,1	19,4	5,4	5,2
0,221 mg/L Ni	6,9	6,8	22,1	25,4	5,2	5,1
Cd + Ni	6,1	6,6	25,4	27,3	4,7	4,6
Cd + Cu	6,4	6,9	26,7	29,5	5,1	5,2
Cu + Ni	5,9	6,1	29,6	31,6	4,7	5,1
Cd + Cu + Ni	5,7	5,8	33,6	38,5	4,5	4,3
5% (Vinhaça)	5,8	6,1	40,4	45,6	3,5	3,1
10% (Vinhaça)	5,5	5,3	50,5	60,1	3,9	3,3
50% (Vinhaça)	5,1	5,3	55,6	63,1	3,1	2,9